



**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ VII ENZİM GENİNİN  
*E.coli*'de KLONLANMASI, EKSPRESYONU, REKOMBİNANT  
ENZİMİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU  
ve BAZI ANTİBİYOTİKLERİN BU ENZİM AKTİVİTESİ  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Hatice Esra ASLAN**

**Doktora Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Biyokimya Bilim Dalı**

**Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR**

**2018**

**Her hakkı saklıdır.**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ VII ENZİM GENİNİN *E.coli*'de  
KLONLANMASI, EKSPRESYONU, REKOMBİNANT ENZİMİN  
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve BAZI  
ANTİBİYOTİKLERİN BU ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hatice Esra ASLAN

KİMYA ANABİLİM DALI  
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM  
2018

Her hakkı saklıdır.



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ VII ENZİM GENİNİN *E.coli*'de  
KLONLANMASI, EKSPRESYONU, REKOMBİNANT ENZİMİN  
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve BAZI ANTİBİYOTİKLERİN  
BU ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR danışmanlığında, Hatice Esra ASLAN tarafından hazırlanan bu çalışma 11/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı - Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 05.07.2018 tarih ve 27. / 46 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN  
Enstitü Müdürü

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

## ÖZET

Doktora Tezi

### İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ VII ENZİM GENİNİN *E.coli*'de KLONLANMASI, EKSPRESYONU, REKOMBİNANT ENZİMİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve BAZI ANTİBİYOTİKLERİN BU ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hatice Esra ASLAN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Bu çalışmada, insan beyin cDNA'sı kullanılarak amplifiye edilen karbonik anhidraz VII (CA VII) geni *Escherichia coli* (One Shot® Mach1™-T1R) suşuna klonlandı. Rekombinant plazmit, koloni PCR ve sekans analizi ile doğrulandıktan sonra protein ekspresyonu için *Escherichia coli* BL21 (DE-3) suşuna transforme edildi. 6 saat sürede izopropil  $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranozit (IPTG) indüksiyonu ile CA VII ekspresyonu gözlemlendi. Daha sonra hekzahistidin (6xHis) içeren füzyon protein Probond™ nikel şelatlayıcı reçineli afinite kolonu kullanarak %48,07 verim ve 7,02 EU/mg spesifik aktivite ile yaklaşık 21 kat saflaştırma katsayısıyla saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlesini tespit etmek amacıyla SDS-PAGE yapıldı. SUMO-hCA VII füzyon proteininin kütlesi 46,77 kDa olarak belirlendi. Anti-His G-HRP antikorunu kullanılarak yapılan Western blot analizi sonucunda yaklaşık 45 kDa'lık füzyon protein tespit edildi. Ayrıca saflaştırılan rhCA VII enziminin karakterizasyonu yapılarak enzimin optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, aktivasyon enerjisi, aktivasyon entalpisi, Q10,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi. Daha sonra saf olarak elde edilen rekombinant enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkileri araştırıldı. İnhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler için Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla  $K_i$  sabitleri ile inhibisyon tipleri tespit edildi.

2018, 142 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Karbonik anhidraz, *E. coli*, rekombinant protein, enzim saflaştırma.

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### CLONING AND EXPRESSION OF HUMAN CARBONIC ANHYDRASE VII GENE in *E.coli*, PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ENZYME AND INVESTIGATION OF SOME ANTIBIOTICS EFFECTS ON ENZYME ACTIVITY

Hatice Esra ASLAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

In this study, carbonic anhydrase VII (CA VII) was cloned into *Escherichia coli* (One Shot® Mach1™-T1R) strain by using cDNA of human brain and successfully expressed. The integrity of the constructed plasmid was confirmed by colony PCR and it was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE-3) strain for protein expression. CA VII expression was observed by induction of isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 6 hours. Then, the fusion protein containing hexahistidine (6xHis) was then purified with 7,02 EU/mg of specific activity, 48.07% of purification yield and approximately 21 of purification folds using a Probond™ nickel chelating resin affinity column. SDS-PAGE was performed to check the purity of the purified enzyme and determine the molecular mass. The mass of the SUMO-hCA VII fusion protein was determined to be 46.77 kDa. As a result of Western blot analysis using Anti-His G-HRP antibody, fusion protein was detected approximately 45 kDa. In addition, optimal pH, optimal ionic strength, optimal temperature, activation energy, activation enthalpy,  $Q_{10}$ ,  $K_M$  and  $V_{max}$  values of enzyme were determined by characterization of purified rhCA VII enzyme. Then, the effects of some antibiotics on pure recombinant enzyme activity were investigated. For antibiotics with an inhibitory effect, inhibition types were determined with  $K_i$  constants using Lineweaver-Burk graphs.

**2018, 142 pages**

**Keywords:** Carbonic anhydrase, *E.coli*, recombinant protein, enzyme purification

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Sayın Prof. Dr. Őukrü BEYDEMİR yönetiminde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalıőmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana her zaman yol gösteren, hoőtörü ve sabırla her konuda beni destekleyerek her türlü yardım ve desteği sağlayan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Őukrü BEYDEMİR'e sonsuz teőkükürlerimi sunarım.

Ayrıca Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVIÖĞLU'na, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e teőkükür ederim.

Çalıőmalarım boyunca beni yönlendiren, değerli fikirlerini, bilgisini, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli grup arkadaőtım Sayın Dr. Yeliz DEMİR'e ayrıca Sayın Dr. Muhammet Serhat ÖZASLAN'a ve Sayın Araőt. Gör. Sümeyye AKBULUT'a teőkükürü bir borç bilirim.

Tez çalıőmalarım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen baőtta babam Sayın Prof. Dr. Kadir ASLAN olmak üzere annem Gülizar ASLAN, ablam Rabia ASLAN ve niőtanlım Semih DURAN'a sonsuz teőkükürlerimi sunarım.

**Hatice Esra ASLAN**

**Haziran, 2018**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi .....	2
1.2. Karbonik Anhidraz Ailesi .....	5
1.2.1. Karbonik Anhidraz VII İzoenzimi .....	12
1.3. Rekombinant DNA Teknolojisi.....	13
1.4. Prokaryotlarda Rekombinant Protein Ekspresyon Sistemleri .....	15
1.5. SUMO Protein Ekspresyon Sistemi .....	15
1.6. Blotlama .....	19
1.7. Antibiyotikler .....	19
1.8. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Antibiyotikler .....	22
1.8.1. Ampisilin sodyum .....	22
1.8.2. Piperasilin sodyum .....	23
1.8.3. Amoksisilin .....	24
1.8.4. Sefazolin sodyum .....	24
1.8.5. Sefuroksim sodyum .....	25
1.8.6. Seftriakson sodyum .....	26
1.8.7. Sefoperazon sodyum .....	26
1.8.8. Amikasin sülfat.....	27
1.8.9. Kanamisin sülfat.....	28
1.8.10. Gentamisin sülfat.....	29
1.8.11. Tobramisin.....	30
1.8.12. Netilmisin .....	31
1.8.13. Siprofloksasin.....	32
1.8.14. Levofloksasin .....	33

1.8.15. Ofloksasin.....	33
1.8.16. Moksifloksasin HCl.....	34
1.8.17. Rifamisin sodyum.....	35
1.8.18. Vankomisin HCl.....	35
1.8.19. Teikoplanin.....	36
1.8.20. Linkomisin HCl.....	37
1.8.21. Klindamisin fosfat .....	38
1.8.22. Ornidazol .....	39
1.8.23. Metronidazol sodyum.....	40
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>52</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	52
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	53
3.3. Deneylerde Kullanılan Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması .....	54
3.3.1. Besiyeri ve agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler .....	54
3.3.1.a. LB sıvı besiyeri.....	54
3.3.1.b. LB Agar besiyeri .....	55
3.3.1.c. Kanamisin antibiyotiği stok çözeltisi .....	55
3.3.1.d. 1X TAE tamponunun (Tris/Asetat/EDTA tamponu) hazırlanması.....	55
3.3.2. Rekombinant proteinin saflaştırılması işlemlerinde kullanılan çözeltiler .....	55
3.3.2.a. Lizis tamponu .....	55
3.3.2.b. IPTG stok çözeltisi (50 mM).....	55
3.3.2.c. 3 M imidazol çözeltisi .....	56
3.3.2.d. 5X Doğal saflaştırma tamponu.....	56
3.3.2.e. 1X Doğal saflaştırma tamponu .....	56
3.3.2.f. Doğal bağlanma tamponu .....	56
3.3.2.g. Doğal yıkama tamponu .....	56
3.3.2.h. Doğal elüsyon tamponu.....	56
3.3.2.i. Diyaliz tamponu .....	57
3.3.3. Karbonik anhidraz enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler .....	57
3.3.4. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler .....	57
3.3.5. Western blot analizinde kullanılan çözeltiler .....	58



3.3.6. Kinetik çalışmalarda kullanılan çözeltiler .....	60
3.3.6.a. Optimum pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler .....	60
3.3.6.b. Optimum iyonik şiddet çalışması için kullanılan tampon çözelti .....	60
3.3.6.c. Optimum sıcaklık çalışması için kullanılan tampon çözelti .....	60
3.4. Moleküler Biyolojik Metotlar .....	61
3.4.1. Primerlerin hazırlanması .....	61
3.4.2. hCA VII Genine ait dizinin çoğaltılması .....	61
3.4.3. DNA agaroz jel elektroforezi .....	62
3.4.4. Rekombinant vektörün elde edilmesi .....	63
3.4.5. Ligasyon ürününün transformasyonu .....	63
3.4.6. Koloni PCR .....	64
3.4.7. Plazmit izolasyonu .....	65
3.4.8. Çapraz kontrol PCR reaksiyonu .....	66
3.4.9. Gliserolde stoklama .....	66
3.4.10. <i>E. coli</i> hücrelerinden izole edilen rekombinant vektörün dizi analizi .....	66
3.4.11. Rekombinant plazmitin <i>E.coli</i> BL21 (DE-3)'e transformasyonu .....	67
3.4.12. Pilot (Deneme) ekspresyon .....	67
3.4.13. Pilot ekspresyon sonrası hücrelerin parçalanması .....	68
3.4.14. Western blot analizi .....	68
3.5. Biyokimyasal Metodlar .....	70
3.5.1. Bakteri hücre lizatının hazırlanması .....	70
3.5.2. Doğal şartlar altında kolondan rekombinant proteinlerin saflaştırılması .....	70
3.5.2.a. ProBond™ kolonun hazırlanması .....	70
3.5.2.b. Lizatın hazırlanması, kolona tatbiki ve elüsyonu .....	71
3.5.3. Kantitatif protein tayini .....	71
3.5.4. hCA VII enziminin aktivite ölçümü .....	72
3.5.4.a. Hidrataz aktivitesi .....	72
3.5.4.b. Esteraz aktivitesi .....	73
3.5.5. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile rhCAVII enzim saflığının kontrolü .....	74
3.5.6. SDS-PAGE kullanarak rhCA VII enziminin molekül kütlesi tayini .....	75
3.5.7. rhCA VII enzimi için karakterizasyon çalışmaları .....	76

3.5.7.a. rhCA VII enzimi için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	76
3.5.7.b. rhCA VII enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar .....	76
3.5.7.c. rhCA VII enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar .....	76
3.5.7.d. rhCA VII enziminin aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ), aktivasyon entalpisi ( $\Delta H$ ) ve $Q_{10}$ değerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar.....	77
3.5.7.e. p-Nitrofenol (PNF) substratı için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar .....	77
3.6. rhCA VII Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesi .....	78
3.7. İnhibisyon Etkisi Gösteren Antibiyotikler İçin $IC_{50}$ ve $K_i$ Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar .....	78
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>80</b>
4.1. hCA VII enziminin mRNA ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi.....	80
4.2. hCA VII Enziminin Aminoasit Dizisi .....	81
4.3. hCA VII Genine Ait Primerlerin Belirlenmesi.....	81
4.4. cDNA Kütüphanesinden hCA VII Geninin PCR İle Çoğaltılması .....	81
4.5. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi ve Konak Organizmaya Transformasyonu.....	82
4.6. Koloni PCR .....	83
4.7. Plazmit İzolasyonu ve Çapraz Kontrol PCR .....	84
4.8. pET SUMO Vektörüne Yerleştirilen Genin Dizi Analizi .....	85
4.9. IPTG Kullanılarak İstenilen Genin Pilot Ekspresyonu .....	86
4.10. Western Blot Analizi .....	87
4.11. Doğal Şartlar Altında Afinite Kolonundan Proteinin Saflaştırılması.....	88
4.12. Diyaliz .....	89
4.13. SUMO-hCA VII Füzyon Proteinin SDS-PAGE İle Mol Kütlelerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar .....	89
4.14. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	90
4.15. Rekombinant hCA VII Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar .....	91

4.15.1. Optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	91
4.15.2. Optimum iyonik şiddetin bulunmasına yönelik sonuçlar.....	92
4.15.3. Optimum sıcaklığın bulunmasına yönelik sonuçlar .....	93
4.15.4. Aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ), aktivasyon entalpisi ( $\Delta H$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar .....	94
4.16. PNF Substratı İçin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışma Sonuçları .....	95
4.17. rhCA VII Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları .....	96
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>122</b>
KAYNAKLAR .....	135
ÖZGEÇMİŞ .....	143

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\Delta H$	Aktivasyon entalpisi
bç	Baz çifti
BSA	Bovinel (sığır) serum albumin
CA	Karbonik anhidraz
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
E.C.	Enzim komisyonu
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EU	Enzim Ünitesi
$E_a$	Aktivasyon enerjisi
EtBr	Etidyum bromür
hCA VII	İnsan karbonik anhidraz VII izoenzimi
I	İnhibitör
IC50	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IPTG	İzopropil- $\beta$ -D-tiyogalaktopiranozit
kDa	Kilodalton
$K_i$	Enzim-inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
$K_M$	Enzimin aktif bölgesinin yarısının substratla dolduğu andaki substrat konsantrasyonu/ Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
LB	Luria-Bertani
MK	Molekül kütlesi
mRNA	Messenger (haberci) ribonükleik asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
OD	Optik dansite
ORF	Open reading frame-Translasyona uğrayan gen bölgesi
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Phosphate buffer salin

PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PER	Amonyum persülfat
Q10	Her 10°C'lik ısı artışı için reaksiyon hızında meydana gelen artış
R	İdeal gaz sabiti
rhCA VII	Rekombinant insan karbonik anhidraz VII
R <sub>f</sub>	Proteinin yürüme mesafesinin boyanın yürüme mesafesine oranı
RNA	Ribonükleik asit
RT	Reverse transkriptaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetrametilendiamin
T <sub>m</sub>	Ayrılma sıcaklığı
UV	Ultraviyole
V <sub>max</sub>	Maksimum hız

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Karbondioksit'in CA katalizörlüğünde metabolize edilmesi .....	3
Şekil 1.2. CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi.....	7
Şekil 1.3. Bazı önemli sülfonamid türevleri .....	10
Şekil 1.4. hCA VII yapısının şerit diyagramı .....	13
Şekil 1.5. Restriksiyon nükleazlar kullanılarak rekombinat DNA oluşumu.....	14
Şekil 1.6. pET SUMO vektör haritası.....	18
Şekil 1.7. pET SUMO vektörüne ait TA klonlama kısmı.....	18
Şekil 1.8. Başlıca antimikrobiyal ajanların hedefleri.....	22
Şekil 1.9. Ampisilin sodyum molekülünün açık formülü .....	23
Şekil 1.10. Piperasilin sodyum molekülünün açık formülü.....	23
Şekil 1.11. Amoksisilin molekülünün açık formülü .....	24
Şekil 1.12. Sefazolin sodyum molekülünün açık formülü.....	25
Şekil 1.13. Sefuroksim sodyum molekülünün açık formülü.....	25
Şekil 1.14. Seftriakson sodyum molekülünün açık formülü.....	26
Şekil 1.15. Sefoperazon sodyum molekülünün açık formülü .....	27
Şekil 1.16. Amikasin sülfat molekülünün açık formülü .....	28
Şekil 1.17. Kanamisin sülfat molekülünün açık formülü .....	29
Şekil 1.18. Gentamisin sülfat molekülünün açık formülü .....	30
Şekil 1.19. Tobramisin molekülünün açık formülü .....	31
Şekil 1.20. Netilmisin molekülünün açık formülü.....	32
Şekil 1.21. Siprofloksasin molekülünün açık formülü .....	32
Şekil 1.22. Levofloksasin molekülünün açık formülü.....	33
Şekil 1.23. Ofloksasin molekülünün açık formülü .....	34
Şekil 1.24. Moksifloksasin HCl molekülünün açık formülü .....	34
Şekil 1.25. Rifamisin sodyum molekülünün açık formülü .....	35
Şekil 1.27. Teikoplanin molekülünün açık formülü .....	37
Şekil 1.28. Linkomisin HCl molekülünün açık formülü .....	38
Şekil 1.29. Klindamisin fosfat molekülünün açık formülü.....	39
Şekil 1.30. Ornidazol molekülünün açık formülü.....	39

<b>Şekil 1.31.</b> Metronidazol sodyum molekülünün açık formülü .....	40
<b>Şekil 4.1.</b> İnsan CA VII mRNA kodlayan nükleotid dizisi.....	80
<b>Şekil 4.2.</b> PCR sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	82
<b>Şekil 4.3.</b> İnkübasyon sonrası büyüyen transforme edilmiş bakteri kolonileri.....	83
<b>Şekil 4.4.</b> Agaroz jel elektroforezinde yürütülen koloni PCR ürünleri.....	83
<b>Şekil 4.5.</b> İzole edilen plazmitin agaroz jel görüntüsü.....	84
<b>Şekil 4.6.</b> İzole edilen plazmit ile gerçekleştirilen PCR sonrası agaroz jel görüntüsü ...	85
<b>Şekil 4.7.</b> Dizileme sonucunun hCA VII dizisi ile blastlama sonucu.....	86
<b>Şekil 4.8.</b> IPTG ile indüklenen ve indüklenemeyen hücrelere ait SDS-PAGE fotoğrafi.....	87
<b>Şekil 4.9.</b> Western blot analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü .....	88
<b>Şekil 4.10.</b> Saflaştırılan SUMO-hCA VII enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	88
<b>Şekil 4.11.</b> SDS-PAGE ile çizilen Rf - log M <sub>K</sub> grafiği.....	89
<b>Şekil 4.12.</b> Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik .....	90
<b>Şekil 4.13.</b> rhCA VII enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi çalışması sonucuna yönelik çizilen aktivite-pH grafiği .....	92
<b>Şekil 4.14.</b> Değişik konsantrasyonlardaki pH:8,0 olan Tris/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak rhCA VII enziminin optimum iyonik şiddetin belirlenmesi için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği .....	93
<b>Şekil 4.15.</b> rhCA VII enzimi için optimum sıcaklığı belirlemek için çizilen çizilen sıcaklık-aktivite grafiği .....	94
<b>Şekil 4.16.</b> rhCA VII enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği.....	95
<b>Şekil 4.17.</b> rhCA VII enzimi için 5 farklı PNF konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	96
<b>Şekil 4.18.</b> Ampisilin sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	97
<b>Şekil 4.19.</b> Piperasilin sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	98
<b>Şekil 4.20.</b> Amoksisilinin rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	99
<b>Şekil 4.21.</b> Sefazolin sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	100
<b>Şekil 4.22.</b> Sefuroksim sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	101
<b>Şekil 4.23.</b> Seftriakson sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	102
<b>Şekil 4.24.</b> Sefoperazon sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	103

<b>Şekil 4.25.</b> Amikasin sülfatın rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	104
<b>Şekil 4.26.</b> Kanamisin sülfatın rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	105
<b>Şekil 4.27.</b> Gentamisin sülfatın rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	106
<b>Şekil 4.28.</b> Tobramisinin rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	107
<b>Şekil 4.29.</b> Rifamisin sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	108
<b>Şekil 4.30.</b> Vankomisin HCl'in rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	109
<b>Şekil 4.31.</b> Teikoplaninin rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	110
<b>Şekil 4.32.</b> Linkomisin HCl'in rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	111
<b>Şekil 4.33.</b> Klindamisin fosfatın rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	112
<b>Şekil 4.34.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine ampisilin sodyumun Lineweaver-Burk grafiği .....	113
<b>Şekil 4.35.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine piperasilin sodyumun Lineweaver-Burk grafiği .....	113
<b>Şekil 4.36.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine amoksisilin Lineweaver-Burk grafiği .....	114
<b>Şekil 4.37.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyumun Lineweaver-Burk grafiği .....	114
<b>Şekil 4.38.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyumun Lineweaver-Burk grafiği.....	115
<b>Şekil 4.39.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine seftriakson sodyumun Lineweaver-Burk grafiği.....	115
<b>Şekil 4.40.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefoperazon sodyumun Lineweaver-Burk grafiği.....	116
<b>Şekil 4.41.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfatın Lineweaver-Burk grafiği .....	116
<b>Şekil 4.42.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine kanamisin sülfatın Lineweaver-Burk grafiği .....	117
<b>Şekil 4.43.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine gentamisin sodyumun Lineweaver-Burk grafiği .....	117
<b>Şekil 4.44.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine tobramisinin Lineweaver-Burk grafiği .....	118



<b>Şekil 4.45.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine rifamisin sodyumun Lineweaver-Burk grafiği .....	118
<b>Şekil 4.46.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in Lineweaver-Burk grafiği .....	119
<b>Şekil 4.47.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine teikoplaninin Lineweaver-Burk grafiği .....	119
<b>Şekil 4.48.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in Lineweaver-Burk grafiği .....	120
<b>Şekil 4.49.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine klindamisin fosfatın Lineweaver-Burk grafiği .....	120

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> $\alpha$ -CA süper familyasının dağılım gösterdiği organ/doku, subselüler lokalizasyonu, katalitik aktivitesi ve sülfonamidlere olan ilgisi .....	8
<b>Çizelge 1.2.</b> $\alpha$ -CA tarafından katalizlenen reaksiyon .....	9
<b>Çizelge 1.3.</b> Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalizlemesindeki aksaklıkların sebep olduğu hastalıklar ve bu izoenzimlerin birbirleriyle olan ilişkisi.....	11
<b>Çizelge 3.1.</b> Çalışmada kullanılan kimyasallar ve markaları.....	52
<b>Çizelge 3.2.</b> Çalışmalar sırasında kullanılan alet ve cihazlar.....	53
<b>Çizelge 3.3.</b> hCA VII genine ait PCR karışımı.....	62
<b>Çizelge 3.4.</b> hCA VII geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon koşulları .....	62
<b>Çizelge 3.5.</b> Ligasyon işlemi için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	63
<b>Çizelge 3.6.</b> Koloni PCR reaksiyon karışımı .....	64
<b>Çizelge 3.7.</b> hCA VII için koloni PCR reaksiyon şartları.....	65
<b>Çizelge 3.8</b> 1. Koloniden izole edilen plazmit ile yapılan çapraz PCR.....	66
<b>Çizelge 3.9.</b> SDS jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli için kullanılan mL olarak çözelti miktarları .....	68
<b>Çizelge 3.10.</b> SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli için kullanılan mL olarak çözelti miktarları .....	69
<b>Çizelge 3.11.</b> Aktivite ölçümü için gerekli çözeltiler .....	74
<b>Çizelge 4.1.</b> hCA VII genine ait dizayn edilen primer bilgileri.....	81
<b>Çizelge 4.2.</b> SUMO-hCA VII füzyon proteinin afinite kolonu ile saflaştırma sonuçları (Esteraz aktivitesi sonuçları) .....	90
<b>Çizelge 4.3.</b> SUMO-hCAVII füzyon proteinin afinite kolonu ile saflaştırma sonuçları (Hidrataz aktivitesi sonuçları) .....	91
<b>Çizelge 4.4.</b> 50 mM Na-Fosfat tampon çözeltisi ile rhCA VII enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan enzim aktivitesi ölçüm sonuçları.....	91
<b>Çizelge 4.5.</b> 50 mM Tris/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi ile rhCA VII enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan enzim aktivitesi ölçüm sonuçları.....	92
<b>Çizelge 4.6.</b> rhCA VII enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Tris/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	93

<b>Çizelge 4.7.</b> rhCA VII enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları .....	94
<b>Çizelge 4.8.</b> rhCA VII enzimi için aktivite ölçümünün logaritma değerleri .....	95
<b>Çizelge 4.9.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine ampisilin sodyumun etkisi .....	97
<b>Çizelge 4.10.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine piperasilin sodyumun etkisi .....	98
<b>Çizelge 4.11.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine amoksisilin etkisi .....	99
<b>Çizelge 4.12.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyumun etkisi .....	100
<b>Çizelge 4.13.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyumun etkisi.....	101
<b>Çizelge 4.14.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine seftriakson sodyumun etkisi.....	102
<b>Çizelge 4.15.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefoperazon sodyumun etkisi.....	103
<b>Çizelge 4.16.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfatın etkisi.....	104
<b>Çizelge 4.17.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine kanamisin sülfatın etkisi.....	105
<b>Çizelge 4.18.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfatın etkisi .....	106
<b>Çizelge 4.19.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine tobramisin etkisi.....	107
<b>Çizelge 4.20.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine rifamisin sodyumun etkisi.....	108
<b>Çizelge 4.21.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in etkisi .....	109
<b>Çizelge 4.22.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine teikoplaninin etkisi.....	110
<b>Çizelge 4.23.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisi.....	111
<b>Çizelge 4.24.</b> rhCA VII enzim aktivitesi üzerine klindamisin fosfatın etkisi.....	112
<b>Çizelge 4.25.</b> rhCA VII enzimi için bulunan IC <sub>50</sub> değerleri, K <sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon türleri.....	121
<b>Çizelge 5.1.</b> hCA VII enziminin saflaştırılması ve inhibisyonu ile ilgili sonuçlar .....	133

## 1. GİRİŞ

Canlı sistemlerde meydana gelen kimyasal tepkimeler enzim denilen biyolojik katalizörler aracılığı ile gerçekleşmektedir. Gelişen teknoloji bu biyolojik katalizörlerin yapılarının ve işlevlerinin aydınlatılmasına olanak sağlamaktadır. Buna ek olarak son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin de geliştirilmesiyle bu moleküller üzerinde istenilen değişikliklerin yapılması sonucunda bu yapıların daha etkili bir biçimde kullanılması amaçlanmıştır. Ayrıca moleküler tekniklerin gelişimi, doğal ortamda üretilen enzimlerden daha yüksek verimle etki gösteren enzimler üretilmesini de beraberinde getirmiştir. Üretilen bu enzimler özellikle sağlık alanı olmak üzere pek çok alanda oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptirler (Ceylan 2016)

Gelişen modern teknoloji ile desteklenen rekombinant DNA teknolojisi son yıllarda oldukça ilerlemiş ve canlılarda meydana gelen koşulların *in vitro* ortamda sağlanmasına olanak tanımıştır. Böylece canlılarda meydana gelen yaşamsal olayların aydınlatılabilmesi adına yapılan çalışmalar önemli ölçüde hız kazanmıştır. Bu gelişmeler ışığında *in vivo* ortamda gerçekleşen reaksiyonların mekanizmaları hakkında bilgi edinmeye bağlı olarak günümüzde pek çok hastalığın tedavisi için ilaç tasarımı ve bu ilaçların geliştirilmesi çalışmaları da hızla artmaktadır (Ceylan 2016).

Günümüzde çeşitli isimlerde gerek genetik, gerek çevresel faktörlere dayanan hastalıklara bağlı olarak üretilen rekombinant enzimler, *in vivo* işlev gören enzimler ile aynı yapı ve özellikte olduklarından dolayı bu enzim genlerini klonlanma, enzimleri üretme ve saflaştırma çalışmaları doğruluk ve güvenilirlik sağlamaktadır. Ayrıca bu enzimlerin düşük maliyetle ve yüksek verimle fazla miktarda elde edilmesi ticari açıdan da oldukça önem arz etmektedir (Ceylan 2016).

### 1.1. Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi

Karbondioksit (CO<sub>2</sub>), yaşam için merkezi bir unsur olan karbonun çok kararlı bir biçimi ve atmosferde oldukça bol miktarda bulunan basit moleküllerden biridir. Bu gaz, suyla reaksiyona girebilir ve kendiliğinden bikarbonat ve protonlara dönüşen, kararsız bir bileşik olan karbonik asit (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) oluşumuna neden olabilir. Ancak özellikle birçok doku ve organizmada fizyolojik pH değeri olan 7,5 veya daha düşük pH değerlerinde bu reaksiyon oldukça yavaştır. Diğer taraftan, CO<sub>2</sub> hidrasyonu daha yüksek pH değerlerinde çok etkili ve 12'nin üzerindeki pH değerlerinde ise anlık meydana gelir (Supuran 2008; Alterio *et al.* 2012).

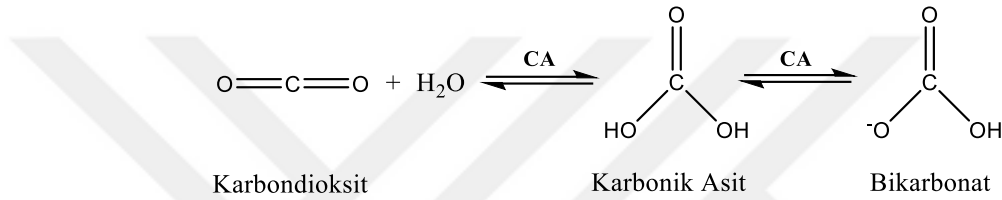
Tüm yaşam süreçlerinde oldukça önemli bir molekül olan ve çoğu organizmada da yüksek miktarda üretilen CO<sub>2</sub>'in, katalizörler tarafından bikarbonata dönüşümünü sağlanmaktadır. Bu katalizörler 'karbonik anhidrazlar' olarak bilinen enzimlerdir. Tüm canlı organizmalar metabolik reaksiyonlar sonucunda meydana gelen yüksek miktardaki CO<sub>2</sub>'i yönetebilmek için karbonik anhidraz enzimlerine ihtiyaç duyarlar (Supuran and Scozzafava 2007; Neri and Supuran 2011; Supuran 2011, 2012; Bertucci *et al.* 2013).

Karbonik anhidrazlar (CA, karbonat hidrolizaz, karbonat dehidrataz E.C. 4.2.1.1), farklı dokularda farklı miktarlarda hücresel lokalizasyona sahip farklı izoformlardan oluşan metaloenzimlerin bir ailesidir. Karbonik anhidrazlar, karbondioksitin bikarbonata katalitik olarak hidrasyonu, solunumu düzenleme, pH, elektrolit sekresyonu, biyosentetik reaksiyonlar, kemik rezorpsiyonu ve kalsifikasyon gibi birçok fizyolojik süreçte önemli rol oynarlar. Ayrıca bu enzimler, inhibitörlerinin geliştirilmesi ile diüretik, antiobezite ve antitümör ilaçları gibi çeşitli patolojik yollarla ilişkilendirilmektedir (Gitto *et al.* 2010).

Karbonik anhidraz enzimi vücutta asit-baz dengesinin sağlanmasında önemli rolü olan, hem CO<sub>2</sub> molekülünün dönüşümlü hidrasyonunu hemde bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) iyonunun dehidrasyonunu katalizleyen, katalitik aktivitesi için Zn<sup>2+</sup> iyonu gereken bir metaloenzimdir. Karbonik anhidraz enziminin en önemli görevi, CO<sub>2</sub> ve protonların

intraselüler, ekstraselüler ve interselüler alanlardaki membranlardan transportunu sağlamaktır (Parkkila *et al.* 2001; Missner *et al.* 2008; Hassan *et al.* 2013).

Metaloenzim olan karbonik anhidraz, çok basit fakat oldukça önemli bir fizyolojik reaksiyon olan karbondioksitin bikarbonat ve protona hidrolizini katalizler. CA enzimi, genelde metabolik CO<sub>2</sub>'nin taşınmasını ve birçok dokuda H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'nin dönüşümünü sağlamaktadır (Aksu *et al.* 2015; Yıldırım *et al.* 2015).



**Şekil 1.1.** Karbondioksit'in CA katalizörlüğünde metabolize edilmesi

Canlı metabolizmasının önemli metabolitlerinden biri olan CO<sub>2</sub>, karbonik asit ve bikarbonat oluşumu ile dengededir. Bikarbonat negatif yüklüdür ve sulu çözeltilerde çözünürlüğü yüksek olmasına rağmen lipitlerde çözünürlüğü oldukça azdır. CO<sub>2</sub> sulu çözeltilerde ve lipitlerde çözünürlüğü yüksek olan bir metabolittir. Bu nedenle CO<sub>2</sub> çok kolay şekilde hem hücrenin iç kısmına hem de hücrenin dış kısmına difüze olabilmektedir. Buna karşın bikarbonat membranı kolaylıkla geçemez. Bu nedenle bikarbonatın öncelikle membrandan taşınması gerekmektedir. pH:6,3 üzerinde CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> arasındaki denge, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonuna doğrudur ve hücre içinde ihtiyaç duyulan CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> konsantrasyonlarının devam etmesinde sorunlar meydana gelir. Fizyolojik pH'da CO<sub>2</sub>'nin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonuna dönüşümü oldukça yavaştır ve bu reaksiyonun hızlanması enzim tarafından katalizlenmeye gerçekleşir. CO<sub>2</sub>'in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonuna dönüşümü CO<sub>2</sub>'in hücre içinde tutulmasında önemli bir durum oluştururken, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonunun CO<sub>2</sub>'ye dönüşümü ise bikarbonatın hücre içine girişini kolaylaştırır. Bu amaçla kullanılan karbonik anhidraz enzimi CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'ın birbirlerine dönüşüm reaksiyonlarını katalizlemektedir (Smith and Ferry, 2000).

Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması; son altmış yıldır yapılan çalışmalar ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, CA enziminin metabolizmada oldukça önemli, çözelti ortamında kararlı olan ve uygun şartlar sağlandığında aktivitesini kaybetmeden uzun süre dayanıklılığını koruyan özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca enzim kinetiği hakkında hCA II izoenzimi üzerinde yapılan spesifik bölgenin mutasyonu ve X-ray kristalografisi çalışmalarında da katalitik mekanizma oldukça ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmıştır. CA izoenzimlerinin mekanizmaları genellikle bu mekanizma ile aynı olmasına rağmen, bazı spesifik detaylar da farklı olabilmektedir. Bu çalışmalar neticesinde, CA enziminin yapısal olarak iki önemli özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. İlki, aktif bölgesinde  $Zn^{2+}$  iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu bulundurmasıdır. İkincisi ise, aktif bölgeye yakın amino asitler, proton verecek ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmişlerdir (Yazıcıoğlu 2013).

Katalizde hız sınırlayıcı basamak enzimin çinko-hidroksit halini oluşturan proton transferi reaksiyondur. CA II, CA IV, CA V, CA VII ve CA IX gibi katalitik olarak çok aktif izoenzimlerde, bu işlem aktif bölgenin girişindeki histidin aminoasidi tarafından yürütülür (His 64). Bu aynı zamanda difüzyon kontrol sınırına yaklaşan CA II'nin bilinen en hızlı ( $k_{cat}/K_M = 1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) enzimlerden birisi olma nedenini açıklar (Supuran *et al.* 2003).

Karbonik anhidraz enziminin hidratasyon reaksiyonları için turnover sayısı ( $k_{cat}$ ) 400,000-600,000  $\text{s}^{-1}$  (Lindskog and Coleman, 1973; Roy *et al.* 2010) arasındadır. Yapılan kristal yapı analizleri bazı moleküllerin enzimin aktif bölgesine bağlanarak reaksiyon ortamında enzimin aktif bölgesinde bazı konformasyonel değişikliklere sebep olduğunu, böylece proton transfer prosesini kolaylaştırdığını ve bu şekilde enzimi aktive ettiği bildirilmiştir (Supuran *et al.* 2004; Hassan *et al.* 2013).

Tüm organizmalarda bulunan bir enzim olan karbonik anhidraz (CA) ilk olarak Meldrum ve Roughton tarafından sığır eritrositlerinde keşfedilmiş ve 1933 yılında da ilk defa memeli eritrositinden saflaştırılmıştır (Supuran and Scozzafava 2001; Tripp *et al.* 2004).

Daha sonraki yıllarda ise, eritrosit (insan, balık, sıçan), sığır kemiği ve lökositleri, sıçan tükürüğü, çeşitli bitki ve bakteri kaynaklarından saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi aynı zamanda da birçok kaynaktan da karakterize edilebilmiştir. Memelilerde enzimin mol kütlesi ~30 kDa civarında olduğu bulunmuştur (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004). Ayrıca yapılan birçok farklı çalışmada balık solungaçları ve salgı organları yapımında, kabuklu canlıların kabuk yapımında ve bazı böcek, bakteri ve alglerde enzimin değişik rollerinin olduğu da ispatlanmıştır (Wistrand 1981; Holmes 1997; Chegwiddden *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2001).

Eritrositlerin de içinde bulunduğu pek çok kaynaktan pH düzenleyici enzim olarak görev alan karbonik anhidraz enziminin, en önemlisi asit-baz dengesi olan çok sayıda önemli metabolik rolü vardır. Karbonik anhidrazlar, doku ve organların akciğer ile arasında solunum sırasında meydana gelen CO<sub>2</sub> ve bikarbonat ile ilgili doğal olarak meydana gelen tüm olaylarda, pH ve CO<sub>2</sub> dengesinde, biyosentetik olarak meydana gelen reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kalsifikasyonda, elektrolit sekresyonunda, tümör oluşumunda, kemik rezorpsiyonunda ve birçok diğer metabolik durumda görev almaktadır (Chegwiddden *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000).

## 1.2. Karbonik Anhidraz Ailesi

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen fakat farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzim adı verilir. İzoenzimlerin aktiviteleri farklı, substrat, kofaktör ve inhibitörlere karşı afiniteleri de değişik olabilir (Keha ve Kührevioğlu 2009). İzoenzimlerin aminoasit sayı ve sıraları, izoelektrik noktaları, elektroforetik hareketlilikleri farklı olduğu gibi her bir izoenzimin genleri de farklıdır (Devlin 2002).

İnsanda bulunan farklı izoenzimlerin gen yapıları belirlenmiştir. Bu izoenzimlerin doku ve organlara göre hayati fonksiyonlarda farklılık gösterdiği saptanmıştır. 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).

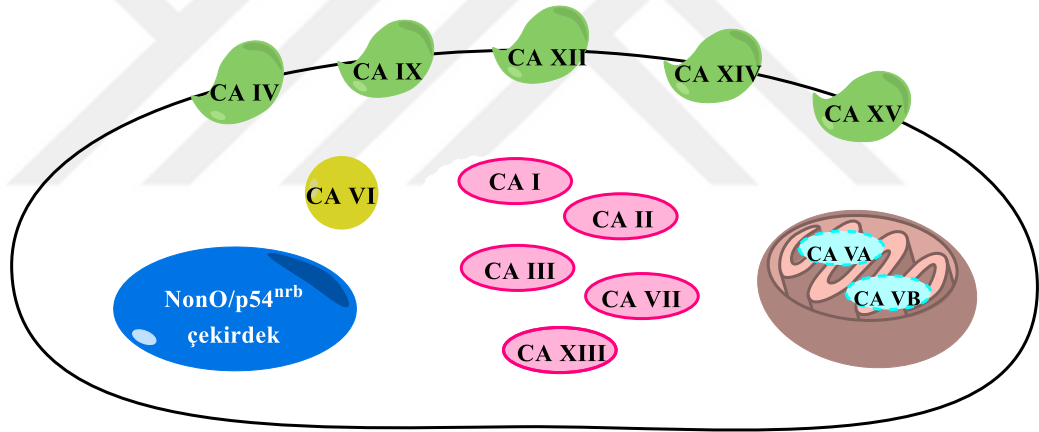
CA'lar ilk önce 1920'lerin sonunda, hemoliz olmuş kandaki karbondioksit ve bikarbonatın karşılıklı dönüşümünü katalizleyen kırmızı kan hücrelerinde tespit edilmiştir. Bundan birkaç yıl sonra, bir enzim olduğu bulunmuş ve kırmızı kan hücrelerinden saflaştırılarak 'karbonik anhidraz' adı verilmiştir (Bootorabi 2011). Yapılan çalışmalarda şimdiye kadar toplam 7 farklı CA süperfamilyası olduğu ortaya konulmuştur. Bunlar sırasıyla  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ -, ve  $\theta$ - CA enzim süperfamilyalarıdır (Aspatwar *et al.* 2018) Bu farklı süperfamilyalar aktif bölgelerinde kofaktör olarak  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  veya  $Fe^{2+}$  gibi farklı metal iyonlarını içerirler (Boztaş *et al.* 2015; Scozzafava *et al.* 2015).  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - ve  $\zeta$ -CA'ların tümü metaloenzimdir;  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\delta$ -CA'lar aktif bölgesinde Zn(II) iyonu içerirken,  $\gamma$ -CA muhtemelen Fe(II) iyonu içerir (fakat Zn(II) veya Co(II) iyonları ile de aktiftir).  $\varepsilon$ -sınıfı fizyolojik reaksiyonu katalizlemek için Cd(II) veya Zn(II) iyonu kullanır. Beş enzim sınıfının üç boyutlu yapısı oligomerizasyon durumlarından dolayı birbirinden oldukça farklıdır:  $\alpha$ -CA normalde monomer nadiren de olsa dimerdir,  $\beta$ -CA dimer, tetramer veya oktamer olabilirken  $\gamma$ -CA trimer,  $\delta$ - ve  $\zeta$ -CA'lar muhtemelen monomerdir.  $\delta$ -CA dışında tüm bu enzim sınıfları kristallendirilmiş ve karakterize edilmiştir (Gilmour 2010).

Hayvanlarda daha çok  $\alpha$ -CA yaygındır ve omurgalılar tarafından eksprese edilen tek CA gen ailesidir.  $\alpha$ -CA geni birçok bitki, alg ve bakteride de bulunmasına rağmen, bu canlılarda  $\beta$ -CA'lar daha baskındır. Ayrıca bazı omurgasızlarda da  $\beta$ -CA geni bulunur.  $\gamma$ -CA archaea ve bazı bakterilerde bulunurken  $\delta$ - ve  $\varepsilon$ -CA, deniz diatomlarında (fitoplanktonların en yaygın tipi olan algler) bulunmaktadır (Gilmour 2010).

$\alpha$ -CA süperfamilyası önemli bir şekilde farklı lokalizasyon ve dağılıma sahiptir. Günümüze kadar  $\alpha$ -CA'nın 16 tane izoenzimi belirlenmiştir (Beydemir and Gülçin 2004; Akıncıoğlu *et al.* 2013). Çoklu CA izoformlarının keşfi ile araştırmacılar memelilerde ek CA izoformlarını tanımlama üzerine yoğunlaşmışlardır. Kinetik özellikler, inhibitörlere duyarlılık, hücre içi konumu ve son zamanlarda moleküler dizi bilgileri kullanılarak,

memelilerde  $\alpha$ -CA izoformları tanımlanmış ve bu izoformlar arasındaki evrimsel ilişki araştırılmıştır (Uygun 2012).

Enzimin izoenzimleri yapı ve görevlerine göre sınıflandırılmıştır. CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonları Şekil 1.2’de şematik olarak gösterildiği üzere (Leppilampi 2006) bu izoenzimlerin beş tanesinin sitozolde (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII), beş tanesinin membrana bağlı (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV), iki tanesinin mitokondriyal (CA VA ve CA VB), bir tanesinin salgısal (CA VI) ve üç tanesinin de nonkatalitik (CA VIII, CA X ve CA XI) olduğu görülmektedir. Bunların haricinde NonO/p54<sup>nrb</sup> çekirdekte yer alan ve klasik olmayan bir izoenzimdir (Şekil 1.2.) (Supuran *et al.* 2003; Beydemir and Gülçin 2004; Göçer *et al.* 2015).



**Şekil 1.2.** CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi

Üç izoform; CA VIII, CA X ve CA XI, katalitik mekanizmanın merkezindeki çinko iyonu ile koordine olan üç histidin biriminin biri veya daha fazlasının süstitusyonu nedeni ile katalitik aktiviteden yoksundur. Bu izoformlar CA-İlgili proteinler (CARP) olarak adlandırılır ve tümü de beyinde (CA VIII diğer dokularda) eksprese edilir fakat fonksiyonları bilinmemektedir. Diğer memeli izoenzimleri katalitik aktivite gösterirler ve hücre içi konumlarına göre iki geniş grup altında sınıflandırılırlar. Bu izoformların çoğu çeşitli dokularda ifade edilirler (Uygun 2012).

**Çizelge 1.1.**  $\alpha$ -CA süper familyasının dağılım gösterdiği organ/doku, subselüler lokalizasyonu, katalitik aktivitesi ve sülfonamidlere olan ilgisi (Scozzafava and Supuran 2002)

$\alpha$ -CA İzoenzimi	Bulunduğu Organ/Doku	Katalitik Aktivitesi	Sülfonamidlere İlgisi
CA I	Eritrosit, sindirim sistemi ve göz	Düşük	Orta
CA II	Böbrek, eritrosit, testis, sindirim sistemi, beyin, göz, osteoklast ve akciğer	Yüksek	Çok Yüksek
CA III	Yağ doku ve iskelet kası	Çok düşük	Çok Düşük
CA IV	Kalp kası, böbrek, beyin kılcalları, akciğer, kalın bağırsak ve göz	Orta	Yüksek
CA VA	Karaciğer	Düşük	Yüksek
CA VB	Omurilik, kalp kası, pankreas, iskelet kası, sindirim sistemi ve böbrek	Yüksek	Yüksek
CA VI	Süt bezi ve tükürük bezi	Düşük	-
CA VII	Sinir sistemi	Yüksek	Çok Yüksek
CA VIII	Sinir sistemi	Nonkatalitik	-
CA IX	Bağırsak mukozası ve tümörler	Yüksek	Yüksek
CA X	Sinir sistemi	Nonkatalitik	-
CA XI	Sinir sistemi	Nonkatalitik	-
CA XII	Göz, böbrek, epitel doku, tümörler ve ince bağırsak	Düşük	Bilinmiyor
CA XIII	Üreme yolu, akciğer, böbrek, sindirim kanalı ve beyin	Düşük	Bilinmiyor
CA XIV	Göz, böbrek, karaciğer ve beyin	Düşük	Bilinmiyor

Yeşil bitkiler, fotosentetik hücre kloroplastları vasıtasıyla, gün ışığı varlığında fotosentez yapabilmek için atmosferden karbondioksit kullanılır. Gaz halindeki karbondioksit, bitkinin yapraklarında bikarbonat iyonları halinde taşınır. Hem kara hem de su bitkilerindeki CA enzimi, bikarbonat iyonlarının tekrar karbondioksit dönüşmesini sağlamaktadır. CA'nın katalizlediği CO<sub>2</sub> hidrasyonu dışındaki reaksiyonların (Çizelge 1.2) nasıl bir fizyolojik öneme sahip olduğu açık değildir. Bu sebeple, sadece 1 nolu reaksiyonun bu enzimi ilgilendiren fizyolojik öneme sahip olduğu ele alınabilir (Supuran and Scozzafava 2007). Karbondioksitin bikarbonata dönüşümlü hidrasyonu (Çizelge 1.2'de reaksiyon 1) olan fizyolojik reaksiyonuna ek olarak CA'lar birçok başka

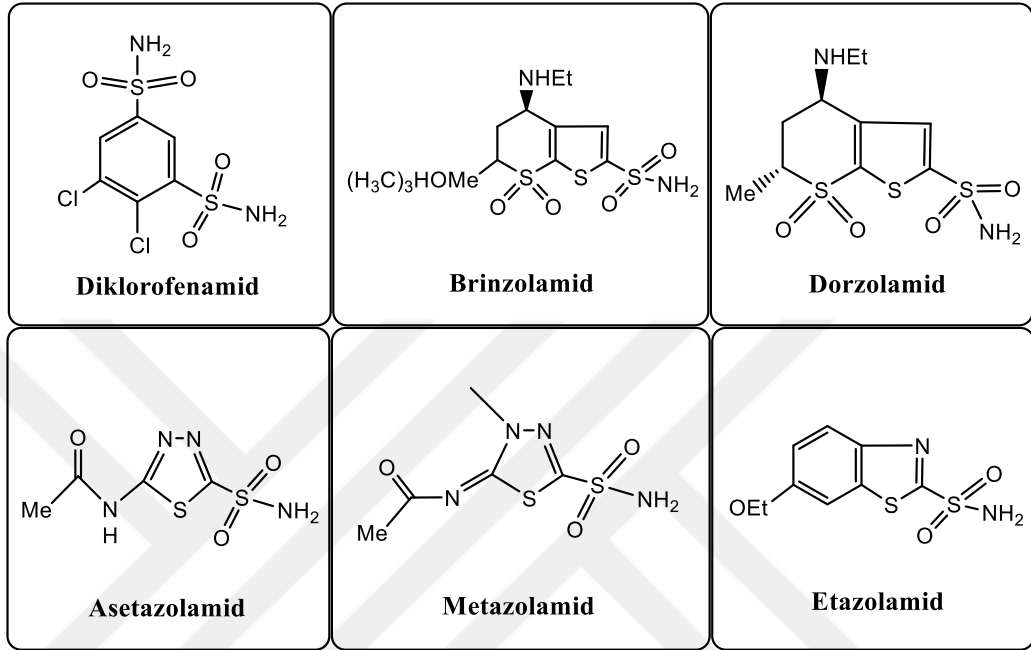
reaksiyonu da katalizler. Siyanatın karbamik aside (reaksiyon 2) veya siyanamidin üreye (reaksiyon 3) hidrasyonu, gem-diollere aldehit hidrasyonu (reaksiyon 4), karboksilik (reaksiyon 5) ve sülfonik (reaksiyon 6) esterlerin hidrolizi ve daha az incelenen hidrolitik reaksiyonlar (reaksiyon 7-9) CA'nın katalizlediği reaksiyonlardır (Supuran *et al.* 2004).

**Çizelge 1.2.**  $\alpha$ -CA tarafından katalizlenen reaksiyon

Reaksiyon	Reaksiyon Tipi
1	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3 + H^+$
2	$O=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
3	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
4	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
5	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCHOOH + ArOH$
6	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
7	$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$ (Ar = 2,4-dinitrofenil)
8	$PhCH_2OCOCl + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
9	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$ (R = Me; Ph)

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri, aromatik veya heteroaromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler  $-SO_2NH_2$  fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerdir. Karbonik anhidrazı'nın güçlü inhibitörlerinden biri olan asetazolamid, günümüzde halen glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır. Oral yoldan kullanımı mevcut olan bu ilacın fazla oranda yan etkileri bulunmaktadır. Daha az yan etkisi olan ancak etki mekanizması daha kuvvetli bir ilaç molekülü elde etme amacıyla birçok sülfonamid türevi madde sentezlenerek, göz epitelyumunda da bulunan CA II izoenzimi üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmış ve bu maddelerin enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir (Supuran and Scozzafava 2001; Bülbül *et al.* 2002). Sülfonamidler diüretik, antibakteriyel ve antifungal ilaç olarak günümüzde yaygın bir kullanım alanına sahiptirler. Bu sebeple dünyanın birçok yerinde değişik laboratuvarlarda farklı çalışma grupları tarafından yeni sülfonamid türevleri sentezlenmektedir. CA IX ile kanser dokularının doğrudan ilişkisi olduğu için sülfonamidler kanser teşhisinde de

kullanılabilmektedir. Ayrıca antiobezite, antifungal, antibakteriyel ve diüretik ilaç olarak da CA enzimi inhibitörü olan sülfonamidler kullanılabilmektedir (Supuran *et al.* 2003).



**Şekil 1.3.** Bazı önemli sülfonamid türevleri

Sülfamatlar  $-OSO_2NH_2$  fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerdir. Önceleri sülfonamidler sınıfına dâhil edilen bu bileşikler daha sonra ayrı bir alt grup olarak adlandırılmıştır. Sülfamatlar günümüzde karbonik anhidraz inhibitörü olmalarının yanı sıra antibiyotik, antiviral ve antikanser ajanıdır. Sülfamatlar hiperlipidemi ve ateroskleroz tedavisinde de kullanılmaktadır. Sülfamik asitler, karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri olan en basit yapıları sülfamatlardır. Sonraki çalışmalarda çeşitli aromatik-sülfamat türevleri sentezlenerek karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir (Ahmed *et al.* 2001; Abbate *et al.* 2002).

Tanımlanan hCA izoenzimlerinin araştırmalar sonucunda birçok hastalıkla ilişkisi olduğu görülmüş ve bunlardan CA X ve XI dışında literatür bilgisine rastlanmamıştır.

**Çizelge 1.3.** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalizlemesindeki aksaklıkların sebep olduğu hastalıklar ve bu izoenzimlerin birbirleriyle olan ilişkisi (Alterio *et al.* 2012)

<b>İzoenzimler</b>	<b>İlişkili Olduğu Hastalık</b>
<b>CA I</b>	Retinal ve beyin ödemi
<b>CA II</b>	Glukoma Ödem Epilepsi Mide bulantısı
<b>CA III</b>	Oksidatif stres
<b>CA IV</b>	Glukoma Retinitis Pigmentosa Felç
<b>CA VA/VB</b>	Obezite
<b>CA VI</b>	Karsinogenez
<b>CA VII</b>	Epilepsi
<b>CA VIII</b>	Nörodejenerasyonu Kanser
<b>CA IX</b>	Kanser
<b>CA XII</b>	Kanser Glukoma
<b>CA XIII</b>	Kısırlık
<b>CA XIV</b>	Epilepsi Retinopati

### 1.2.1. Karbonik Anhidraz VII İzoenzimi

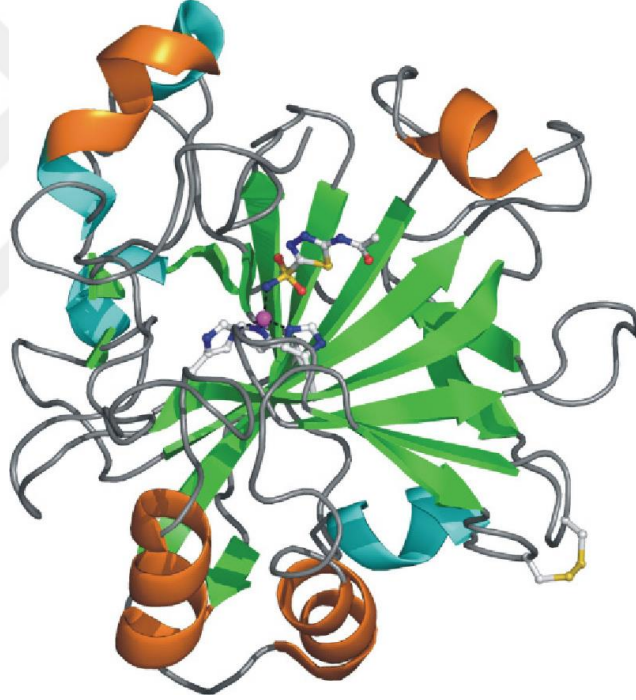
Karbonik anhidraz VII (CA VII), karbonik anhidraz ailesinin en az araştırılan sitozolik izoformlardan biridir. İlk olarak 1991'de bir insan genomik kütüphanesinden izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmış olup, diğer sitozolik CA'ların lokusu olan 8q21 yerine 16q22 üzerinde bulunduğu keşfedilmiştir. 10 kb uzunluğundadır, 7 ekson ve 6 intron içermektedir. İnsan CA II'ye benzer şekilde, insan CA VII karbondioksit hidrasyonu için katalizör olarak çok yüksek etki göstermektedir. Bununla birlikte, insan dokularında yaygın olarak bulunan CA II 'nin aksine, CA VII daha sınırlı bir dağılıma sahiptir (Monti *et al.* 2015).

CA VII geninin amino asit dizisi, sırasıyla hCA I, hCA II ve hCA III ile %50, %56 ve %49 benzerlik gösteren 263 amino asitten oluşur. CA VII beyinde yüksek oranda eksprese olmaktadır (Vullo *et al.* 2005). CA VII, Montgomery ve arkadaşları tarafından 1991 yılında ilk kez keşfedilmesine rağmen tamamen karakterize edilememiştir. CA VII mRNA'sı insan tükürük bezinde, sıçan ve fare akciğerinde beyin nöronlarında tespit edilmiştir (Gönül 2013).

Diğer tüm sitozolik CA izoformlarının aksine, hCA VII aktifleştirilmiş p-nitrofenil esterleri ile esteraz ve fosfataz olarak büyük ölçüde etkilidir (Truppo *et al.* 2012). Karbonik anhidraz izoenzimi olan hCA VII, oksidatif stres savunma proseslerinde rol almakta ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna müdahale etmektedir (Angeli *et al.* 2018).

hCA VII, karbondioksit hidrasyon reaksiyonu için katalizör olarak  $8,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'lik bir  $k_{\text{cat}} / K_M$  değeri ile çok yüksek bir etki göstermektedir (Supuran 2008; Di Fiore 2010). 2010 yılında Di Fiore ve arkadaşları tarafından çözülmüş olan hCA VII izoenziminin kristalografik yapısı katalitik aktivitedeki aktif rezüdülerin rolünü açıklığa kavuşturmaya büyük ölçüde yardım etmiştir.

hCA VII ve hCA III birçok benzerlik göstermektedir. Özellikle her iki enzim de sitozoliktir ve iskelet kası, karaciğer ve beyin gibi yüksek oksijen tüketim oranına sahip dokularda lokalizedirler. Dahası, diğer sitozolik CA izoformlarına kıyasla, her iki enzim çok sayıda sistein içermektedir. hCA III, beş tane sistein ve hCA VII dört tane sistein bulundururken, diğerleri (hCA I, hCA II ve hCA XIII) sadece bir tane sistein bulundurur. Ayrıca, hCA III için glutatyonile olduğu bildirilen sisteinlerden biri olan Cys 183, hCA VII'de de muhafaza edilmiştir. Bütün bu hususlar, *in vivo* olarak hCA VII için gözlemlenen S-glutatyonylasyon ile ilgili izoform hCA III için gözlenen durumda olduğu gibi *in vivo* da mevcut olabileceğini kuvvetle göstermektedir (Truppo *et al.* 2012).



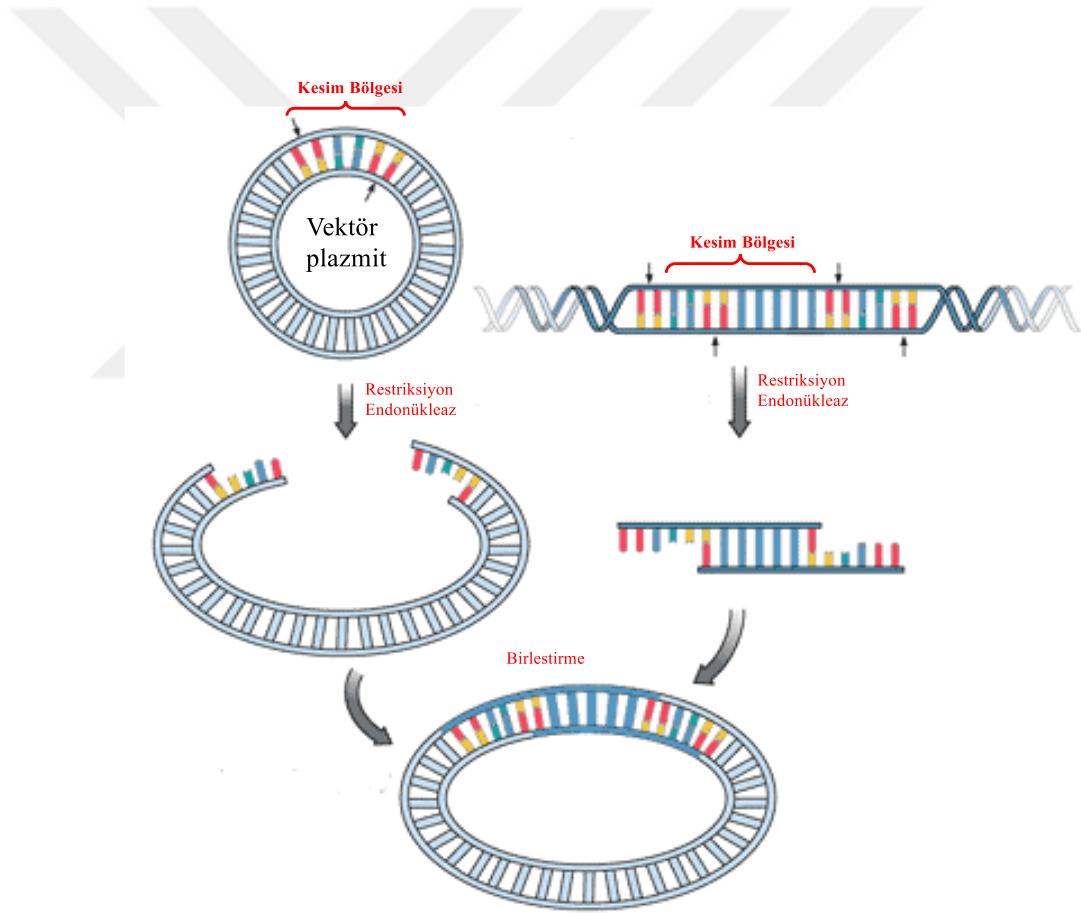
**Şekil 1.4.** hCA VII yapısının şerit diyagramı (Ugochukwu *et al.* 2010).

### 1.3. Rekombinant DNA Teknolojisi

Doğada kendiliğinden oluşması mümkün olmayan, çoğunlukla farklı biyolojik türlerden elde edilen DNA moleküllerinin, genetik mühendislik teknikleri ile kesilmesi ve buradan elde edilen farklı DNA parçalarının birleştirilmesi işlemlerini kapsayan teknolojiye 'rekombinant DNA teknolojisi' denir. Böylece üretilen bu yeni DNA parçasına



“rekombinant DNA (rDNA)” denir. Moleküler biyolojinin gelişmesini sağlayan bilgi birikimi, 1940’lardan 1970’lere kadar rekombinant DNA teknolojisini temelini oluşturmuştur. Werner Arber, Daniel Nathans ve Hamilton Smith’in 1970 yılında DNA’yı kesen restriksiyon endonükleaz enzimlerini keşfetmeleri rekombinant DNA teknolojisini gelişimine öncülük etmiştir. O zamandan beri rekombinant DNA teknolojisi olarak da adlandırılan gen mühendisliği teknikleri önemli proteinlerin yabancı konakçıda üretimi için güçlü bir araç olmuş, biyoteknoloji biliminde köklü bir değişime yol açmıştır. Önem kazanan rekombinant proteinler ise bu tekniklerin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Erdoğan 2016).



**Şekil 1.5.** Restriksiyon nükleazlar kullanılarak rekombinat DNA oluşumu

Bir genomdaki binlerce ya da milyonlarca gen içerisinde sadece tek bir genin ayrıştırılması, tanımlanması ve mevcut gen parçasının klonlanmış DNA parçası olarak büyük miktarlarda üretilmesi, rekombinant DNA teknolojisi sayesinde

gerçekleşmektedir. Bu ürün daha sonraki araştırmalarda tıpta ya da endüstride kullanılmak üzere ayrıştırılıp saflaştırılabilmektedir (Erdoğan 2016).

#### **1.4. Prokaryotlarda Rekombinant Protein Ekspresyon Sistemleri**

Rekombinant proteinlerin ekspresyonu için prokaryotik ve ökaryotik ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. İlk tercih edilen sistem prokaryotik ekspresyon sistemleridir. Çünkü bu sistem ekspresyonun daha ucuz ve ekonomik olmasını sağlamaktadır. Ancak eksprese edilen proteinin kompleks post-translasyonel modifikasyonları gerekli değilse prokaryot ekspresyon sistemleri kullanılır. Prokaryotik ekspresyon sistemleri arasında en yaygın olarak *E. coli* ve *B. subtilis* ekspresyon sistemleri yer almaktadır. İlk olarak Itakura ve arkadaşları (1977) tarafından bir memeli peptid hormonu olan somatostatinin *E.coli*'de eksprese edilmesiyle yabancı bir genin prokaryotik hücrelerde rekombinant olarak üretilebileceği anlaşılmıştır. Günümüzde gram (-) bir bakteri olan *E.coli*, rekombinant proteinlerin üretiminde sıklıkla tercih edilmektedir. Bunun nedeni üretiminin ekonomik olması, hızlı bir şekilde çoğalabilmesi ve genetiğinin iyi aydınlatılmış olmasıdır (Yin *et al.* 2007).

#### **1.5. SUMO Protein Ekspresyon Sistemi**

Füzyon taglar, rekombinant proteinin ya N-terminal ya da C-terminal ucunda bulunarak proteinin çözünürlüğünü artırır. Glutasyon S-transferaz (GST), tioredoksin, maltoz bağlayıcı protein (MBP), small ubiquitin-modifier (SUMO) gibi füzyon taglar rekombinant proteinin çözünürlüğünü artırmaktadır. Hem GST hem de MBP afinite saflaştırma materyali olması bakımından artı bir özelliğe sahiplerdir. Rekombinant proteinlerin çözünürlüğünü artırmak için birden fazla füzyon tag kullanılabilir. Füzyon taglar, rekombinant proteinden birkaç yöntemle uzaklaştırılabilir. En çok kullanılan yöntem proteazlarla spesifik kesim bölgelerinden rekombinant proteinin kesilmesi işlemidir. Bazı durumlarda füzyon tag proteinden uzaklaştırıldığı zaman rekombinant protein çözünmez hale gelebilmektedir (Waugh 2005).

SUMO (Small ubiquitin-like modifier), memeli SUMO 1 proteini ile homoloji gösteren, 11 kDa molekül kütlesine sahip, *Saccharomyces cerevisiae* Smt3 proteinidir (Saitoh *et al.* 1997). SUMO olarak adlandırılan Smt3 proteini; apoptosis, nükleer transport ve hücre döngüsü gibi bazı hücresel prosesleri düzenleyen ubiquitin benzeri protein ailesinin bir üyesidir (Muller *et al.* 2001).

Ubikuitin gibi SUMO, hedef proteinin lisin yan zincirine kovalent olarak bağlanır. Ubikuitin modifikasyonunun aksine SUMO modifikasyonu protein degradasyonunu önleyerek proteinin fonksiyon ve aktivitesinde değişikliklere neden olur. Rekombinant proteinin ekspresyonunu ve çözünürlüğünü artırabilir. Aynı zamanda SUMO füzyon tag, SUMO proteazla tanıma bölgelerinden kesilerek rekombinant proteinden uzaklaştırılabilir (Lee *et al.* 2008).

Rekombinant DNA teknolojisinde yaygın olarak kullanılan plazmitler, DNA klonlama işlemi sırasında vektör olarak kullanımı için temelde üç bölgeye sahip olacak şekilde tasarlanır. Bu bölgeler; replikasyon orijini, seçim için marker gen (ilaç direnç geni) ve eksojenik DNA fragmentlerinin insört edilebileceği bölgelerdir.

The Champion™ pET SUMO protein ekspresyon sistemi *E. coli*'de doğal proteinlerin ekspresyon ve ifadesine izin veren küçük ubiquitin benzeri bir modifiye edici (SUMO; small ubiquitin-like modifier) kullanmaktadır. SUMO füzyonları, rekombinant proteinlerin ekspresyonunu ve çözünürlüğünü arttırabilir bir özelliكتedir.

Klonlama ve ekspresyon vektörü olan pET SUMO önemli özelliklere sahip bir vektördür. Vektör Şekil 1.6'da verilmiştir. Vektörün sahip olduğu bölgelerin özellikleri şu şekildedir;

**a. T7 promotörü:** Bu bölge, IPTG ile indüklendiğinde yüksek oranda ekspresyon kapasitesine ulaşmaktadır.

**b. lac operatörü (lacO):** Rekombinant proteinin bazal ekspresyonunu azaltan lac represörünün bağlanma bölgesidir.

**c. Ribozom bağlanma bölgesi (RBS):** PCR ürününün etkili translasyonunu sağlayan bölgedir.

**d. N-Terminal polihistidin (6xHis) kuyruğu:** Rekombinant proteinin kolay bir şekilde saflaştırılmasını ve Anti-HisG antikoru ile tespit edilmesini sağlayan bölgedir.

**e. SUMO ORF:** Rekombinant proteinin çözünürlüğünü ve ekspresyonunu artırır. Ayrıca SUMO proteaz kullanılarak doğal ürünün elde edilmesine olanak sağlar.

**f. TA Klonlama sitesi:** Bu bölge ile amplifiye edilen ve adenin kuyruğu içeren PCR ürünü etkili bir şekilde klonlanabilir.

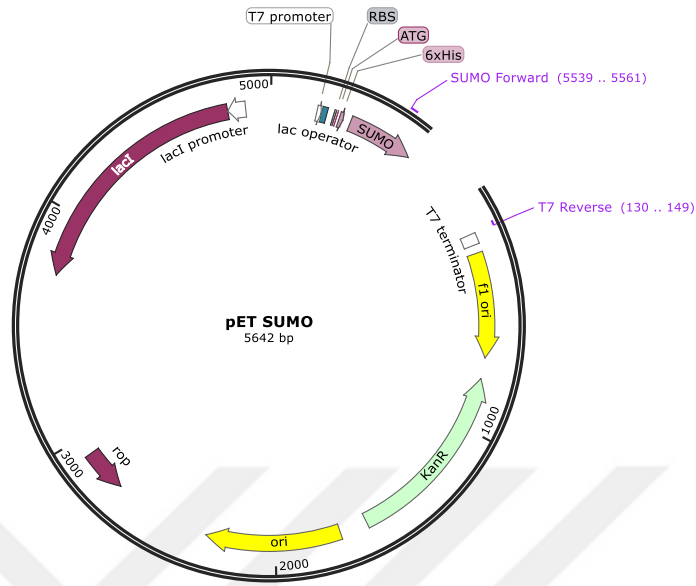
**g. T7 Transkripsiyon sonlanma bölgesi:** Transkripsiyonun etkili bir şekilde sonlanmasını sağlar.

**h. Kanamisin direnç bölgesi:** Antibiyotik direncinden sorumlu olan bu bölge tüm vektörlerde olduğu gibi hedef geni alan konak hücrenin seçilebilirliğine imkan sağlar.

**i. pBR322 Replikasyon orijini:** *E.coli* içerisinde kopyalama ve onarım faaliyetlerinden sorumludur.

**j. ROP ORF:** Düşük kopya sayılı replikasyon için pBR322 replikasyon orijini ile ilişkili bölgedir.

**k. lacI ORF:** İlgili genin transkripsiyonunu baskılamak için T7lac promotörüne bağlanan represörü kodlayan bölgedir.



Şekil 1.6. pET SUMO vektör haritası

```

121 ATAGGCGCCA GCAACCGCAC CTGTGGCGCC GGTGATGCCG GCCACGATGC GTCCGGCGTA GAGGATCGAG ATCTCGATCC
201 CGCGAAATTA ATACGACTCA CTATAGGGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT CCCTCTAGA AATAATTTTG TTTAACTTTA
281 AGAAGGAGAT ATACAT ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAC GGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC
    Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
354 GCT AGC ATG TCG GAC TCA GAA GTC AAT CAA GAA GCT AAG CCA GAG GTC AAG CCA GAA GTC AAG CCT GAG ACT
    Ala Ser Met Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr
426 CAC ATC AAT TTA AAG GTG TCC GAT GGA TCT TCA GAG ATC TTC TTC AAG ATC AAA AAG ACC ACT CCT TTA AGA
    His Ile Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Lys Thr Thr Pro Leu Arg
498 AGG CTG ATG GAA GCG TTC GCT AAA AGA CAG GGT AAG GAA ATG GAC TCC TTA AGA TTC TTG TAC GAC GGT ATT
    Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile
570 AGA ATT CAA GCT GAT CAG ACC CCT GAA GAT TTG GAC ATG GAG GAT AAC GAT ATT ATT GAG GCT CAC AGA GAA
    Arg Ile Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile Ile Glu Ala His Arg Glu
642 CAG ATT GGT GGT PCR product A GACAAG CTTAGGTATT TATTCGGCGC AAAGTGCCTC GGGTGATGCT
    GTC TAA CCA CCA PCR product TCTGTTC GAATCCATAA
    Gln Ile Gly Gly
701 GCCAACTTAG TCGAGCACCA CCACCACCAC CACTGAGATC CGGCTGCTAA CAAAGCCCGA AAGGAAGCTG AGTTGGCTGC
781 TGCCACCGCT GAGCAATAAC TAGCATAACC

```

Şekil 1.7. pET SUMO vektörüne ait TA klonlama kısmı (Champion™ pET SUMO Protein Ekspresyon kiti, 2010).

## 1.6. Blotlama

Elektriksel bir ortamda nükleik asitlerin (DNA ve RNA) veya proteinlerin jel üzerinde göç ettirilerek molekül büyüklüklerine göre fraksiyonlarına ayrılması ve sonrasında bu fraksiyonların bir destek tabakaya aktarıldıktan sonra nükleik asit veya proteinin kalitatif/kantitatif miktarının belirlenmesi tekniğine 'blotlama' denilmektedir.

Blotlama yöntemi kullanılarak 3 çeşit analiz yapılmaktadır. DNA analizi 'Southern Blot' tekniği kullanılarak, RNA analiz 'Northern Blot' tekniği kullanılarak ve protein analizi ise 'Western Blot' tekniği kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Western blot ile proteinler SDS-PAGE ile (-) yüklenir ve proteinler arasındaki yük farkı ortadan kalkar. Western blot tekniği, proteinlerin SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre jel üzerinde (-) kutuptan (+) kutuba göç ettirilip, birbirinden ayrıldıktan sonra bu durumu takip eden 4 basamak sonunda tamamlanır.

**1. Blotlama basamağı:** SDS-PAGE ile jelde molekül büyüklüğüne göre fragmentlere ayrılmış proteinler, elektriksel alanda bir membrana transfer edilir.

**2. Bloklama basamağı:** Membran üzerinde protein bulunmayan boş bölgelerin proteinlere karşı ilgisi engellenir.

**3. Antikorlarla inkibasyon basamağı:** Protein karışımında ilgilenilen proteine spesifik antikor ile proteinlerin transfer edildiği membran inkübe edilir.

**4. Görüntüleme basamağı:** Antikorla hibridizasyon sonrası membrandaki proteinlerin sahip olduğu moleküler ağırlık ve kısmi miktarının belirlenmesi için kemilüminesans, floresans, kolorimetrik veya radyoaktif yöntemlerden birisi kullanılır (Erdoğan vd 2016).

## 1.7. Antibiyotikler

Antibiyotikler, bakteriyal enfeksiyonun tedavisinde veya önlenmesinde kullanılmaktadır. Neredeyse tüm antibiyotik sınıfları çevresel mikroorganizmalarda doğal olarak bulunan

antibiyotiklerin yapısında olmasına rağmen yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğusu bu doğal yapıların sentetik türevlerindedir. Penisilin tıpta 1942'de kullanılmasından bu yana, yüzlerce antibiyotik izole edilerek veya sentezlenerek insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır ve günümüzde de kullanılmaktadır (Qiao *et al.* 2018).

20. yüzyıldan beri hızla gelişen ve ilerleyen teknoloji ile antibiyotikler daha da büyük önem kazanmıştır. Bu doğrultuda antibiyotikler, modern tarım ve hayvancılık endüstrilerinde de değişikliğe neden olmuştur. Enfeksiyon tedavisinde ve sağlıklı hayvancılıkta yem verimliliğini artırmada da antibiyotikler kullanılmıştır. Antibiyotiklerin aşırı, gereksiz ve kötüye kullanımı, antibiyotiklere dirençli bakterilerin ve antibiyotiklere dirençli genlerin hızlı bir şekilde ortaya çıkmasına sebebiyet vermiştir. (Qiao *et al.* 2018).

Tüm bakterilerde üç çoğalma devresi bulunmaktadır. Bunlar; yavaş gelişme evresi, hızlı gelişme evresi ve dinlenme evresidir. Antibiyotikler, bakterilerin hızlı gelişme evresi ve yavaş gelişme evresinde etkilerini göstermektedirler. Bakterilerin öldürülmesi etkisi 'bakterisid etki' olarak, bakterilerin gelişimi ile üremesinin durdurulması etkisi ise 'bakteriostatik etki' olarak tanımlanmaktadır. Bakterisid etkiye sahip olan antibiyotik gruplarına penisilinler, aminoglikozidler, sefalosporinler, vankomisin, florokinolonlar ve basitrasin örnek verilirken, bakteriostatik etkiye sahip olanlara ise tetrasiklinler, makrolidler ve sülfonamidler örnek olarak verilebilir (Anonim 2018).

Bunun dışında antibiyotikler, etki spektrumlarına göre de sınıflandırılırlar. Bunlar dar spektrumlu antibiyotikler ve geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Dar spektrumlu antibiyotikler sınıfında; doğal penisilinler, izoniazid, nistatin ile polimiksin ve sentetik ile semisentetik penisilinler bulunurken, geniş spektrumlu antibiyotikler sınıfında ise tetrasiklinler ve sülfonamidler yer almaktadır (Anonim 2018).

Antibiyotikler etkilerini değişik şekillerde göstermektedirler. Bir bakteri hücresi üzerinde etkilerini hücre duvarı sentezini engelleyerek, sitoplazmik zarın geçirgenliğini bozarak,

nükleik asit sentezini engelleyerek, ara metabolizmayı bozarak ve protein sentezini engelleyerek gösterirler (Anonim 2018).

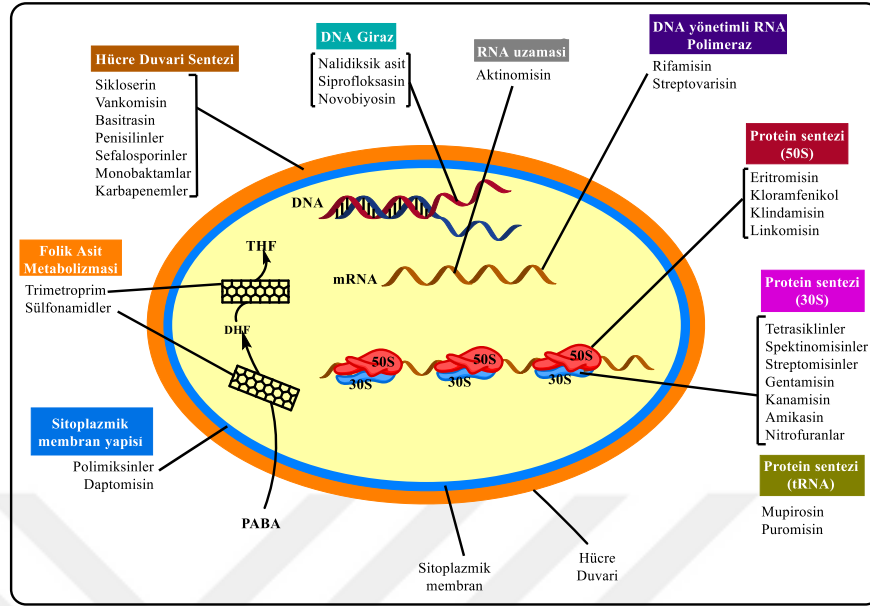
Hücre duvarının sentezini engelleyerek etki gösteren antibiyotikler, penisilin, sefalosporin ve basitrasin grubu antibiyotiklerdir. Bu antibiyotikler bakteri çeperi için gerekli olan mukopeptid sentezini inhibe ederek etki gösterirler (Anonim 2018).

Bakteri membranında permeabilite değişikliğe ve yıkımlara sebep olarak antibakteriyel etki gösterenler, polipeptidler (polimiksin, kolistin), basitrasin, antiseptik ve dezenfektanlardır (Anonim 2018).

Sülfonamidler, trimetoprim, sülfonlar, paminosalisalik asit, kinolonlar ve izoniazidler ara metabolizmanın bozulmasına neden olurlar. Bu yapıda olan antibiyotikler bakteriler için gerekli bazı maddelerin (folik asit gibi) sentezini engellerler (Anonim 2018).

Bazı antibiyotikler bakterilerde ribozomlarla birleşerek mRNA ile yönetilen protein sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Memeli hücrelerinin ribozomları 80S, bakteri hücrelerinininki ise 70S özelliktedirler. Bundan dolayı memelilerde protein sentezini engellemezler. Bu grupta bulunan antibiyotikler tetrasiklinler, makrolidler, aminoglikozidler ve linkozamidler grubu antibiyotikleridir (Anonim 2018).





**Şekil 1.8.** Başlıca antimikrobiyal ajanların hedefleri

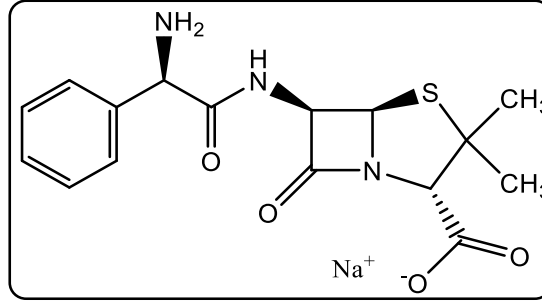
(\*PABA: *p*-aminobenzoik asit, THF:Tetrahidrofolat, DHF:Dihidrofolat, mRNA:Haberici RNA)

## 1.8. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Antibiyotikler

Rekombinant hCA VII enzimi üzerine etkileri incelenen antibiyotiklerin özellikleri ve yapısal formülleri şöyledir:

### 1.8.1. Ampisilin sodyum

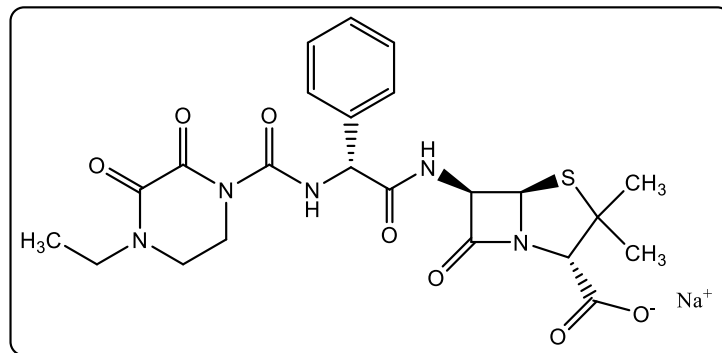
Geniş spektrumlu bir antibiyotik olan ampisilin penisilin yarı sentetik bir türevidir. Kimyasal formülü  $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 371,387 g/mol'dür. Ampisilin, bakteri hücre duvarının içinde bulunan spesifik penisilin bağlama proteinlerine (PBP'lere) bağlanıp bakterilerinin hücre duvarları sentezinin üçüncü safhası olan son aşamasını inhibe eder. Ampisilin, penisilin olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Yapısında üç adet halkalı yapı bulunmaktadır. Molekül yapısı olarak aromatik organoheterosiklik bir bileşiktir. Bu bileşik yapısal olarak 2. pozisyonda iki metil grubu taşıyan bir penam halkası ve 6. pozisyonda bir amid grubu ile karakterize edilen penisilin çekirdek yapısı bulundurmaktadır (Anonymous 2018).



**Şekil 1.9.** Ampisilin sodyum molekülünün açık formülü

### 1.8.2. Piperasilin sodyum

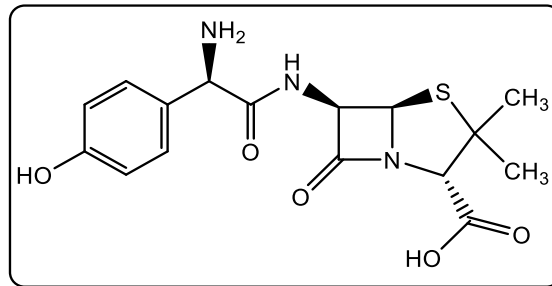
Yarı sentetik, geniş spektrumlu, ampisilin türevli üreidopeniklin antibiyotik türüdür. Kimyasal formülü  $C_{23}H_{26}N_5NaO_7S$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 539,537 g/mol'dür. Polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Piperasilin, bakteri hücre duvarının içinde bulunan spesifik penisilin bağlama proteinlerine (PBP'lere) bağlanıp bakterilerin hücre duvarları sentezinin üçüncü safhası olan son aşamasını inhibe eder. Yapısında dört adet halkalı yapı bulunmaktadır. Bu bileşik, peptitler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, birinin karbonil karbonundan bir, diğerinin azot atomuna bir kovalent bağ oluşturularak iki veya daha fazla amino karboksilik asit molekülünden (aynı veya farklı) elde edilen bir amid içeren bileşiklerdir. Molekül yapısı olarak karboksilik asit ve türevleri sınıfının bileşiklerindedir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.10.** Piperasilin sodyum molekülünün açık formülü

### 1.8.3. Amoksisilin

Ampisilin'e benzer yapıdaki geniş spektrumlu bir yarı sentetik antibiyotiktir. Kimyasal formülü  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 365,404 g/mol, erime noktası  $194^{\circ}C$  ve suda çözünürlüğü 3430 mg/L'dir.  $\beta$ -laktamaz ile parçalanmaya duyarlıdır. Amoksisilin, bakteri hücre duvarında bulunan penisilin bağlama proteini 1A'ya (PBP-1A) bağlanır. Penisilinler, laktam halkasını açarak penisiline duyarlı transpeptidaz C-terminal domainini asilatlandırır. Transpeptidaz C enziminin inaktivasyonu, iki doğrusal peptidoglikan dizisinin bir çapraz bağının oluşmasını engeller ve bakterilerin hücre duvarları sentezinin üçüncü safhası olan son aşamasını inhibe eder. Amoksisilin, penisilinler olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Molekül yapısı olarak aromatik organoheterosiklik bir bileşiktir. Bu bileşik, yapısal olarak 2. pozisyonda iki metil grubu taşıyan bir penam halkası, benzen halkasına bağlı bir hidroksil grubu ve 6. pozisyonda bir amid grubu ile karakterize edilen penisilin çekirdek yapısı bulundurmaktadır (Anonymous 2018).

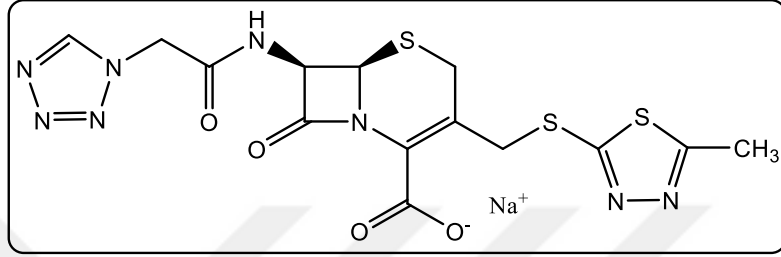


**Şekil 1.11.** Amoksisilin molekülünün açık formülü

### 1.8.4. Sefazolin sodyum

Bakteri hücre duvarı sentezinin engellenmesinden dolayı geniş spektrumlu antibiyotik etkisi olan yarı sentetik bir sefalosporin analogudur. Kimyasal formülü  $C_{14}H_{13}N_8NaO_4S_3$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 476,489 g/mol'dür. Yüksek serum seviyesine ulaşır ve idrar yoluyla hızla atılır. *In vitro* testler, sefalosporinlerin bakterisidal etkisinin hücre duvarı sentezinin inhibisyonundan kaynaklandığını ortaya koymaktadır. Bakteri hücre

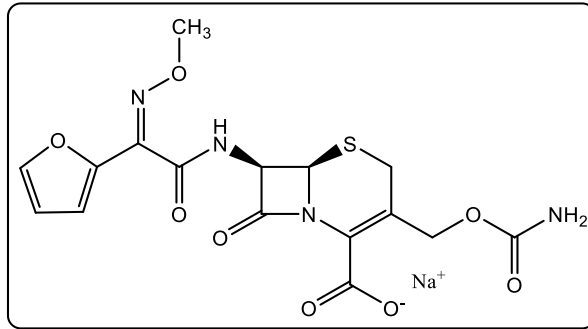
duvarının içinde bulunan spesifik penisilin bağlama proteinlerine (PBP'ler) bağlanıp bakterilerin hücre duvarları sentezinin üçüncü safhası olan son aşamasını inhibe eder. Bu bileşik, sefalosporinler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Molekül yapısı olarak aromatik organoheterosiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.12.** Sefazolin sodyum molekülünün açık formülü

### 1.8.5. Sefuroksim sodyum

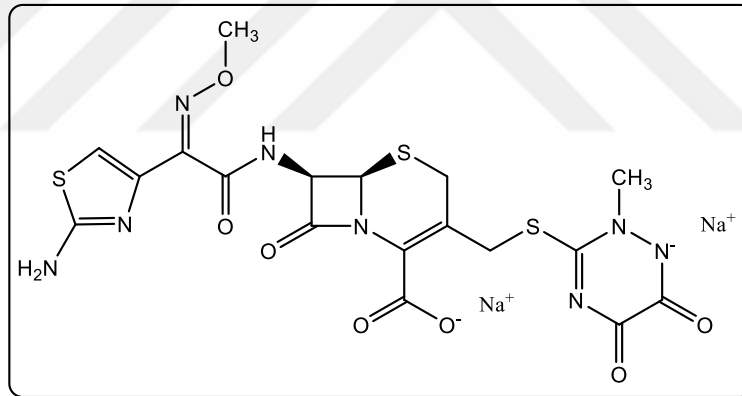
Sefuroksim  $\beta$ -laktamaza dirençli geniş spektrumlu sefalosporin antibiyotığıdır. Kimyasal formülü  $C_{16}H_{15}N_4NaO_8S$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 446,369 g/mol, erime noktası 218-225°C ve suda çözünürlüğü 145 mg/L'dir. Gram negatif ve gram pozitif organizmaların sebep olduğu enfeksiyonlar için önerilmiştir. Sefalosporin grubundan olan sefuroksim, penisilinler gibi bir  $\beta$ -laktam antibiyotiktir. Bakteri hücre duvarının içinde bulunan spesifik penisilin bağlama proteinlerine (PBP'ler) bağlanıp bakterilerin hücre duvarları sentezinin üçüncü safhası olan son aşamasını inhibe eder. Yapısında üç adet halka bulunduran aromatik heteropolisiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.13.** Sefuroksim sodyum molekülünün açık formülü

### 1.8.6. Seftriakson sodyum

Seftriakson bakterisidal aktivitesi olan, çok uzun yarılanma ömrüne sahip, geniş spektrumlu, sefalosporin grubuna ait bir  $\beta$ -laktam antibiyotığıdır. Kimyasal formülü  $C_{18}H_{16}N_8Na_2O_7S_3$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 598,53 g/mol ve erime noktası  $>155^\circ C$ 'dir. Seftriakson bakteri hücre duvarındaki mukopeptid sentezini inhibe ederek çalışır. Seftriaksonun  $\beta$ -laktam kısmı, bakteriyel sitoplazmik zar içindeki karboksipeptidazlara, endopeptidazlara ve transpeptidazlara (bu enzimler hücre duvarı sentezi ve hücre bölünmesiyle ilgili olan enzimlerdir) bağlanır. Seftriakson bu enzimlere bağlanarak hücre duvarlarının bozulmasına ve hücrenin parçalanmasına sebep olur. Yapısında dört adet halka bulunduran aromatik organoheterosiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).

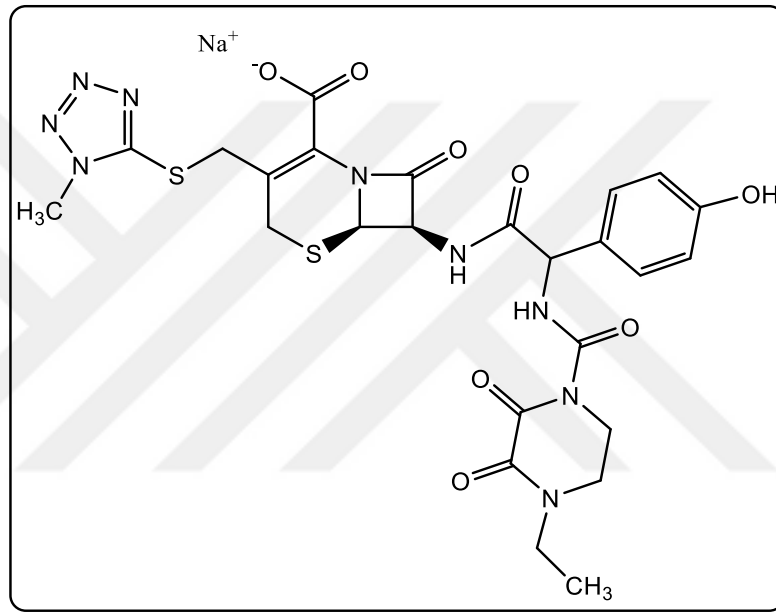


Şekil 1.14. Seftriakson sodyum molekülünün açık formülü

### 1.8.7. Sefoperazon sodyum

Sefoperazon  $\beta$ -laktamaza dirençli bir tetrazolil kısmı olan yarı sentetik geniş spektrumlu, bakterisidal aktiviteye sahip üçüncü jenerasyon sefalosporindir. Kimyasal formülü  $C_{25}H_{26}N_9NaO_8S_2$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 667,648 g/mol ve erime noktası  $188-190^\circ C$ 'dir. Tüm  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinde olduğu gibi, sefoperazon da bakteriyel hücre duvarının içinde bulunan spesifik penisilin bağlama proteinlerine (PBP'ler) bağlanır ve bakteri hücre duvar sentezinin üçüncü ve son aşamasının engellenmesine neden olur. Bu

bileşik, peptitler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, birinin karbonil karbondan başka birinin azot atomuyla bir kovalent bağ oluşturarak iki veya daha fazla amino karboksilik asit molekülünden (aynı veya farklı) elde edilen bir amid içeren bileşiklerdir. Bu bileşik organik asitlerin karboksilik asit ve türevleri sınıfındandır. Yapısında beş adet halkalı yapı bulunduran aromatik heteropolisiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).

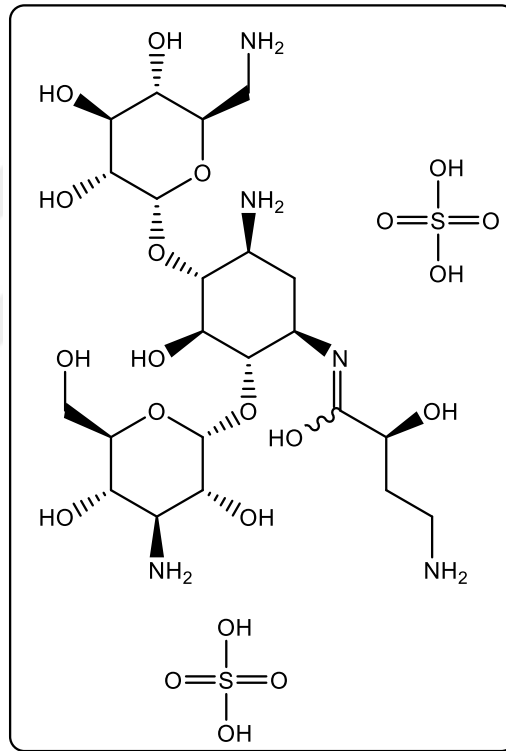


**Şekil 1.15.** Sefoperazon sodyum molekülünün açık formülü

### 1.8.8. Amikasin sülfat

Amikasin, kanamisin A'dan türetilmiş yarı sentetik bir aminoglikozid antibiyotiktir. Kimyasal formülü  $C_{22}H_{47}N_5O_{21}S_2$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 781,752 g/mol, erime noktası 203-204°C'dir. Diğer aminoglikozidlere benzer şekilde amikasin, duyarlı organizmaların 30S ribozomuna bağlanarak bakteriyel protein sentezini bozar. Bağlanma, işlevsel olmayan veya zehirli peptidlerin üretilmesine yol açan mRNA bağlanması ve tRNA alıcısı bölgeleri ile etkileşime girer. Amikasin, nefrotoksik ve ototoksiktir. Amikasin gibi aminoglikozitler, geri dönüşümsüz olarak spesifik 30S altbirim proteinlerine ve 16S rRNA'ya bağlanır. Amikasin, mRNA ile bir başlatma kompleksinin oluşumunu önlemek için 30S ribozomal alt-birime bağlanarak protein sentezini inhibe

eder. Özellikle amikasin, 16S rRNA'nın dört nükleotide ve S12 proteininin tek bir amino asidine bağlanır. Bu, 30S alt biriminin 16S rRNA'sındaki 1400 civarında nükleotidi bozar. Başlatma kompleksine müdahale, mRNA'nın yanlış okunması ve dolayısıyla da yanlış amino asitlerin polipeptide sokulması, işlevsiz veya toksik peptidlere ve polizomların işlevi olmayan monozomlara ayrılmasına yol açar. Yapısında üç adet halkalı yapı bulunduran alifatik heteromonosiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).

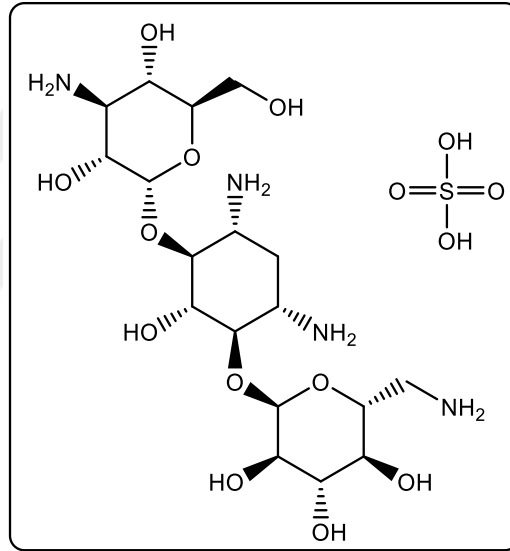


**Şekil 1.16.** Amikasin sülfat molekülünün açık formülü

### 1.8.9. Kanamisin sülfat

Kanamisin (kanamisin A olarak da bilinir), oral, intravenöz ve intramüsküler formlarda temin edilebilen ve çok çeşitli enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan bir aminoglikozid bakteri öldürücü antibiyotiktir. Kanamisin, *Streptomyces kanamyceticus* bakterisinden izole edilir ve en sık kullanılan formu kanamisin sülfattır. Kimyasal formülü  $C_{18}H_{38}N_4O_{15}S$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 582,575 g/mol'dür. Kanamisin gibi

aminoglikozidler geri dönüşümsüz olarak spesifik 30S altbirim proteinlerine ve 16S rRNA'ya bağlanır. Kanamisin, 16S rRNA'nın dört nükleotidine ve S12 proteininin tek bir amino asidine bağlanır. Bu, 30S alt biriminin 16S rRNA'sındaki 1400 civarında nükleotidi bozar. Başlatma kompleksine müdahale, mRNA'nın yanlış okunması ve dolayısıyla da yanlış amino asitlerin polipeptide sokulması, işlevsiz veya toksik peptidlere ve polizomların işlevi olmayan monozomlara ayrılmasına yol açar. Yapısında üç adet halkalı yapı bulunduran alifatik heteromonosiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).



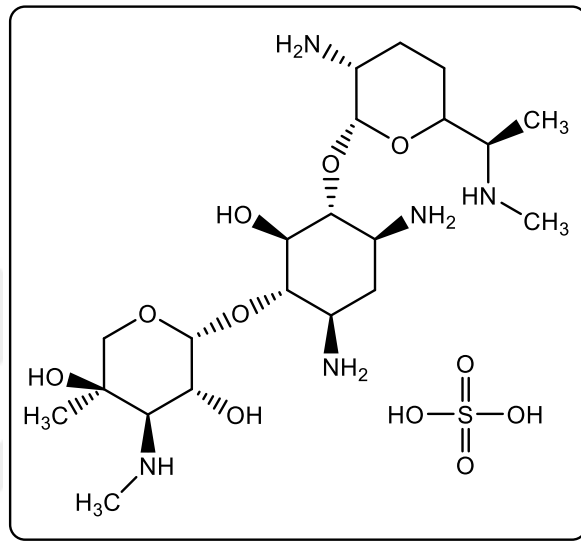
**Şekil 1.17.** Kanamisin sülfat molekülünün açık formülü

### 1.8.10. Gentamisin sülfat

Gentamisin aminoglikosit sülfatlarla yakından ilişkili geniş spektrumlu antibiyotiktir. Kimyasal formülü  $C_{21}H_{45}N_5O_{11}S$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 575,675 g/mol, erime noktası  $105^{\circ}C$  ve suda çözünürlüğü 100 mg/mL'dir. Gentamisin 16S rRNA'nın dört nükleotidine ve protein S12'nin tek bir amino asidine bağlanır. Bu, 30S alt biriminin 16S rRNA'sındaki 1400 civarında nükleotidin yapısını bozar. Bu başlatma kompleksinin yanlış olmasına ve dolayısıyla mRNA'nın hatalı okunmasına sebep olur. Dolayısıyla yanlış aminoasitler fonksiyonel olmayan veya toksik peptidlere yol açan polipeptide



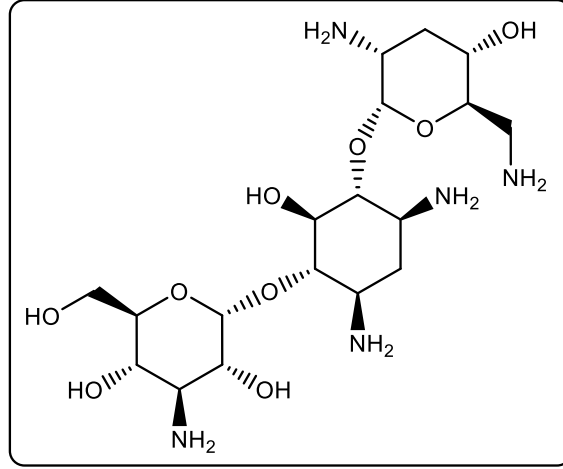
sokulur. Sonuç olarak gentamisin protein sentezini inhibe etmiş olur. Bu bileşik, aminosiklitol glikozitler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, bir karbohidrat parçasına glikozidik olarak bağlanmış bir amikosiklitol kısmı içeren organik bileşiklerdir. Yapısında üç adet halkalı yapı bulunduran alifatik heteromonosiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.18.** Gentamisin sülfat molekülünün açık formülü

### 1.8.11. Tobramisin

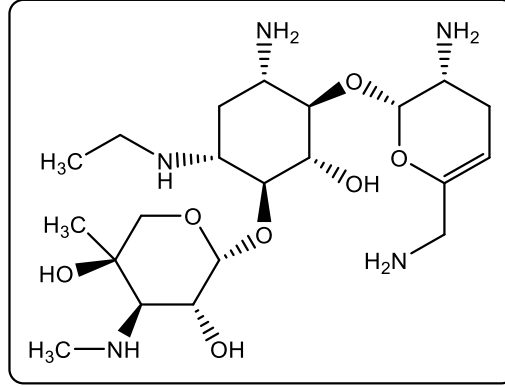
*Streptomyces tenebrarius* tarafından üretilen bir aminoglikozit olan geniş spektrumlu antibiyotiktir. Kimyasal formülü  $C_{18}H_{37}N_5O_9$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 467,5145 g/mol'dür. Gram negatif bakterilere özellikle de psödomonas türlerine karşı etkilidir. Aynı türden üretilen nebramisin olarak adlandırılan antibiyotik kompleksinin % 10'luk bir bileşenidir. Tobramisin, bakteriyel protein sentezini inhibe ederek 30S ribozomal altbirimindeki iki aminoglikozid bağlanma alanının birine geri dönüşümsüz bağlanır. Tobramisin ayrıca bakteri membranını 16S r-RNA'ya bağlayarak destabilize edebilir. Tobramisinin önemli hücre içi konsantrasyonunu elde etmek için bakterilerde aminoglikozid alımına yönelik bir aktif transport mekanizması gereklidir. Alifatik heteromonosiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.19.** Tobramisin molekülünün açık formülü

### 1.8.12. Netilmisin

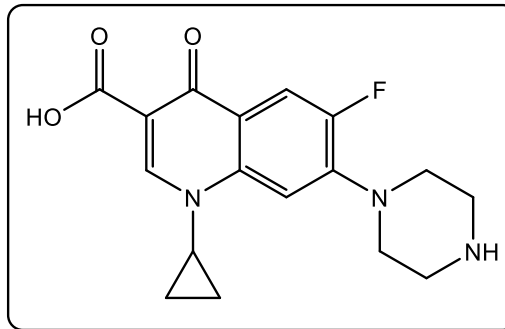
Netilmisin, gentamisine benzer etkiye sahip, yarı sentetik aminoglikosit antibiyotiktir. Kimyasal formülü  $C_{21}H_{41}N_5O_7$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 475,587 g/mol ve suda çözünürlüğü 100 mg/mL'dir. Organizmalardaki protein sentezini, bakteriyel 30S ribozomal altbirimine bağlanarak ve mRNA bağlanmasına ve alıcı tRNA sitesine müdahale ederek inhibe eder. Netilmisinin bakterisidal etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Netilmisin, 16S rRNA'nın dört nükleotide ve S12 proteininin tek bir aminoasidine bağlanır. Bu, başlatma kompleksine, mRNA'nın yanlış okunmasına karışmasına neden olur. Böylece yanlış amino asitler fonksiyonel olmayan veya toksik peptidlere yol açan polizom içine sokulur ve polizomların işlevsel olmayan monozomlara ayrışmasına ve bakterinin büyümesi için hayati önem taşıyan proteinleri sentezleyememesine neden olur. Aminosiklitol glikozitlerdendir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.20.** Netilmisin molekülünün açık formülü

### 1.8.13. Siprofloksasin

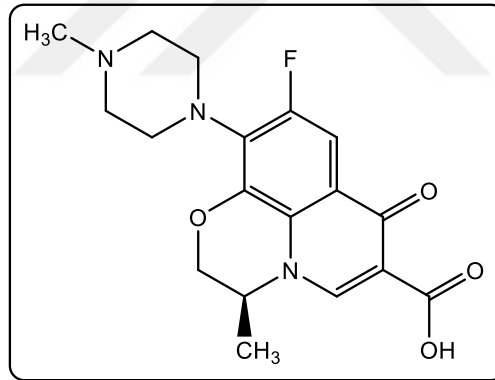
Siprofloksasin geniş spektrumlu bir antimikrobik karboksifluorokinolondur. Kimyasal formülü  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 331,3415 g/mol ve erime noktası  $255-257^{\circ}C$ 'dir. Siprofloksasinin bakterisidal etkisi, bakteriyel DNA replikasyonu, transkripsiyon, onarım, iplikçik onarımı ve rekombinasyon için gerekli olan topoizomeraz II (DNA giraz) ve topoizomeraz IV enzimlerinin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Oral uygulamadan sonra gastrointestinal sistemden hızla ve iyi absorbe edilir. Bu bileşik, kinolin karboksilik asitler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, kinolin halka sisteminin bir veya daha fazla pozisyonunda bir karboksil grubu ile ikame edildiği kinolinlerdir. Kinolin karboksilik asit grubundan olup aromatik heteropolisiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.21.** Siprofloksasin molekülünün açık formülü

### 1.8.14. Levofloksasin

Bakteriyel DNA girazın süper-iletkenliğini inhibe eden, DNA replikasyonunu durduran sentetik bir fluorokinolon olan levofloksasin antibakteriyel bir ajandır. Kimyasal formülü  $C_{18}H_{20}FN_3O_4$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 361,3675 g/mol'dür. Suda çözünmez. Levofloksasin, bakteriyel tip II topoizomerazları, topoizomeraz IV ve DNA giraz'ı inhibe eder. Diğer florokinolonlar gibi levofloksasin, gyrA geni tarafından kodlanan iki alt birim olan DNA giraz'ın A alt birimlerini inhibe eder. Bu, bakteriyel kromozomda iplikçik kırılmasına neden olur ve DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu inhibe eder. Bu bileşik, kinolin karboksilik asitler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, kinolin halka sisteminin bir veya daha fazla pozisyonunda bir karboksil grubu ile ikame edildiği kinolinlerdir. Kinolin karboksilik asit ve aromatik heteropolisiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).

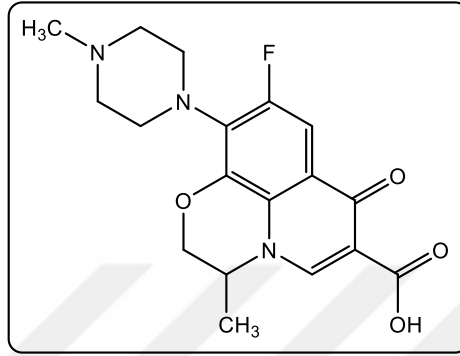


Şekil 1.22. Levofloksasin molekülünün açık formülü

### 1.8.15. Ofloksasin

Bakteriyel DNA girazın süper-iletkenliğini inhibe eden, DNA replikasyonunu durduran ve sentetik fluorokinolon olan antibakteriyel bir bileşiktir. Kimyasal formülü  $C_{18}H_{20}FN_3O_4$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 361,3675 g/mol, erime noktası 254°C ve suda çözünürlüğü 28,3 mg/mL'dir. Ofloksasin DNA giraz ve topoizomeraz IV üzerine etki eder. Ofloksasin ilaçları inhibe ederek normal hücre bölünmesini engeller. Bu bileşik,

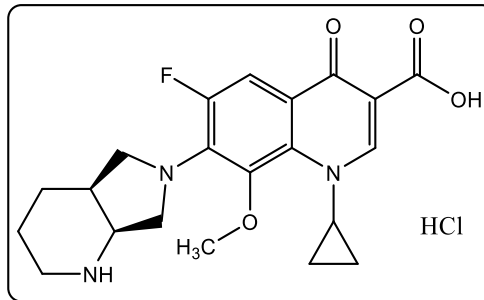
kinolin karboksilik asitler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, kinolin halka sisteminin bir veya daha fazla konumda bir karboksil grubu ile ikame edildiği kinolinlerdir. Aromatik heteropolisiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.23.** Ofloksasin molekülünün açık formülü

#### 1.8.16. Moksifloksasin HCl

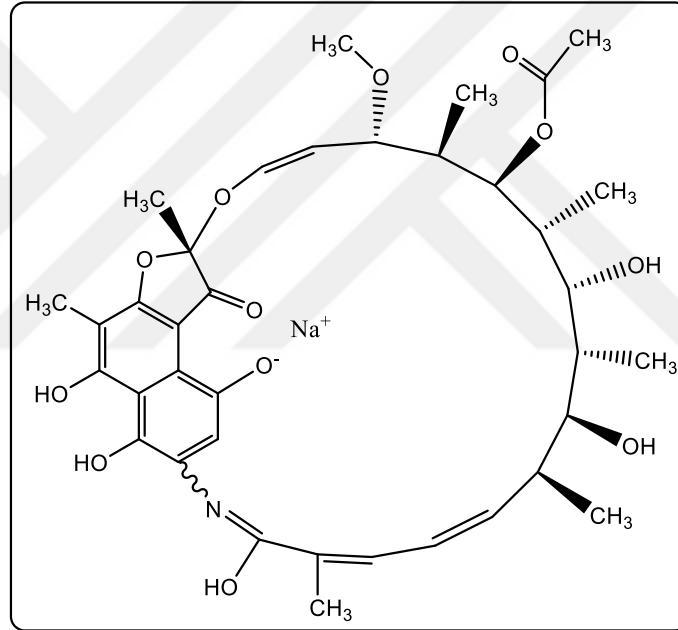
Moksifloksasin sentetik bir florokinolon antibiyotik ajanıdır. Kimyasal formülü  $C_{21}H_{25}ClFN_3O_4$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 437,896 g/mol, erime noktası 238-242°C'dir. Moksifloksasin'in bakterisidal (hücre duvarı sentezini inhibe eden) etkisi topoizomerez II (DNA giraz) ve topoizomerez IV enzimlerinin inhibe edilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu bileşik, kinolin karboksilik asitler olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, kinolin halka sisteminin bir veya daha fazla konumda bir karboksil grubu ile ikame edildiği kinolinlerdir. Moksifloksasin aromatik heteropolisiklik bir bileşiktir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.24.** Moksifloksasin HCl molekülünün açık formülü

### 1.8.17. Rifamisin sodyum

Rifamisin, *Streptomyces mediterranei* tarafından üretilen doğal bir antibiyotiktir. Kimyasal formülü  $C_{37}H_{46}NNaO_{12}$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 719,76 g/mol'dür. Rifamisin, prokaryotik DNA'ya bağlı RNA sentezini ve protein sentezini inhibe eden yaygın olarak kullanılan bir antimikrobakteriyel ilaçtır. Ayrıca RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmasını da inhibe eder. Rifamisin, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı bir aktivite spektrumuna sahiptir (Anonymous 2018).

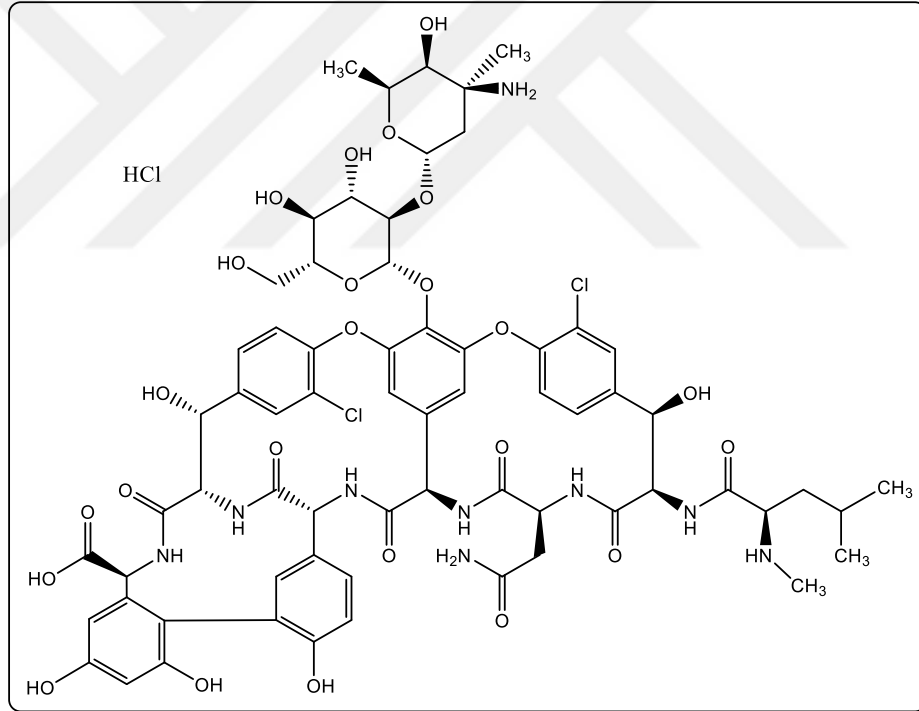


Şekil 1.25. Rifamisin sodyum molekülünün açık formülü

### 1.8.18. Vankomisin HCl

*Streptomyces orientalis*'den elde edilen antibakteriyel bir bileşiktir. Kimyasal formülü  $C_{66}H_{76}Cl_3N_9O_{24}$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 1485,723 g/mol'dür. Bakteri hücre duvarını inhibe eden, böbrekler ve iç kulak için toksik olan ve ristosetin ile ilişkili olan bir glikopeptittir. Vankomisin bakterisidal etkisi esas olarak hücre duvarı biyosentezinin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Spesifik olarak, vankomisin peptidoglikan matrisine dâhil edildiğinden N-asetilmuramid asit (NAM) ve N-

asetilglukosamin (NAG)-peptid alt birimlerinin birleşmesini engeller. Büyük hidrofilik molekül, NAM / NAG-peptitlerinin D-alanil-D-alanin terminali terminalleri ile hidrojen bağı etkileşimleri oluşturabilmektedir. Normalde bu beş noktalı bir etkileşimdir. Vankomisin D-Ala-D-Ala'ya bağlanması, NAM/NAG-peptid alt birimlerinin peptidoglikan matrisine katılmasını önler. Buna ek olarak, vankomisin bakteriyel hücre membranı geçirgenliğini ve RNA sentezini değiştirir. Vankomisin ile diğer antibiyotikler arasında çapraz direnç yoktur. Vankomisin gram-negatif basiller, mikobakteriler veya mantarlara karşı *in vitro* aktif değildir. Bu bileşik peptid omurgası taşıyan siklik bir parça içeren bileşikler olarak bilinen siklik peptitler sınıfına ait organik bir bileşiktir (Anonymous 2018).

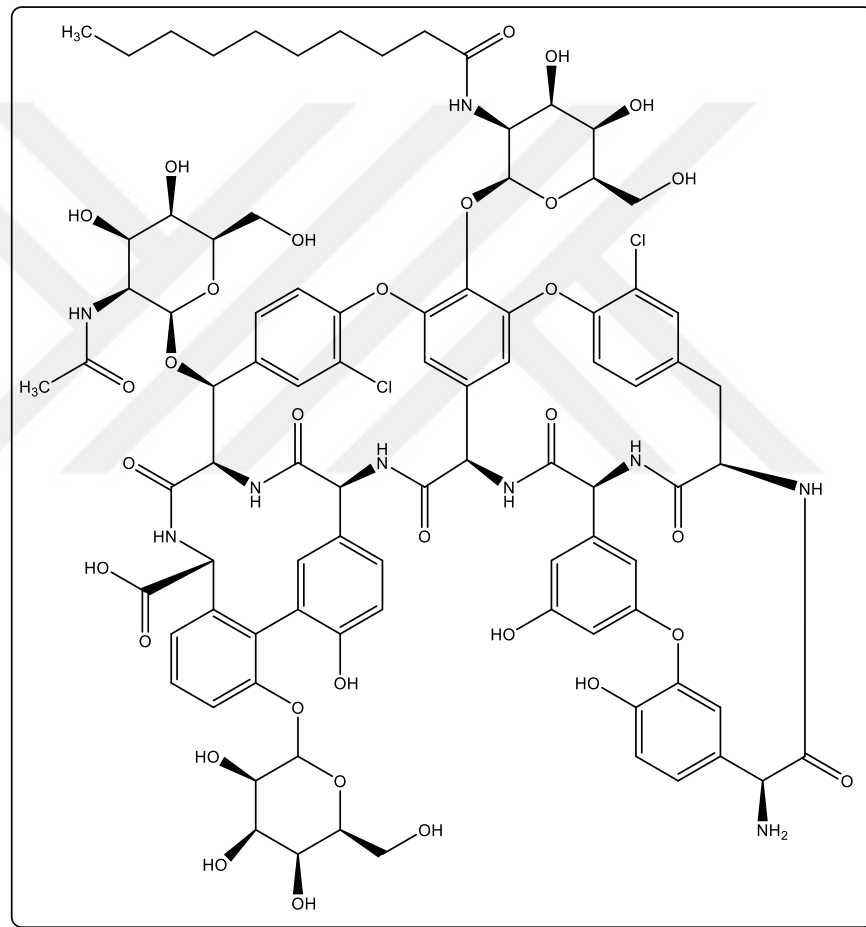


**Şekil 1.26.** Vankomisin HCl molekülünün açık formülü

### 1.8.19. Teikoplanin

Teikoplanin vankomisine benzer bir aktivite spektrumu olan bir yarı sentetik glikopeptid antibiyotiktir. Kimyasal formülü  $C_{88}H_{97}Cl_2N_9O_{33}$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 1879,674 g/mol'dür. Beş bileşik (teikoplanin A2-1 - A2-5) ve dört küçük (teikoplanin

RS-1 - RS-4) yapı içeren çeşitli bileşikler karışımıdır. Tüm teikoplaninler, iki karbonhidratın (mannoz ve N-asetilglukozamin) bağlı olduğu kaynaşmış bir halka yapısı olan teikoplanin A3-1 olarak adlandırılan aynı glikopeptit çekirdeğini paylaşırlar. Etki mekanizması, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe etmektir. Teikoplanin, gram pozitif bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonların profilaksisinde ve tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir (Anonymous 2018).



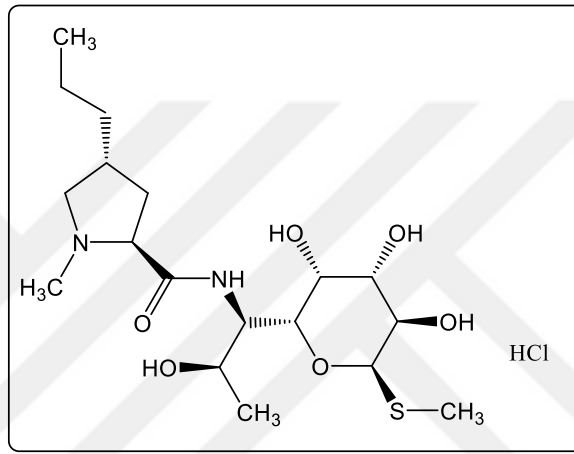
**Şekil 1.27.** Teikoplanin molekülünün açık formülü

### 1.8.20. Linkomisin HCl

*Streptomyces lincolnensis* tarafından üretilen bir antibiyotiktir. Kimyasal formülü  $C_{18}H_{35}ClN_2O_6S$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 442,996 g/mol'dür. Linkomisin, bakterilerdeki protein sentezini, bakteriyel ribozomların 50 S alt birimlerine bağlanarak



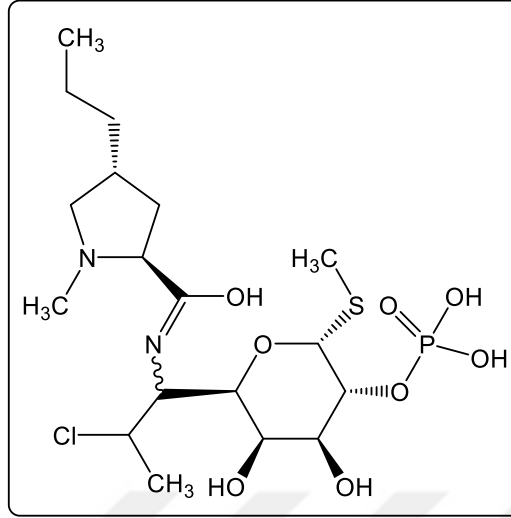
ve transkripsiyon üzerine peptid bağ oluşumunu önleyerek inhibe eder. Genellikle bakteriyostatik olarak kabul edilir, ancak yüksek konsantrasyonlarda veya oldukça duyarlı organizmalara karşı kullanıldığında bakterisidal olabilir. Bu bileşik, prolin ve türevleri olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, prolin veya amino grubundaki veya karboksi grubundaki prolin reaksiyonundan kaynaklanan bir türevini içeren bileşiklerdir. Glisin hidrojeninin bir heteroatom ile değiştirilmesinden oluşur (Anonymous 2018).



Şekil 1.28. Linkomisin HCl molekülünün açık formülü

### 1.8.21. Klindamisin fosfat

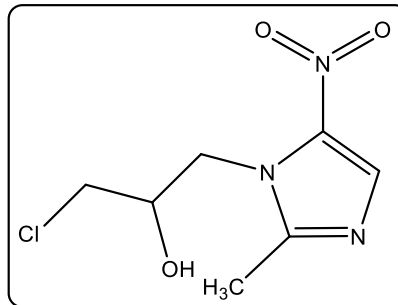
Klindamisin, geliştirilmiş bir yan etki profili nedeniyle linkomisinini yerini büyük oranda alan bir yarı sentetik 'linkosamid' antibiyotiktir. Kimyasal formülü  $C_{18}H_{34}ClN_2O_8PS$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 504,96 g/mol, erime noktası  $142^{\circ}C$  ve suda çözünürlüğü 30,6 mg/L'dir. Klindamisin bakteriyel 50S ribozomal altbirimlerine bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibe eder. Spesifik olarak, öncelikle 23s RNA altbirimine bağlanır. Organizma ve ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak bakteriyostatik veya bakterisidal olabilir. Klindamisin, ciltte serbest yağ asidi konsantrasyonlarını azaltır ve yağ bezleri ile foliküllerde bulunan bir anaerob bakteri olan *Propionibacterium acnes* (*Corynebacterium acnes*)'in büyümesini baskılar. Bu bileşik, prolin ve türevleri olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.29.** Klindamisin fosfat molekülünün açık formülü

### 1.8.22. Ornidazol

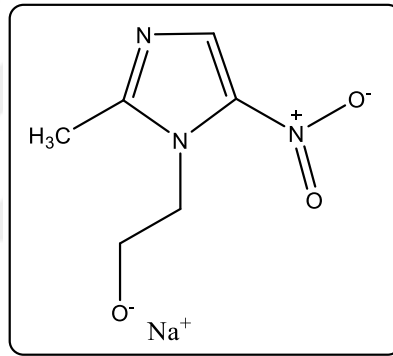
Kimyasal formülü  $C_7H_{10}ClN_3O_3$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 219,625 g/mol erime noktası  $84-90^{\circ}C$ 'dir. 5-nitroimidazolde 1 ve 2 pozisyonlarında sırasıyla 3-klor-2-hidroksipropil ve metil grupları bulunduran nitro bileşiktir. Protozoal enfeksiyonların ve anaerobik bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Sentezi, asit katalizör koşulları altında 2-metil-nitroimidazol ve epiklorohidrin arasında doğrudan bir reaksiyondur. Nitroimidazol ailesinin bir üyesidir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.30.** Ornidazol molekülünün açık formülü

### 1.8.23. Metronidazol sodyum

Kimyasal formülü  $C_6H_8N_3NaO_3$  olan bileşiğin molekül ağırlığı 193,138 g/mol erime noktası  $160,5^{\circ}C$  ve suda çözünürlüğü 9500 mg/L'dir. Metronidazol bir ön ilaçtır. Metronidazol, anaerobik bakteriler için selektiftir, çünkü bunlar hücre içi olarak metronidazolu aktif formuna indirgeme yeteneğine sahiptir. Bu azaltılmış metronidazol daha sonra kovalent olarak DNA'ya bağlanır, sarmal yapısını bozar, bakteri nükleik asit sentezini inhibe eder ve bakteri hücresi ölümüne neden olur. Bu bileşik nitroimidazol olarak bilinen organik bileşik sınıfına aittir. Bunlar, bir nitro grubu taşıyan bir imidazol halkası içeren bileşiklerdir (Anonymous 2018).



**Şekil 1.31.** Metronidazol sodyum molekülünün açık formülü

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidrazlar (CA), karbondioksitin geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize eden çinko içeren metaloenzimlerdir. CA'lar ilk olarak 1920'lerin sonunda, hemolize edilmiş kandaki karbondioksit ve bikarbonatın karşılıklı dönüşümünü katalizleyen kırmızı bir kan hücresi maddesinde tanımlanmıştır. Bundan birkaç yıl sonra bir enzim olduğunun anlaşılmasının ardından da kırmızı kan hücrelerinden arındırılmış ve karbonik anhidraz adı verilmiştir (Bootorabı 2011).

CA'lar, canlı sistemlerde önemli biyolojik fonksiyonlara sahip fonksiyonları bulunan her yerde bulunan enzimlerdir. Ayrıca farklı hücresel yerleşimlere sahip olmalarının yanında dokularda farklı oranlarda dağılım göstermektedirler. CA'lar  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ - ve  $\theta$ - gen ailelerinden oluşmaktadır. Bunlardan  $\alpha$ -CA'lar, hayvanlarda, bitkilerde, yeşil yosunlarda (*Chlamydomonas*), bazı faydalı bakterilerde ve ayrıca bazı virüslerde bulunurken,  $\beta$ -CA'lar ise bazı bakterilerde, bitkilerde ve öbakterilerde bulunmaktadır (Bootorabı 2011).

CA'ların tüm canlı organizmalarda mevcut olduğu düşünülmektedir ve bilinen en etkili enzimler arasındadırlar.  $\alpha$ -CA'lar, pH homeostazı, solunum, glikoneogenez, iyon taşınması, kemik rezorpsiyonu, böbrek asitlenmesi ve beyin omurilik sıvısı ve gastrik asidin oluşumu gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer alırlar (Bootorabı 2011).

CA I, CA II, CA III, CA IV, CA VA, CA VB, CA VI, CA VII, CA VIII, CA IX, CA X, CA XI, CA XII, CA XIII, CA XIV ve CA X olmak üzere 16 enzimatik üyeden oluşan memelilerde karakterize edilmiş CA enzimlerinin tümü  $\alpha$ -CA ailesine aittir. İnsan vücudunun dokularının çoğu, en az bir adet  $\alpha$ -CA izoenzimi içerir. Sitoplazmik, membrana bağlı, mitokondrial ve salgı formu olmak üzere memelilerde tanımlanmış 16 izoenzim mevcuttur. Ayrıca, CA enzim ailesine ait ancak aktif bölge boşluğundaki eksik histidin artıkları nedeniyle CA katalitik aktivitesinden yoksun üç karbonik anhidrazla ilgili proteinlerde (CARP) mevcuttur (Bootorabı 2011).

**Çizelge 2.1.** hCA ve mCA'ların kinetik özellikleri ve hücre içi lokalizasyonları (Hilvo *et al.* 2008)

İzoenzim	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat} / K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	Lokalizasyon
hCA I	$2,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^7$	Sitozolik
hCA II	$1,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	Sitozolik
hCA III	$1,3 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	Sitozolik
hCA IV	$1,1 \times 10^6$	$5,1 \times 10^7$	Membrana bağlı
hCA VA	$2,9 \times 10^5$	$2,9 \times 10^7$	Mitokondrial
hCA VB	$9,5 \times 10^5$	$9,8 \times 10^7$	Mitokondrial
hCA VI	$3,4 \times 10^5$	$4,9 \times 10^7$	Salgısal
hCA VII	$9,5 \times 10^5$	$8,3 \times 10^7$	Sitozolik
hCA IX	$1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$	Membrana bağlı
hCA XII	$4,2 \times 10^5$	$3,5 \times 10^7$	Membrana bağlı
mCA XIII	$1,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	Sitozolik
hCA XIV	$3,1 \times 10^5$	$3,9 \times 10^7$	Membrana bağlı
mCA XV	$4,7 \times 10^5$	$3,3 \times 10^7$	Membrana bağlı

(h: insan, m: fare)

Karbonik anhidrazlar, çeşitli temel fizyolojik süreçlerde yer aldığından dolayı birçok doku ve organda yaygın olarak bulunmaktadır. Dolayısıyla, düzensiz ifadeleri ve / veya anormal aktiviteleri önemli patolojik sonuçlar doğurabilmektedir. Bu nedenle, biyomedikal uygulamalarla inhibitörlerin veya aktivatörlerin tasarımında hedef olarak hCA üzerine son yıllarda artan bir ilgi söz konusudur (Supuran 2008; Alterio *et al.* 2012).

Karbonik anhidrazlar fizyolojik açıdan oldukça önemli enzimlerdendir. CA'lar pek çok dokuda asit-baz dengesini sağlayarak pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmişlerdir. Bunun yanı sıra üre sentezi, lipogenez, glukoneogenez, gibi biyosentetik reaksiyonlarda görev almalarına ek olarak kalsifikasyon, tümör oluşumu gibi birçok fizyolojik ve patolojik olayda da görev almaktadırlar. Oldukça önemli fizyolojik ve patolojik süreçlerde görev almasının sonucu olarak ödem, glokom, obezite, kanser, epilepsi, osteoporozis ve alzheimer gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde CA inhibitörleri

yada aktivatörleri potansiyel tedavi edici hedefler olarak görülmektedir (Akkemik vd 2017) .

Karbonik anhidraz aktivitesi üzerine şimdiye kadar birçok bileşik tasarlanmış ve sentezlenmiştir, çoğunun CA hedefi için iyi bir yakınlık göstermesine rağmen bunlar belirli bir izoform için seçicilikten yoksun oldukları için optimal ilaç olmaktan uzaktırlar. Bu nedenle, izoenzime özgü CA inhibitörlerinin geliştirilmesi halen önemli bir durumdur. Buna yönelik farklı  $\alpha$ -CA izoenzimleri ve  $\alpha$ -CA/inhibitör kompleksleri üzerine çok sayıda X-ışını kristalografik çalışmaları son zamanlarda bu alanda yeni fırsatlar sağlamak ve daha seçici enzim inhibitörlerinin rasyonel ilaç tasarımı için moleküler bazlar sunmaktadır. (Alterio *et al.* 2009; Alterio *et al.* 2012).

CA I enzimin primer sekansı 1972-1974 yılları arasında keşfedilmiştir. Daha sonra 1990 yılında Lowe ve arkadaşları, CA I gen kodlamasının q22 bölgesinde kromozom 8 üzerinde konumlandığını bulmuşlardır (Lowe *et al.* 1990). Yapısal açıdan CA I, 260 kalıntıdan oluşmuş 30 kDa'lık tek bir zincirdir. CA I eritrositlerde bol miktarda bulunmasının yanında böbrekler, gastrointestinal sistem (özellikle kolon), akciğerler, beyin ve gözler gibi vücudun diğer bölgelerinde de bulunmaktadır (Supuran and De Simon 2015).

Karbonik anhidraz I (CA I), insan eritrositlerinde, ince ve kalın bağırsakta, pankreatik adacık hücrelerinde, adrenal bezin zona glomerulosa'sında, epidermiste ve derideki kılcal damarların endotel hücrelerinde bulunan bir sitozolik izoenzimdir. İnsan CA I kodlayan gen, 8q13-q22 üzerindedir. CA I'in doğuştan eksikliğinin klinik bir sonucu yoktur, çünkü CA I geninde homozigot mutasyona sahip ve eritrositlerinde neredeyse hiç CA I geni bulunmayan klinik bulgulu bireyler bulunmamaktadır (Adeva-Andany *et al.* 2015).

CA I farklı patolojik süreçlerde yer almaktadır. Eritrositlerdeki CA I aktivitesinin azalışı, bazı anemi ve kronik asidoz türleri ile ilişkilendirilmiştir (Gambhir *et al.* 2007). Gao ve arkadaşları diyabetik retinopati gibi göz hastalıklarının yüksek düzeyde CA I ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Gao *et al.* 2007; Alterio *et al.* 2012).

Karbonik anhidraz II (CA II), CA I ve CA III'e kıyasla karbondioksit hidrasyon reaksiyonu için daha hızlı katalitik oranı gösteren bir sitozolik izoformdur. İnsan dokularında CA II, gastrointestinal sistem, hepatik safra kanalları, pankreas kanalı, safra kesesi, parotid ve submandibular bezler, ter bezleri, adrenal bezin zona glomerülosa hücreleri, hipofiz kortikotrofları, böbrek tübülünün epitelyumu, adipoz doku, kas, epidermis ve böbrek peritubular kılcak damarları ve dermisin endotel hücrelerinde yaygın olarak bulunmaktadır. İnsan beyinde CA II oligodendrositler ve koroid pleksus epitelinde lokalizedir. CA II, 8q22 bandında kodlanmıştır (Adeva-Andany *et al.* 2015).

pH:7,5 ve 20°C'de  $k_{cat} : 1,40 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{cat} / K_M : 1,50 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  değerlerine sahip hCA II, CO<sub>2</sub> metabolitinin proton ve bikarbonata dönüştürülmesi durumunda oldukça yüksek katalitik aktivite göstermekte ve kanda fazla miktarda bulunmaktadır (Supuran 2008; Neri and Supuran 2011; Alterio 2012; Supuran 2012). İnsanlar dahil tüm memeliler, karbonik anhidrazın kanda bulunan iki izoformu olan ve toplam konsantrasyonu ~0,2 mM olan CA I ve CA II izoenzimlerini bulundururlar (Ridderstrale *et al.* 2002). hCA II'nin katalitik aktivitesi, hCA I'in katalitik aktivitesinden kıyasla çok daha yüksektir. Ayrıca hCA I plazmada bulunan klorür ve bikarbonat tarafından da inhibe edilmektedir (De Simon and Supuran 2012).

Karbonik anhidraz III'ün (CA III) katalitik aktivitesi, karbondioksit hidrasyonu için nispeten zayıf bir katalizör olan üç izoformun arasında (CA I - CA II - CA III) en düşük seviyededir. CA III, çoğunlukla insan iskelet kasında bulunmaktadır. Ancak kırmızı hücreler, koroid pleksuslar ve 3T3 adipositlerinde de tespit edilmiştir. CA III kodlama bölgesi 8q13-q222'dir (Adeva-Andany *et al.* 2015).

Karbonik anhidraz IV (CA IV) plazma membranının dış tarafına bir glikosilfosfatidilinositol bağıyla tutturulmuştur. CA IV, yüksek aktiviteli bir izoenzim olarak CA II'ye benzemektedir. CA IV, insan kolonik enterositlerde, safra kesesi epitel hücrelerinde, safra kanallarında, pankreas borularında, tükürük bezlerinde, proksimal böbrek tübünde, iskelet kasında, düz kaslarda ve pulmoner mikrovasküler sistemin

endotel hücrelerinde tespit edilmiştir. CA IV kodlayan insan CA IV geni, kromozom 17q23'e bulunmaktadır (Adeva-Andany *et al.* 2015).

Karbonik anhidraz VA (CA VA) ve karbonik anhidraz VB (CA VB) izoenzimleri mitokondrial ağ ile sınırlandırılmıştır. CA VA insanlarda karaciğerde eksprese olurken, CA VB, karaciğerde görülmeyen ancak pankreas, tükürük bezi, böbrek, omurilik, iskelet kası ve kalp kasında bulunan daha geniş bir dağılım gösterir. CA VA geni, insan kromozomunda 16q24.3 üzerinde lokalizeyken, insan CA VB geni Xp22.1 üzerinde lokalizedir (Adeva-Andany *et al.* 2015).

Karbonik anhidraz VI (CA VI), hidrataz reaksiyonunda insan CA II'den daha düşük enzimatik aktivite gösterir. İnsan CA VI, parotid ve submandibular tükürük bezleri ve ekzokrin pankreas gibi ekzokrin bezlerin asiner hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Ayrıca, CA VI tükürükte de tespit edilmiştir. İnsan CA VI kodlayan gen, kromozom 1p36.22-33 üzerinde lokalizedir (Adeva-Andany *et al.* 2015).

Karbonik anhidraz VII (CA VII), insan tükürük bezlerinde ve hipokampusta ifade edilen bir sitozolik izoenzimdir. Ancak diğer dokularda dağılımı bilinmemektedir. İnsan CA VII geni, kromozom 16q21-23 üzerinde lokalizedir (Adeva-Andany *et al.* 2015).

Karbonik anhidraz IX (CA IX) insan gastrik mukozasının epitel hücrelerinde, ince ve kalın bağırsağın enterositleri, pankreatik kanallar ve safra kanallarında saptanmıştır. CA IX kodlayan insan geninin yeri tam olarak tespit edilememiştir (Adeva-Andany *et al.* 2015).

CA IX ve XII izoenzimleri, kanserlerle ilişkili membran CA'ları olarak bilinmektedirler. Her iki izoenzim, gastrointestinal mukoza gibi çok sınırlı sayıdaki normal dokularda da görülmüştür. Ayrıca genetik araştırmalarda CA IX ve CA XII izoenzimlerinin tümör hücrelerinde pH düzenleyici enzimler olarak önemli rollerinin olduğu öne sürülmüştür (Öztaşkın *et al.* 2017).



Karbonik anhidraz XII (CA XII), CA IV'ün karbonik anhidraz aktivitesinin yaklaşık altıda birine sahip bir transmembran proteindir. CA XII, insan pankreas kanallarında, tükürük bezlerinde, böbrek tübünde ve kalın bağırsağın enterositlerinde tespit edilmiştir. CA XII kodlayan gen, 15q22'de lokalizedir. İnsan CA XII genindeki homozigot mutasyonlar, terleme zaman zaman görülebilen tuz çökeltileri ile hiperhidroz ve tuz tüketimiyle karakterize otozomal resesif bir sendroma neden olur. CA XII eksikliği bulunan hastalarda, ter, hiponatremi, hipokloremi, düşük üriner sodyum atılımı, yüksek plazma renin aktivitesi ve aldosterondaki klorür konsantrasyonunun arttığı görülmektedir (Adeva-Andany *et al.* 2015).

Karbonik anhidraz XIII (CA XIII), insan CA I ve CA V izoenzimlerine benzer ve orta katalitik aktiviteye sahip olduğu düşünülen sitozolik bir izoenzimdir. CA XIII insan testis, prostat, yumurtalık, uterus, tükürük bezleri, timus, böbrek, ince bağırsak, kolon ve dalak toplama kanallarında bulunmaktadır. İnsan CA XIII geni, 8q21.2 üzerinde lokalizedir (Adeva-Andany *et al.* 2015).

Karbonik anhidraz XIV (CA XIV), CA IV'e benzer şekilde bir glikosil-fosfatidil-inositol lipid çapası vasıtasıyla plazma membranının dış yüzeyine bağlanmış olan bir membrana bağlı proteindir. CA XIV enzimatik aktivitesi, CA II'ye kıyasla düşüktür. CA XIV, insan kalp, beyin, omurilik, karaciğer ve iskelet kasında tespit edilmiştir. İnsan kolonunda, ince bağırsağında, böbreğinde ve idrar kesesinde düşük fakat önemli seviyelerde tespit edilmiştir. CA XIV geni, 1q21 kromozomu üzerine bulunmaktadır (Adeva-Andany *et al.* 2015).

İnsanlarda membrana bağlı izoenzim karbonik anhidraz XV (CA XV) kodlayan gen, işlenmemiş bir psödojendir ve bu nedenle insan dokularında CA XV yoktur. İnsan CA XV geninin üç kopyası, 22q11.21 üzerinde tanımlanmıştır (Adeva-Andany *et al.* 2015).

Bir karbonik anhidraz domaini olan ancak katalitik aktivitesi olmayan CA VIII, CA X ve CA XI membran proteinleri denilen, karbonik anhidrazla ilgili proteinler vardır. 8q kromozomundaki CA VIII genindeki mutasyonlar, serebellar ataksi ve mental

retardasyon sendromuna neden olur. Karbonik anhidrazla ilgili proteinler, protein ataksin-3'ün anormal olduğu konjenital bir hastalık olan spinoserebellar ataksi tip 3 (Machado-Joseph hastalığı) patogeneğinde rol oynayabilir (Adeva-Andany *et al.* 2015).

Karbonik anhidraz izoenzimleri bakteriyel kaynaklı kalsifikasyon, spiküller oluşumu ve kabuk oluşturan hayvanlarda kabukların oluşturulması da dahil olmak üzere birçok biyolojik sistemin kalsifikasyon süreçlerinde yer alırlar (Dhami *et al.* 2014; Ramanan *et al.* 2010)

CA inhibitörleri başlangıçta diüretik ve anti-glokom ilaçları olarak kullanılmış ancak yakın geçmişte kanser, obezite ve epilepsinin tedavisi de dahil olmak üzere diğer klinik uygulamalarda da etkisi keşfedilmiştir (Villalba *et al.* 2016).

*In vitro* araştırmalar, karbonik anhidraz izoenzimlerinin, kalsiyum karbonat (CaCO<sub>3</sub>) oluşumunu teşvik ederek kireç oluşum süreçlerine katılıp karbonik anhidraz inhibitörü asetazolamidin eklenmesinin ardından kalsiyum karbonat oluşumunda gözle görülür bir azalmanın gözlemlendiğini göstermektedir. Ayrıca kalsiyum karbonat üretiminin asetazolamid tarafından inhibisyona duyarlı karbonik anhidraz izoenzimlerine bağlı olduğunu göstermiştir (Mirjafari *et al.* 2007; Ramanan *et al.* 2009; Ramanan *et al.* 2010).

Daha önceden yapılan çalışmalarda, çeşitli enzimlerin pET SUMO ekspresyon sistemi kullanılarak klonlanma ve ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Örneğin, Ceylan 2016 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, insan beyin AchE cDNA'sı pET SUMO vektörüne klonlayıp daha sonra protein üretimi gerçekleştirmiştir. Oluşturulan rekombinant konstraktı çapraz PCR ile doğrulamıştır. Elde ettiği rekombinant klonu *Escherichia coli* BL21 (DE-3)'de ifade ettirmiştir. İzopropil  $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranozit (IPTG) indüksiyonu ile üretilen heksahistidin (6xHis) kuyruğuna sahip füzyon proteinini nikel (Ni<sup>2+</sup>) afinite kromatografisi ile saflaştırmıştır. Anti-His G-HRP antikoru kullanılarak yaptığı Western blot sonucunda yaklaşık 90 kDa'luk füzyon proteini tespit etmiştir. Ellman metodu ile yapılan aktivite deneylerinde optimum sonuç pH:9,0 Glisin-NaOH

tamponunda, oda sıcaklığında elde etmiştir. Rekombinant enzime ait  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırası ile 0,63 mM ve 0,69 EU/mL olarak bulmuştur.

Bir başka çalışmada, yine pET SUMO ekspresyon vektörünü kullanılarak insan karbonik anhidraz II (hCA II) enzimi *E. coli*'de eksprese edilmiş ve üretilen rekombinant enzim, nikel ( $Ni^{+2}$ ) afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Rekombinant hCA II enziminin hidrofobik kısmındaki Trp 209 aminoasiti, bölge yönelimli mutagenез yöntemi ile dört farklı amino asit (Val, Leu, Ile ve Pro) ile yer değiştirilmiştir. Daha sonra bu mutagenез işlemlerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkileşimleri incelenmiştir (Kılıç *et al.* 2017).

Demir 2014 yılında yaptığı bir çalışmada, PON1 enzimini, insan karaciğer dokusundan rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak *Escherichia coli* BL21 (DE-3) hücresinde üretti. SUMO-hPON1 enzimini nikel ( $Ni^{+2}$ ) afinite kromatografisi kullanılarak doğal şartlarda %93,5 verim ve 226,88 EU/mg spesifik aktivite ile 17,12 kat saflaştırma katsayısıyla saflaştırdı. SUMO-hPON1 enziminin kütlesini 51,52 kDa olarak belirledi. İnküzyon cisimciklerinin saflaştırılması ve refolding işlemi gerçekleştirdi. Enzimi % 92,72 verim ve 215,93 EU/mg spesifik aktivite ile 12,31 kat saflaştırma katsayısı ile saflaştırdı. SUMO-hPON1 enziminin kütlesini 53,48 kDa olarak belirledi.

Yerlikaya 2012 yılında yaptığı bir çalışmada, CAIX izoenzimini, insan pankreas dokusundan rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak *Escherichia coli* BL21 (DE-3) hücresinde üretmiştir. hCA IX izoenzimi nikel-nitritotriasetik asit afinite kromatografisi tekniğini kullanarak 290378 EU $\times$ mg<sup>-1</sup> spesifik aktiviteyle; % 85,96 verimle; 20,4 saflaştırma katsayısıyla saflaştırmıştır. hCA IX izoenziminin molekül kütlesini 50,47 kDa olarak belirlemiştir. Ayrıca saflaştırılan hCA IX izoenziminin karakterizasyonu yaparak enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, stabil pH, optimum iyonik şiddet,  $V_{max}$ ,  $K_M$  ve  $k_{cat}$  değerlerini belirlenmiştir. 25 adet antitümör ilacın ve 6 adet ağır metalin enzim aktivitesi üzerine etkisi esteraz aktivitesi metodunu kullanarak *in vitro* şartlarda araştırmıştır.

CA izoenzimlerinin klonlanması ve saflaştırılması ile ilgili yapılan çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin, Juozapaitienė ve arkadaşları (2016), insan CA VII enzim genini *E.coli*'de eksprese ederek, farklı promotörlerin etkisi, *E.coli* suşları ve rekombinant CA XIV protein yapısının uzunluğunu afinite kromatografisi saflaştırma tekniğini kullanarak analiz ederek, çalışma sonucunda % 96 saflık derecesi elde etmişlerdir. Saflaştırılmış CA XIV rekombinant enziminin enzimatik aktivitesi, CO<sub>2</sub> hidrasyonunu takip ederek tespit etmişlerdir. Ayrıca diğer CA izoformlarına kıyasla CA XIV'e karşı seçicilik sergileyen ve ilaç olarak geliştirilebilen birkaç inhibitör keşfetmişlerdir.

Sumi *et al.* (2018) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, pufferfish (*Takifugu rubripes*) CA VI genomik dizisi kullanılarak CA VI enzim genini klonlamışlardır. Çalışmada 1623 baz çiftlik bir tam kodlama dizisi ve 540 amino asitten oluşan 1821 bç'lik cDNA dizisi klonlanmıştır. Blastlama sonucunda bu protein insan CA VI ile %53, tilapi CA VI ile %79 ve gar CA VI ile %67 benzerlik göstermiştir. Ayrıca, diğer balık (zebra balığı, Asya arowana, somon ve büyük sarı bıldırcın balığı) CA VI ile %63-77 benzerlik göstermiştir. Ayrıca, pufferfish CA VI'nın protein dizisinin memeli ve balık CA II dizileri ile % 34-37 özdeşliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. 18 amino asitlik bir NH<sub>2</sub>-terminal sinyal peptidi, pufferfish CA VI dizisinde tahmin edilmiştir. Pufferfish CA VI'da, muhtemelen bir disülfid bağı oluşturan üç N-bağlantılı glikosilasyon bölgesi ve iki sistein kalıntısı (Cys-28 ve Cys-209) bulunduğunu keşfetmişlerdir. Silico ve filogenetik analizler, pufferfish CA VI'nın bir hücre dışı sekresyon proteini olduğunu ortaya koymuştur. Aktif bölge analizi, bu proteinin 207 pozisyonunda karakteristik bir Val / Ile süstitüsyonuna bağlı olarak düşük bir CA izoenzimi olduğunu göstermiştir. Pufferfish CA VI'nın homoloji modellemesi, insan karbonik anhidraz XIV'in kristal yapısına yüksek benzerliğine dayanan bir şablon olarak kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), kantitatif PCR ve in situ hibridizasyon sonuçları, pufferfish CA VI'nın karaciğer dokusunda yüksek oranda eksprese edildiğini ortaya koymuştur.

Vullo ve arkadaşları 2005 yılında klonladıkları hCA VII enzimi üzerine, asetazolamid, metazolamid, etokzolamid, diklorofenamid, dorzolamid, brinzolamid ve benzolamid gibi

linik olarak kullanılan türev aromatik ve heterosiklik sülfonamidleri ile sülfamat türevi antiepileptik ilaç olan topiramatin inhibisyon etkisini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçları diğer CA enziminin sitozolik formu olan ve katalitik olarak aktif izozimleri, hCA I, hCA II ve mCA XIII ile karşılaştırmışlardır. hCA VII, incelenen tüm bileşikler için 0,45-210 nM aralığında afinite göstermiştir.

Karbonik anhidraz izoenzimleri, insanlarda ve hayvanlarda ortaya çıkan birçok hastalığın tedavisine ışık tutacak özelliğe sahip bir enzimdir. Asetazolamit ( $C_4H_6N_4O_3S_2$ ), brinzolamit ( $C_{12}H_{21}N_3O_5S_3$ ) ve dorzolamit ( $C_{10}H_{16}N_2O_4S_3$ ) gibi bazı sülfonamid türevleri yapısına sahip ilaçlar CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleri sınıfına girmektedirler. Epilepsi, ödem ve glukom hastalıklarının tedavilerinde CA inhibitörleri ilaç olarak kullanılmaktadır (Bülbül *et al.* 2003; Akıncıoğlu *et al.* 2013).

Ancak, pek çok kimyasal atık malzemeleri CA enziminin katalizleme aktivitesini ciddi derecede azaltmakta ya da inhibe etmektedir. Yapılan bir araştırmada, yılan balıklarında (*Anguilla anguilla*) kadmiyumun *in vitro* şartlarda, solungaç ve barsakta lokalize olmuş CA izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiş, sonuç olarak da karbonik anhidraz enzim aktivitelerinin önemli derecede inhibe olduğu belirtilmiştir (Lionetto *et al.* 2000).

Rekombinant proteinler, kolon materyalinin spesifik özelliklerine göre kromatografi teknikleri kullanılarak saflaştırılmaktadır. Rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında en çok uygulanan yöntem afinite kromatografisidir. Bu yöntem hedef proteine karşı oldukça seçicidir ve yöntemde proteinlerin kimyasal gruplara karşı olan yüksek ilgisinden faydalanılmaktadır. Klonlanmış genlerden ifade edilen proteinler afinite kromatografisi ile izole edilebilmektedir. Klonlanmış geni taşıyan vektörlerde bulunan ekstra aminoasitler, kolayca tanınmayı sağlayan afinite kuyruğu olarak görev yapmaktadırlar. Örneğin, bir uçta histidin kuyruğu olarak adlandırılan bir yapı için geni taşıyan vektöre histidin kodonunun tekrarları ilave edilebilmektedir. Daha sonra kuyruğa kovalent olarak bağlanmış proteinler, immobilize metal iyonlarını içeren kolona tatbik edilmektedir. Histidin kuyrukları immobilize metal iyonlarına etkili bir şekilde bağlanmakta ve bu

sayede istenen proteinin kolon materyaline tutunması sağlamaktadır. Diğer proteinler ise kolondan tutunmadan geçmektedirler. İstenen protein ise metal iyonlarına bağlanarak proteinle yer değiştirebilen diğer kimyasallar veya imidazol ilavesiyle kolondan elüe edilebilmektedir (Berg *et al.* 2014).

Nikel şelatlayıcı reçine 6Xhis-tag'a sahip vektörlerin transfer edildiği; bakteri, böcek ve memeli hücrelerinde ifade edilen rekombinant proteinin saflaştırılması amacıyla kullanılır. Bu reçine 6Xhis-tag'a sahip rekombinant füzyon proteinleri için yüksek seçicilik sağlar. Nikel şelatlayıcı reçinelerde ligant olarak  $Ni^{2+}$  ile üçlü koordinasyon bölgesi oluşturan iminodiasetik asit (IDA), dörtlü koordinasyon bölgesi oluşturan nitriloasetik asit (NTA) ve beşli koordinasyon bölgesi oluşturan tris karboksimetiletilediamin (TED) kullanılmaktadır (Demir 2014).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan kimyasallar ve markaları

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Marka</b>
Akrilamid	Sigma
Amonyum persülfat	Sigma
Asetik asit	E.Merc AG
Brom timol mavisi	E.Merc AG
Coomassie brillant blue G-250	Sigma
Coomassie brillant blue R-250	Sigma
dNTP	Sigma
Fosforik asit	E.Merc AG
Gene spesifik primerler	Metabion
Gliserol	E.Merc AG
Glisin	E.Merc AG
Hidroklorik asit	E.Merc AG
IPTC	Promega
İmidazol	Sigma
İnsan beyin cDNA'sı	Invitrogen
İzopropanol	E.Merc AG
Kanamisin sülfat	Sigma
Lizozim	Sigma
LB Agar (Luria Bertani Agar)	Sigma
LB Broth (Luria Bertani Broth)	Sigma
MgCl <sub>2</sub>	Sigma
TEMED (N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin)	Sigma
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
pET SUMO protein ekspresyon kiti	Invitrogen

**Çizelge 3.1.** (devam)

p-Nitrofenol (PNF)	Sigma
PageRuler Protein Ladder 26616	Thermo
Protein marker	BioRad 0375
SDS (Sodyum dodesil sülfat)	Sigma
Sodyum hidroksit	E.Merc AG
Sodyum klorür	E.Merc AG
Standart sığır serum albumin (BSA)	Sigma
Taq DNA polimeraz	Sigma
Trihidroksimetilaminometan (Tris)	E.Merc AG
$\beta$ -Merkaptoetanol	E.Merc AG

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan antibiyotikler Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi'nden temin edilmiştir.

### 3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

**Çizelge 3.2.** Çalışmalar sırasında kullanılan alet ve cihazlar

<b>Cihaz</b>	<b>Marka/Model</b>
Soğutmalı Santrifüj	Hermle Z 323 K (Germany)
Otoklav	Hirayama HV-50L
İnkübatör	Binder
PCR cihazı	Bio Rad
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	Edmund Bühler GmbH KS-15
Agaroz jel elektroforezi	Thermo EC 135-90 (yatay)
Jel Görüntüleme	Vilber Lourmat-ECX-20-M
Mikrodalga Fırın	Beko MD-1500
Isı Blokları	Lab-Line, VWR Digital Heatblock
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
Spektrofotometre	Optizen Pop



**Çizelge 3.2.** (devam)

pH metre	Mettler Toledo
Elektroforez Tankı	BIO RAD (Dikey)
Peristaltik Pompa	Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	IKA Vortex 4 Basic
Hassas Teraziler	Gecavery (UK), Denver Instrument
Shaker	Midi Dual 14
Otomatik hassas pipetler	Eppendorf
Magnetik Karıştırıcı	IKA C-MAG HS7
Saf Su Cihazı	Barnstead Easy Pure UV/U
Su Banyosu	Nüve
Kar Makinası	Scotsman AF-20
Güç Kaynağı	Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolabı (+4 °C)	Siemens Derin Dondurucu
Dondurucu (-20°C)	Sanyo Medical Freezer, Uğur
Dondurucu (-80°C)	Sanyo Ultra Low

### 3.3. Deneylerde Kullanılan Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

#### 3.3.1. Besiyeri ve agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

##### 3.3.1.a. LB sıvı besiyeri

20 g LB Broth besiyeri ve 1 g D-(+)-glukoz tartıldı. Karışım 1000 mL saf suda çözündürüldü ve otoklavlandı. Hazırlanan besiyeri kullanılmadan hemen önce antibiyotik (kanamisin sülfat) ilavesi yapıldı.

### **3.3.1.b. LB Agar besiyeri**

40 g LB Agar besiyeri ve 1 g D-(+)-glukoz tartıldı. Karışım 1000 mL saf suda çözüldürüldü ve otoklavlandı. Sıcaklığın ~40°C civarına düşmesi ile ortama 50 µg/mL kanamisin eklendi. 85 mm'lik petri kaplarına 20-25 mL besiyeri döküldü. Agar katılaşınca kadar beklendi ve daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

### **3.3.1.c. Kanamisin antibiyotiği stok çözeltisi (1 mg/mL)**

10 mg kanamisin, 10 mL steril saf suda çözüldü. 0,2 µm'lik membran filtre ile steril edildikten sonra karanlık ortamda +4°C'de muhafaza edildi.

### **3.3.1.d. 1X TAE tamponunun (Tris/Asetat/EDTA tamponu) hazırlanması (pH:8,0)**

40 mM Tris, 5 mM sodyum asetat, 1 mM EDTA olacak şekilde dH<sub>2</sub>O kullanılarak 1 litre tampon hazırlandı.

## **3.3.2. Rekombinant proteinin saflaştırılması işlemlerinde kullanılan çözeltiler**

### **3.3.2.a. Lizis tamponu (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, %10 gliserol)**

0,3 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,46 g NaCl, 166,66 µL imidazol (3 M pH:6,0) ve 5 mL gliserol 45 mL saf su içerisinde karıştırıldı. pH:8,0 olduktan sonra son hacim saf su ile 50 mL yapıldı.

### **3.3.2.b. IPTG stok çözeltisi (50 mM)**

0,6 g IPTG, son hacim 50 mL olacak şekilde üzerine steril saf su ilave edildi. 0,2 µM'lık membran filtre ile steril edildikten sonra karanlık ortamda +4°C'de muhafaza edildi.

**3.3.2.c. 3 M imidazol çözeltisi (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 3 M imidazol pH:6,0)**

20,42 g imidazol, 2,93 g NaCl, 0,24 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> alınıp ~95 mL kadar saf suda çözündürüldü. pH:6,0 yapıldı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye getirildi. İmidazol bileşiminin çözünmesi zor olduğundan çözelti 40-50°C'ye kadar ısıtıldı.

**3.3.2.d. 5X Doğal saflaştırma tamponu**

7 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 29,2 g NaCl 180 mL deiyonize suda çözündürüldü. pH'sı 8,0'a ayarlandı. Son hacim 200 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklandı.

**3.3.2.e. 1X Doğal saflaştırma tamponu**

5X Doğal saflaştırma tamponundan 20 mL alınarak son hacim saf su ile 100 mL yapıldı.

**3.3.2.f. Doğal bağlanma tamponu**

30 mL 1X doğal saflaştırma tamponu bağlanma tamponu olarak kullanıldı.

**3.3.2.g. Doğal yıkama tamponu**

50 mL 1X doğal saflaştırma tamponuna, pH:6,0 olan 335 µL 3 M imidazol ilave edilerek pH'sı 8,0'a ayarlandı.

**3.3.2.h. Doğal elüsyon tamponu**

13,75 mL 1X doğal saflaştırma tamponuna pH:6,0 olan 1,25 mL 3 M imidazol ilave edilerek pH'sı 8,0'a ayarlandı.

**3.3.2.1. Diyaliz tamponu (5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH:8,0)**

0,3 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> belli bir miktar saf su içerisinde karıştırıldı. pH:8,0 yapıldı. Daha sonra saf su ile son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

**3.3.3. Karbonik anhidraz enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler****3.3.3.a. 0,05 M Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu (pH:7,4)**

3,03 g Tris alınarak ~450 mL saf suda çözüldü. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH:7,4 yapıldı. Tamponun son hacmi saf su ile 500 mL'ye ayarlandı.

**3.3.3.b. Substrat çözeltisi**

13,5 mg PNF alınarak 1 mL asetonda çözüldü. Karışım 24 mL saf suya manyetik karıştırıcı eşliğinde yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı.

**3.3.4. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler**

**3.3.4.a. 0,001 mM Tris-HCl Tamponu:** 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 90 mL suda çözüldü, pH'sı 1 M HCl ile 8,8 yapıldıktan sonra hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**3.3.4.b. 0,001 mM Tris-HCl Tamponu:** 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 90 mL suda çözüldü, pH'sı 1 M HCl ile 6,8 yapıldıktan sonra hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**3.3.4.c. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid:** 0,4 g bisakrilamid ile 15 g akrilamid, 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.

**3.3.4.d. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi:** 1 g amonyum persülfat tartılarak 10 mL saf su eklendi.

**3.3.4.e. %10'luk SDS:** 1 g SDS 9 mL suda çözülerek elde edildi.

**3.3.4.f. Yürütme tamponu:** 12,5 mmol Tris ve 0,1 mol glisin tartılarak ~400 mL saf suda çözülerek önceden hazırlanan 5 mL %10'luk SDS çözeltisinden eklendi. pH'sı 8,3'e getirildi ve son hacim saf su ile 500 mL yapıldı.

**3.3.4.g. Numune tamponu:** 0,5 mL pH:8,0 olan 1 M Tris-HCl çözeltisinden, 1 mL %10'luk SDS çözeltisinden, 1 mL %100'lük gliserinden ve 1 mL %0,1'lik bromtimol mavisinden alındı. Hacim saf suyla 10 mL yapıldı. 9500 µL hazırlanan karışımdan alındı. Üzerine 500 µL β-merkaptoetanol eklendi.

**3.3.4.h. Jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için gereken çözelti:** 50 mL izopropanol, 10 mL TCA ve 40 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

**3.3.4.i. Jel boyama çözeltisi:** 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL su içerisinde 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.

**3.3.4.i. Jel yıkama çözeltisi:** 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL su karıştırılarak elde edildi.

**3.3.4.j. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti:** 50 mL %95'lik etanole 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi eklendi ve reaktif çözündürüldü. Hazırlanan çözelti karışımına 100 mL %95'lik fosforik asit eklendi. Son hacim saf suyla 1 L yapıldı.

### **3.3.5. Western blot analizinde kullanılan çözeltiler**

**3.3.5.a. 1 M Tris/HCl Tamponu (pH:6,8):** 1,21 g Tris tartılıp yaklaşık 90 mL saf suda çözündürüldü. 1 M HCl ile sonra pH:6,8 yapıldıktan sonra son hacim 100 mL yapıldı.

**3.3.5.b. 1,5 M Tris/HCl Tamponu (pH:8,8):** 1,82 g Tris tartılıp yaklaşık 90 mL saf suda çözüldürüldü. 1 M HCl ile sonra pH:8,8 yapıldıktan sonra son hacim 100 mL yapıldı.

**3.3.5.c. 10X TBS Çözeltisi:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris 900 mL saf su içerisinde çözüldürüldü. 1M HCl ile pH 7,4'e ayarlanır ve toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamladı. Otoklavlandıktan sonra kullanıma hazır hale geldi.

**3.3.5.d. PBS Çözeltisi:** 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartıldı. 1 litre saf su eklendikten sonra 1 mL Tween-20 eklendi.

**3.3.5.e. 10X Transfer Çözeltisi:** 29 g Glisin, 58 g tris, 3,7 g SDS 900 mL saf su içerisinde çözüldü ve pH:8,3 yapıldı.

**3.3.5.f. 1X Transfer Çözeltisi:** 10X transfer çözeltisinden 100 mL alındı. Üzerine 700 mL saf su ve 200 mL metanol ilave edildi.

**3.3.5.g. 10X Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisi:** 30,2 g Tris, 188 g glisin, 100 mL %10 SDS 1 litre saf su içerisinde çözüldürüldü.

**3.3.5.h. 5X SDS Yükleme Çözeltisi:** 2,5 mL Tris/HCl çözeltisi, 0,771 g DDT, 0,05 g brom fenol mavisi, 5 mL %50 gliserol, 1 g SDS alındı ve toplam hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Alikuatlara ayrılarak -20°C'de saklandı.

**3.3.5.i. %30 Akrlamid - %0,8 Bisakrilamid:** 37,5 g akrilamid, 1 g bisakrilamid alındı, 128 mL saf suda 37°C'de çözüldürüldü.

**3.3.5.i. %10'luk APS:** 1,8 mL saf suda 0,2 g amonyum persülfat çözdürüldü.

**3.3.5.j. %10'luk SDS:** 9 mL saf suda 1 g SDS çözdürüldü.

**3.3.5.k. %5'lik Bloklama çözeltisi:** 9,5 mL TBS içerisinde 5 g Skim Milk Powder (Yağsız süt tozu) yada Bovinel Serum Albumin (BSA) çözündürüldü.

### **3.3.6. Kinetik çalışmalarda kullanılan çözeltiler**

#### **3.3.6.a. Optimum pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler**

##### **50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 5,0–8,0)**

0,68 g (0,005 mol) Na-fosfat, 90 mL saf su içerisinde çözüldü. pH'sı 1 M NaOH ile ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

##### **50 mM Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH:7,0–8,5)**

0,6055 g (0,005 mol) Tris, 90 mL saf su içerisinde çözündürüldü. pH'sı 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

#### **3.3.6.b. Optimum iyonik şiddet çalışması için kullanılan tampon çözelti**

100, 200 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mM Tris, 90 mL saf su içerisinde çözündürüldü. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH:8,0'a ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL yapıldı.

#### **3.3.6.c. Optimum sıcaklık çalışması için kullanılan tampon çözelti**

0,8 M Tris, 90 mL saf su içerisinde çözündürüldü. pH'sı 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 8,0'a getirildi. Son hacim saf su ile 100 mL yapıldı.

### 3.4. Moleküler Biyolojik Metotlar

#### 3.4.1. Primerlerin hazırlanması

hCA VII geni için özgü reverse primer ve forward primer <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> web sayfasından '*Homo sapiens carbonic anhydrase 7 family (cytosolic) (CA VII), transcript variant 2, mRNA (Nucleotide- NM\_001204889.1)*' transkriplerinin cDNA dizilerine uygun olarak dizayn edildi. Genlere spesifik protein kodlama bölgeleri tespit edildi. Primerler ise protein kodlama bölgesini hem baştan hemde sondan bütün gen bölgesini tam kapsayacak biçimde seçildi.

Tasarlanan primerlerin, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın ve nükleotidlerin dağılımının olabildiğince eşit olmasına dikkat edildi. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> web sayfası kullanılarak dizayn edilen primerler blastlandı. Böylelikle seçilen primerlerin başka bir gene spesifik diziyi de amplifiye edip etmeyeceği belirlenmiş olundu.

Bundan sonra, <http://eu.idtdna.com> adresinden yararlanılarak kullanılacak spesifik primerlerin Tm sıcaklıkları belirlendi.

#### 3.4.2. hCA VII Genine ait dizinin çoğaltılması (Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR))

hCA VII genine ait dizinin amplifikasyonu için oluşturulan forward ve reverse primerler kullanılarak Çizelge 3.3'deki reaksiyon bileşenleri ile Çizelge 3.4'deki gibi PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Sonuçta hCA VII genine ait sekans çoğaltıldı.



**Çizelge 3.3.** hCA VII genine ait PCR karışımı

PCR Bileşeni	Miktar ( $\mu\text{L}$ )
dH <sub>2</sub> O	7,3
Primer R (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,5
Primer F (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,5
Tampon (10X)	1,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,3
dNTP (10 mM)	0,8
Taq Polimeraz (5 EU/ $\mu\text{L}$ )	0,25
cDNA	1,5 (1:10 seyreltilmiş)
<b>Toplam Reaksiyon Hacmi</b>	<b>13,65</b>

**Çizelge 3.4.** hCA VII geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon koşulları

Basamaklar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94°C / 4 dk / 1
Denatürasyon	94°C / 1 dk / 35
Bağlanma (Annealing)	51,5°C / 30 sn / 35
Uzama (Extension)	72°C / 1 dk / 35
Son Uzama	72°C / 5 dk / 1
Bekleme	+4°C / $\infty$

### 3.4.3. DNA agaroz jel elektroforezi

#### a. %1'lik agaroz jelinin hazırlanması

0,8 g agaroz tartıldı. Üzerine 80 mL 1xTAE (Tris/Asetat/EDTA) elektroforez tamponu eklendi. Böylece yaklaşık %1'lik agaroz çözeltisi hazırlanmış oldu. Agarozun çözülmesi için çözelti 2 dakika mikrodalga fırın içerisinde ısıtılmaya bırakıldı. Çözündükten sonra birkaç dakika oda sıcaklığında soğutuldu ve üzerine 5  $\mu\text{L}$  etidyum bromür ilave edilip karıştırıldı. Elektroforez tankına kabarcık oluşturmayacak şekilde boşaltıldı ve tarak dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Çeker ocakta katılaşıncaya kadar bekletildi ve tarak çıkarıldı. 2  $\mu\text{L}$  standart protein kuyucuğa yüklendikten sonra diğer kuyucuklara analiz

edilecek 4  $\mu\text{L}$  numune, izlemeyi kolaylaştırması bakımından 1  $\mu\text{L}$  boya ile karıştırılıp kuyulara yüklendi.

#### **b. Agaroz jelinin yürütülmesi**

PCR ürününü görmek için yatay agaroz jel kullanıldı ve 80 volt elektrik akımında yaklaşık 1 saat yürütüldü. Jelde oluşan bantlar UV jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

#### **3.4.4. Rekombinant vektörün elde edilmesi**

Elde edilen PCR ürünü jelde doğrulandıktan sonra pET SUMO vektörüne aktarılacak üzere Çizelge 3.5’de belirtilen bileşenleri kullanarak ligasyon yapıldı. 16°C’de 16 saat ligasyon işlemi yapıldı. Bunun sonucunda rekombinant vektör elde edildi.

**Çizelge 3.5.** Ligasyon işlemi için kullanılan bileşenler ve miktarları

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
PCR Ürünü	3,0
SUMO vektör	2,0
Ligaz Buffer	2,0
T4 DNA Ligaz	1,0
dH <sub>2</sub> O	2,0

#### **3.4.5. Ligasyon ürününün transformasyonu**

Elde edilen ligasyon ürününün bakterilere transformasyonu için aşağıdaki protokol takip edildi.

a. -80°C’de saklanan *E.coli* (One Shot® Mach1™-T1R) buzda yavaş bir biçimde çözündürüldü. Üzerine 2  $\mu\text{L}$  ligasyon ürünü ilave edildi.

- b. 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- c. İnkübasyondan sonra bakteri hücreleri 42°C’de 30 saniye bekletildi.
- d. Hücreler tekrar buz üzerine alındı.
- e. Buz üzerine alınan tüpe steril kabinde 250 µL S.O.C. besiyerinden ilave edildi.
- f. Tüpün ağzı sıkıca kapatılarak, 37°C’de 200 rpm de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- g. İnkübasyondan sonra hücrelerin 100 µL’si ve 200 µL’si antibiyotik içeren iki ayrı LB agar besiyerine yayıldı ve 37°C’de bir gece inkübe edildi (Champion™ pET SUMO Protein Ekspresyon kiti, 2010).

### 3.4.6. Koloni PCR

Bu işlem, rekombinant vektörü taşıyan kolonileri belirlemek amacıyla hCA VII için dizayn edilen primerlerle gerçekleştirildi. Transformasyon işleminin ardından gerçekleştirilen inkübasyon sonrası besiyerinde gelişen kolonilerden rastgele seçilen 19 koloni belirlenerek herbirine numara verildi. Petriden pipet ucu yardımıyla alınan koloniler kalıp DNA kaynağı olarak kullanıldı. Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’deki gibi PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Pozitif sonuç veren koloniler plazmit izolasyonu için kullanıldı.

**Çizelge 3.6.** Koloni PCR reaksiyon karışımı

PCR Bileşeni	Miktar (µl)
dH <sub>2</sub> O	7,3
Primer R (10 pmol/µL)	0,5
Primer F (10 pmol/µL)	0,5
Tampon (10X)	1,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,3
dNTP (10 mM)	0,6
Taq Polimeraz (5 EU/µL)	0,3
<b>Toplam Reaksiyon Hacmi</b>	<b>≈12 µL</b>

**Çizelge 3.7.** hCA VII için koloni PCR reaksiyon şartları

<b>Basamaklar</b>	<b>Sıcaklık / Süre / Döngü</b>
Ön Denatürasyon	94°C / 10 dk / 1
Denatürasyon	94°C / 1 dk / 35
Bağlanma (Annealing)	51,5°C / 30 sn / 35
Uzama (Extension)	72°C / 1 dk / 35
Son Uzama	72°C / 5 dk / 1
Bekleme	+4°C / ∞

### 3.4.7. Plazmit izolasyonu

Yapılan koloni PCR işlemi sonucunda pozitif sonuç veren koloniler LB sıvı besiyerinde bir gece büyütüldü. Gelişen kolonilerden, daha sonra çapraz PCR yapmak ve ekspresyon konağına transfer etmek için, rekombinant plazmit izole edildi. İzolasyon için DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit (17096, IntronBio) kullanıldı. İzolasyon aşağıda belirtilen şekilde yapıldı;

1. Bir gece 37°C'de LB ortamında büyütülmüş kültürden 1-5 mL alınıp 13000 rpm'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
2. Pelet üzerine 250 µL 'Resuspension Solution' eklenip hücreler süspansiyon edildi.
3. Daha sonra 250 µL 'Lysis Solution' eklenip hafifçe 10 kez ters-düz edildi. Oda sıcaklığında 3 dakika beklendi.
4. Yine aynı tüpe 350 µL 'Neutralization Buffer' eklenip hafifçe tersyüz edildi. 5 dakika buz üzerinde bekletildi.
5. 10 dk 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Sıvı faz, 2 mL'lik tüpe yerleştiriklen spin kolona transfer edildi.
6. Kolon 13000 rpm'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı kısım atıldı.
7. Kolona 700 µL 'Wash Solution' bırakıldı.
8. 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı kısım altıldı.
9. Etanolün uzaklaştırılması için 1 dk boş olarak santrifüj edildi.

10. Kolon yeni bir tüpe alındıktan sonra merkezine 30 µL 'Elution Buffer' eklendi. 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2 dk santrifüj edildi.
11. Kolon atıldıktan sonra plazmit içeren elüsyon -20°C'de saklandı.

#### 3.4.8. Çapraz kontrol PCR reaksiyonu

pET SUMO sisteminde TA klonlama yapıldığından bazen gen ürünü ters bir biçimde bağlanabilmektedir. pET SUMO vektörüne yerleştirilen gen bölgesi, PCR ortamında hem vektöre ait hem de gene ait primerlerle amplifiye edildikten sonra %1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

**Çizelge 3.8** 1. Koloniden izole edilen plazmit ile yapılan çapraz PCR

Reaksiyon	F. Primer	R. Primer	Tahmini uzunluk
1	Gen	Gen	794 bç
2	Vektör	Gen	899 bç
3	Gen	Vektör	947 bç
4	Vektör	Vektör	1052 bç

#### 3.4.9. Gliserolde stoklama

Pozitif sonuç veren koloniler 37°C'de 1 gece LB-kanamisin sıvı besiyerinde inkübasyona bırakıldı. Kültür sıvısı %15'lik gliserol ile karıştırıldı. Alikuatlara ayrılarak hızlıca sıvı azotla dondurulup -80°C'de stoklandı.

#### 3.4.10. *E. coli* hücrelerinden izole edilen rekombinant vektörün dizi analizi

*E. coli* (One Shot® Mach1™-T1R) bakterilerinde elde edilen plazmite (pET SUMO + hCA VII) yerleştirilen genin nükleotid dizisi DNA dizilimi bir ticari firma tarafından (İontek) belirlendi. Elde edilen dizi NCBI (National Center for Biotechnology Information)'a ait <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> web sayfası kullanılarak insan CA VII gen dizilimi ile blastlanarak karşılaştırıldı.

### 3.4.11. Rekombinant plazmitin *E.coli* BL21 (DE-3)'e transformasyonu

Bu işlem pET SUMO ekspresyon kit protokolü izlenerek aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- a. -80°C'de saklanan *E.coli* BL21 (DE-3) buzda yavaş yavaş çözündürüldü.
- b. Çözündükten sonra hücrelere 10 µL izole edilen rekombinant plazmit eklendi.
- c. Hücreler ~30 dk buzda inkübasyona bırakıldı.
- d. 30 saniye 42°C'de bekletilip daha sonra hemen buz üzerine alındı.
- e. Buz üzerine alınan tüpe steril kabinde 250 µL S.O.C. besiyerinden eklendi.
- f. Tüpün ağzı sıkıca kapatılarak 37°C'de 200 rpm de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- g. İnkübasyondan sonra hücreler, 10 mL LB sıvı besiyeri ve 50 µL kanamisin bulunan tüpe alındı. 37°C'de 200 rpm'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.
- h. Tüpe alınan ürünün büyümesi için tüp 37°C'de bir gece inkübe edildi.

### 3.4.12. Pilot (Deneme) ekspresyon

Rekombinant vektörün transfer edildiği hücreler hCA VII geninin ifade edildiğini göstermek için hücreler indükleyici ajan olarak 4 mL IPTG içeren 200 mL sıvı besiyerinde büyütüldü. Bu amaçla izlenen yol şu şekildedir;

1. İki adet erlene 200 mL LB sıvı besiyeri hazırlandı ve otoklavda steril edildi.
2. Her bir besiyerine 1'er mL kanamisin eklendikten sonra 5'er mL rekombinant vektör transfer edilen hücre eklendi.
3. 37°C'de 2,5 saat 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
4. Erlenlerin birine hiçbir şey eklenmedi. Diğer erlene 1 mM konsantrasyona sahip IPTG eklenildi.
5. IPTG eklenen ve eklenmeyen kültür ortamlarından 2 saatte bir numune alındı. Alınan örnekler santrifüj edildi ve süpernatant atılırken pelletler -20°C'ye konuldu.

### 3.4.13. Pilot ekspresyon sonrası hücrelerin parçalanması

-20°C’de muhafaza edilen pelletler üzerine 500 µL lizis tamponu eklendi ve pipetajla çözüldürüldü. Örnekler 3’er defa sıvı azot kullanarak donduruldu ve hemen 42°C’ye alınarak çözüldürüldü. Numuneler santrifüj tüpüne alınarak +4°C’de 13000xrpm’de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelletler alındı.

### 3.4.14. Western blot analizi

Proteinin molekül kütesine göre ayırımının yapılabilmesi için ayırma jeli (Çizelge 3.10) ve yığma jeli (Çizelge 3.11) olmak üzere iki kısımdan oluşan denatüre edici bir jel hazırlandı. Çalışmada 7,5 mL %12’lik ayırma jeli ve 2 mL yığma jeli hazırlandı. Ayırma jeli iki cam plaka arasına döküldükten hemen sonra jelde oluşan hava kabarcıkları izopropanol kullanılarak engellendi. ~15-20 dakika polimerizasyon için beklendi ve jel ters çevrilerek izopropanol uzaklaştırıldı. Daha sonra yığma jeli yüklenerek tekrar polimerize olmasına izin verildi.

**Çizelge 3.9.** SDS jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli için kullanılan mL olarak çözelti miktarları

Jel Yüzdesi	%6	%8	%9	%10	%12
dH <sub>2</sub> O (mL)	7,9	6,9	6,45	5,9	4,9
%30 Akrilamid (mL)	3	4	4,5	5	6
1,5M Tris pH 8,8 (mL)	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
%10 SDS (mL)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
%10 APS (mL)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
TEMED (mL)	0,012	0,009	0,075	0,006	0,006
<b>Toplam (mL)</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

**Çizelge 3.10.** SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli için kullanılan mL olarak çözelti miktarları

<b>Toplam</b>	<b>1 mL</b>	<b>2 mL</b>	<b>3 mL</b>	<b>4 mL</b>	<b>5 mL</b>
dH <sub>2</sub> O	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4
%30 Akrilamid	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83
1,5M Tris pH 6,8	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63
% 10 SDS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
% 10 APS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005

Bradford yöntemi kullanılarak proteinleri jele yüklenmeden önce konsantrasyon ölçümü gerçekleştirildi. 1X SDS yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler 95°C'de 10 dk kaynatıldıktan sonra 10 dk buzda bekletildi. Jel ve numuneler hazırlandı ve jel elektroforez tankına yerleştirilip tank yürütme tamponu ile dolduruldu. Numuneler jele yüklendikten sonra jel, öncelikle 30 dakika 50 voltta sonra da 90 dakika 120 voltta yürütüldü.

Yürütme işlemi bittikten sonra jel kasetinden çıkarılan jelin yığma jeli kısmı kesildi. Ayrıma jeli 1X transfer çözeltisine alındı. Transfer membranı 5 dk metanol ve 5 dk 1X transfer çözeltisi ile muamele edildi. Blotlama cihazına sırasıyla 2 parça blot kağıdı, membran ve yine 2 parça blot kağıdı bırakılıp transfer çözeltisi ile iyice ıslatıldı. Cihaz kapatılıp 1 watt elektriksel alan altında 75 dk blotlama işlemi yapıldı.

Blotlamanın ardından PVDF (polivinilidenflorit) membran 10 dk PBS ile yıkandı. 1 saat oda sıcaklığında bloklama çözeltisi olarak %5'lik yağsız süt tozu içeren bloklama çözeltisi ile muamele edilip 4°C'de 1 gece antikor ile inkübasyona bırakıldı. Membran 5 kez 5 dk PBS ile yıkandı. Femto ve Pico substratları (ECL reagent) kullanılarak antikorun kimyasal sinyal oluşturması sağlandı. Görüntüleme cihazına alınan membranın fotoğrafı çekildi.



### **3.5. Biyokimyasal Metodlar**

#### **3.5.1. Bakteri hücre lizatının hazırlanması**

1. IPTG ile indüklenmiş 500 mL'lik kültür 8000xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 8 mL lizis tamponu ilave edildi.
3. Üzerine 8 mg lizozim eklenerek 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrasında buz içerisinde 20 saniye sonikasyon, 40 saniye bekleme olacak şekilde sonikasyon işlemi yapıldı. Bu işlem 4-5 kez tekrar edildi.
5. Elde edilen hücre lizatı 8000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

#### **3.5.2. Doğal şartlar altında kolondan rekombinant proteinlerin saflaştırılması**

##### **3.5.2.a. ProBond™ kolonun hazırlanması**

Ticari firmadan (İnvitrogen) satın alınan Probond™ nikel şelatlayıcı reçineden 2 mL alınarak protokolünde belirtildiği gibi 1x10 cm'lik kolona paketlenildi. Daha sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. 6 mL steril saf su ilave edilip reçine ters çevrilerek ve kolona hafifçe vurularak yeniden süspansiyon edildi. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı.

Doğal şartlar altında saflaştırma için 6 mL doğal bağlanma tamponu ilave edildi. Reçine ters çevrilerek ve kolona hafifçe vurularak yeniden süspansiyon edildi. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Son işlem tekrarlandı. Daha sonra kolondan dengeleme tamponu (1X Native buffer) geçirildi. 280 nm'de absorbans bakılarak kolonun dengelenip dengelenmediği anlaşıldı.

### 3.5.2.b. Lizatın hazırlanması, kolona tatbiki ve elüsyonu

Ekspresyon aşamasında 1 mM IPTG ile 6 saat indüklenen *E.coli* BL21 (DE-3) bakterisi besiyeri alınarak 11000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Alınan pelletler saflaştırma amaçlı hazırlanan lizis tamponunda çözülerek lizozim ilavesiyle buzda 30 dakika inkübe edildi. Sıvı azotla dondurma-çözme tekniği kullanarak parçalama işlemi yapıldı. Yapılan santrifüj sonrası süpernatant atıldı, pelletler alındı.

Ekspresyon sonucunda elde edilen pelletler lizat tamponunda çözülerek afinite kolonuna tatbik edildi ve kolon gradietli olarak 10 µL, 20 µL ve 30 µL imidazol içeren 15'er mL'lik yıkama tamponu ile yıkandı. Böylece diğer safsızlıklar ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Sonra 3 M imidazolden 1,25 mL içeren 15 mL elüsyon tamponu kolona tatbik edildi ve SUMO-hCA VII enzimi kolondan elüe edildi. Elüatlar 1'er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı.

### 3.5.3. Kantitatif protein tayini

Hücre lizatında ve saflaştırma sonrası elde edilen elüatta bulunan protein miktarı Bradford (1976) metodu ile tayin edildi. Coomassie Brilliant Blue G-250 bu teknikte boya olarak kullanılan bir reaktiftir. Bu reaktif yapısında negatif yük bulundurur. Protein ise bulundurduğu pozitif yükten kaynaklı olarak boyanın negatif yüküne bağlanır. Boyanın 465 nm'de kırmızı ve 595 nm'de mavi olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Proteinin boyaya bağlanması ile kırmızı form mavi forma dönüşür. Tekniğin bozucu olası faktörlere karşı hassasiyeti çok küçük (1-100 µg) seviyelerdedir. Mevcut reaksiyon büyük oranda tekrarlanabilmekte ve hızlı bir şekilde vuku bulmaktadır.

Protein tayini için aşağıdaki prosedür uygulandı.

- a. 1 mL'de 1 mg protein bulunduran BSA çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL konuldu.

- b. Tüplerin hacimleri saf su kullanılarak 100  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandı ve her bir tüpe 4900  $\mu\text{L}$  Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklenerek tüp vorteks ile karıştırıldı.
- c. 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplerden alınan örneklerin köre karşı absorbansları 595 nm'de ölçüldü.
- d. Sonuçta elde edilen absorbans değerlerine karşı gelen  $\mu\text{g}$  protein miktarları ile standart bir grafik çizildi.
- e. Bakteri lizati ve saflaştırma sonrası elde edilen elüattan iki farklı tüpe sırasıyla 100'er  $\mu\text{L}$  alındı ve her iki tüpe 4900'er  $\mu\text{L}$  Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklenerek tüp vorteks ile karıştırıldı.
- f. 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplerden alınan örneklerin köre karşı absorbansları 595 nm'de ölçüldü. Yapılan işlem güvenilirlik açısından 3 kez tekrarlandı ve bu 3 ölçümün aritmetik ortalaması alınarak önceden çizilen standart grafik yardımıyla lizatta ve saflaştırma sonrası elde edilen elüatta bulunan protein miktarı tayin edildi.

#### **3.5.4. hCA VII enziminin aktivite ölçümü**

##### **3.5.4.a. Hidrataz aktivitesi**

Hidrataz aktivitesi yöntemi, Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (Wilbur and Anderson 1948). Metot,  $\text{CO}_2$ 'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan  $\text{H}^+$  iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1 mL 0,025 M pH:8,2 olan veronal tamponu, 0,1 mL % 0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 mL saf su ve en son olarak da 2,5 mL  $\text{CO}_2$  çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 mL oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla  $\text{CO}_2$  çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi rengin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi ( $t_0$ ). Numune tüpüne ise sudan 0,05 mL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak

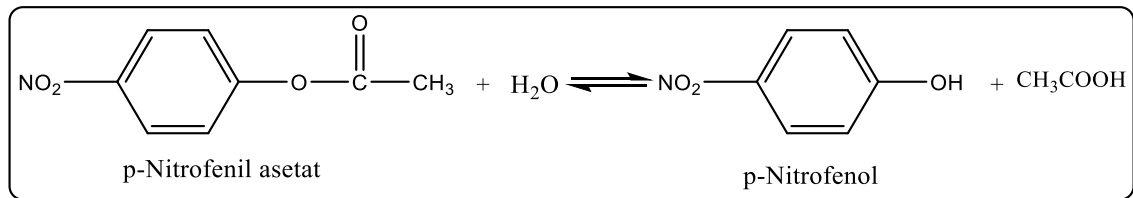
CO<sub>2</sub> çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre bir kronometre yardımıyla belirlendi ( $t_c$ ).

$$EU = \frac{t_o - t_c}{t_c}$$

formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı (Maren 1960). Kinetik ve inhibisyon çalışmaları için esteraz aktivite yöntemi uygulandı.

### 3.5.4.b. Esteraz aktivitesi

Karbonik anhidrazlar esteraz aktivitesi olan enzimlerdir. Yöntemin esası buna dayanmaktadır. Substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil asetat karbonik anhidraz katalizörlüğünde *p*-nitrofenole hidroliz olmaktadır. Yöntem, bu reaksiyonun 348 nm'de absorpsiyon vermesi esasına dayanmaktadır ( $\epsilon_{348} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Verpoorte *et al.* 1967). Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir.



**Şekil 3.1.** Karbonik anhidrazın katalizlediği reaksiyon mekanizması

*p*-nitrofenol'de *p*-nitrofenolat'da 348 nm'de aynı absorbansını vermektedirler. Bu durumda fenol grubunda bulunan H<sup>+</sup> iyonu molekülden ayrışsa da ayrışmasa da ölçüm bu durumdan etkilenmemektedir (Göçer and Gülçin 2013).

1 mL'lik kuvarz küvetler ile 348 nm'de ölçülen enzimin aktivite göstermesi için gerekli reaksiyon ortamı oluşturan çözeltilerin ortamda bulunma miktarı ve sırası Çizelge 3.9'daki gibidir.

**Çizelge 3.11.** Aktivite ölçümü için gerekli çözeltiler

<b>Kullanılan çözeltiler</b>	<b>Kontrol Küveti (µL)</b>	<b>Numune Küveti (µL)</b>
Tris/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,05 M pH:7,4)	400	400
<i>p</i> -Nitrofenil asetat	360	360
Saf su	240	210
Enzim çözeltisi	-	30
<b>Toplam hacim</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

Reaksiyon karışımı Çizelge 3.9'daki gibi hazırlandı. Daha sonra 25°C'de 348 nm'de absorbans değeri okundu ve 3 dakikalık absorbans farkı gözlemlendi. Aktivite tayininde substrat çözeltisi olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetat her gün yeniden hazırlandı.

### **3.5.5. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile rhCAVII enzim saflığının kontrolü**

Saflaştırılan enzimin saflık derecesini kontrol etmek için Laemmli metodu ile %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı (Laemmli 1970). İşlem şu şeklide gerçekleştirildi: Elektroforezde kullanılan camlar başta su ile daha sonrada alkol ile temiz bir şekilde yıkandı. Elektroforez camları üst üste getirildi ve özel kısıkaçlarla sabitleştirildi. Kısıkaçlarla sabitlenen cam plakalar, sızdırmayı engelleyen sünger bulunduran jel hazırlama standına yerleştirildi. Öncelikle ayırma jeli çözeltisi hazırlandı ve plakaların arasında kalan boşluğa dikkatli bir şekilde 0,6 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Plakalar arasındaki jelin polimerleşmesi için kısa bir süre beklendi. Ayırma jelinin polimerleştiğinden emin olduktan sonra yığılma jeli hazırlandı ve polimerleşen ayırma jelinin üstüne pipetle dikkatli bir şekilde dolduruldu. Numuneleri yüklemek için kuyucukların oluşması nedeniyle elektroforez için özel taraklar cam plakalara dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Yığılma jeli de donduktan sonra taraklar dikkatli bir biçimde kuyucukları bozmadan yavaşça çıkartıldı. Tutuculardan çıkarılan içinde jel bulunan cam plakalar elektroforez tankına özel cam plaka tutuculara sabitlendi ve tanka yerleştirildi. Elektroforez tankına yürütme tamponu dolduruldu.

100 µL enzim örneği, 100 µL numune tamponu, 100 µL gliserolden oluşan enzim numunesi 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra bu numuneler ve standart protein dikkatli bir şekilde jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elektroforez tankı kapatıldı. 30 dk 80 voltta yürütme işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra akım 120 volt'a ayarlandı ve boya jelden akıncaya kadar yürütme işlemi gerçekleştirildi. Numunelerin yürütmesinin takibi, numune tamponunda bulunan brom timol mavisi reaktifi ile yapıldı. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra akım kesildi. Plakalar arasında bulunan jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve derhal sabitleştirme çözeltisine alındı. Çalkalayıcı yardımıyla 20 dakika sabitleştirme çözeltisinde karıştırılan jel süre sonunda sabitleştirme çözeltisinden çıkarıldı ve boyama çözeltisine alındı. Jel, 1 gece çalkalayıcıda çalkalandı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra boya çözeltisinden çıkarılan jel son olarak yıkama çözeltisine alındı. Jelin rengi açılıp, protein bantları jelde iyice belirgin olana kadar çalkalandı. Yıkama işlemi ardından görüntüleme cihazına alınan jelin fotoğrafı çekildi.

**Ayrırma jeli hazırlanışı:** Bir beherde 3,75 mL pH:8,8 olan 1M Tris-HCl tampon çözeltisi, 3,3 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi, 0,15 mL %10'luk SDS çözeltisi, 0,1 mL %5'lik TEMED çözeltisi ve 2,35 mL saf su karıştırıldı. Karışıma en son 0,2 mL %1,5'lik PER çözeltisi eklendi ve karışım hemen cam plakalar arasına döküldü.

**Yığıma jeli hazırlanışı:** Bir behere 0,31 mL pH:6,8 olan 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi, 3,325 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,025 mL %10'luk SDS, 0,025 mL %5'lik TEMED ve 1,84 mL saf su karıştırıldı. Karışıma en son 0,05 mL %1,5'lik PER çözeltisi eklendi ve karışım hemen cam plakalar arasına döküldü.

### **3.5.6. SDS-PAGE kullanarak rhCA VII enziminin molekül kütlesi tayini**

Laemmli (1970), metodu ile enzimin molekül kütlesi tayini standart protein kullanarak gerçekleştirildi. Thermo Scientific PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder 26616 standart protein olarak kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin  $R_f$  değerleri hesaplandı ve  $R_f - \log M_K$  standart grafiği çizildi. Daha sonra rekombinant hCA VII (rhCA VII) enzimi için  $R_f$  değeri hesaplanarak elde edilen değer

standart grafikte yerine konuldu. hCA VII enziminin  $\log M_K$ 'si belirlendi. Bulunan bu değerin antilogaritma değeri hesaplanarak rhCA VII enziminin moleköl kütlesi belirlendi.

Proteinlerin  $R_f$  değerleri;  $R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$  formölüne göre hesaplandı ( $X_e$ = Proteinin yürüme mesafesi,  $X_{boya}$ = Boyanın yürüme mesafesi).

### **3.5.7. rhCA VII enzimi için karakterizasyon çalışmaları**

#### **3.5.7.a. rhCA VII enzimi için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar**

rhCA VII enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi için pH:5,0-8,0 aralığında hazırlanan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  tampon çözeltilerini ve pH:7,0-8,5 aralığında hazırlanan Tris/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  tampon çözeltilerini kullanarak her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı (Aslan 2013).

#### **3.5.7.b. rhCA VII enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar**

rhCA VII enziminin optimum iyonik şiddet değerinin belirlenmesi için hazırlanan 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 mM Tris/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  tampon çözeltilerini kullanarak her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı (Aslan 2013).

#### **3.5.7.c. rhCA VII enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar**

rhCA VII enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla ısıtmalı-soğutmalı su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümünde kullanılan 0,8 M pH:8,0 Tris/  $\text{H}_2\text{SO}_4$  tampon çözeltisi ve substrat çözeltisi küvet içerisine alındıktan sonra ilgili sıcaklığa ayarlanan su banyosuna alındı.  $10^\circ\text{C}$  aralıklarla  $0-50^\circ\text{C}$  arasında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi (Aslan 2013).

### 3.5.7.d. rhCA VII enziminin aktivasyon enerjisi (E<sub>a</sub>), aktivasyon entalpisi (ΔH) ve Q10 değerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar

rhCA VII enzimi için, E<sub>a</sub>, ΔH ve Q10 değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu yardımıyla 0°C-50°C arasında 10°C sıcaklık farkıyla, rhCA VII enzim aktivitesi ölçüldü. Daha sonra elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları (log k) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvin'e çevrilerek grafikte 1/T × 1000<sup>-1</sup> olarak ifade edildi (Danişan *et al.* 2004). Daha sonra bu grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak aşağıdaki formüllerden aktivasyon enerjisi (E<sub>a</sub>) ve aktivasyon entalpisi (ΔH) hesaplandı (R:1,987×10<sup>-3</sup> kcal×mol<sup>-1</sup>×K<sup>-1</sup>);

$$Eğim = \frac{-E_a}{2,303 \times R} \quad \Delta H = E_a - (R \times T)$$

(Segel 1968; Onganer *et al.* 1998). Daha sonra bir enzim için, 10°C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan Q10 değeri, aralarında 10°C fark olan iki aktivite değerinden yüksek olan aktivite değerinin, düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı (Keha ve Küfrevioğlu 2009; Aslan 2013).

### 3.5.7.e. p-Nitrofenol (PNF) substratı için K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

p-Nitrofenol substratı için rhCA VII enziminin K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerlerinin belirlenmesinde 5 farklı konsantrasyonda PNF substarat kullanıldı ve enzim aktivitesi ölçüldü. Daha sonra Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Çizilen bu grafikten yararlanılarak K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri bulundu (Aslan 2013).



### 3.6. rhCA VII Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesi

rhCA VII enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda antibiyotik ilave edilerek aktivite ölçümü yapıldı. Kullanılan antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman küvete ilave edilen tampon hacmi azaltılarak antibiyotik konsantrasyonu artırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

### 3.7. İnhibisyon Etkisi Gösteren Antibiyotikler İçin IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler belirlendi. Bu antibiyotiklerden inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanan antibiyotiklerin K<sub>i</sub> değerlerini belirlemek amacıyla rhCA VII enzimi için enzim aktivitesini yarıya düşüren antibiyotik konsantrasyonu ile bu konsantrasyon değerinden az ve fazla iki antibiyotik konsantrasyonu kullanılarak toplamda beş substrat konsantrasyonu ile enzim aktivitesi ölçüldü. Çalışmada kullanılan 5 farklı substrat konsantrasyonu önceden hazırlanan stok çözelti yardımıyla ön denemeler yaparak belirlendi. Sonuçta elde edilen tüm değerler ile her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafikte yarışmalı inhibisyon gösteren inhibitörlerin grafik denklemlerinden K<sub>i</sub> değerinin hesabında;

$$K_M I = K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

formülü kullanılırken; yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon gösteren inhibitörlerin grafik denklemlerinden K<sub>i</sub> değerinin hesabında ise;

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

formülü kullanıldı.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. hCA VII enziminin mRNA ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi

- ✓ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> web sitesinden hCA VII genine ait 1563 nükleotitten oluşan mRNA dizisi belirlendi.
- ✓ Gene ait protein kodlama bölgesi (794 nükleotit) tespit edildi.

#### **NM\_005182.2 Homo sapiens carbonic anhydrase 7 (CA7), transcript variant 1, mRNA**

```

CCGCTGCTTTAAGAGGCTGCTCCGCGGTAGCGAGCGGGGCCGGAGCCGCGAGCCCGAACGAGCGGACCGAG
CCGACCGGGCAGGTGCACGGCTGCGGGGACGGCAGCGGCATGACCGGGCCACCACGGCTGGGGCTACGGC
CAGGACGACGGCCCCCTCGCATTGGCACAAGCTGTATCCCATTTGCCAGGGAGATCGCCAATCACCCATCA
ATATCAICTCCAGCCAGGCTGTGTACTCTCCAGCCTGCAACCACTGGAGCTTTCCTATGAGGCCTGCAT
GTCCCTCAGCAICACCAACAATGGCCACTCTGTCCAGGTAGACTTCAATGACAGCGATGACCGAACCGTG
GTGACTGGGGGCCCCCTGGAAGGGCCCTACCGCCTCAAGCAGTTTCACTTCCACTGGGGCAAGAAGCACG
ATGTGGGTTCTGAGCACACGGTGGACGGCAAGTCCTTCCCCAGCGAGCTGCATCTGGTTCAGTGGAAATGC
CAAGAAGTACAGCACTTTTGGGGAGGCGGCCCTCAGCACCTGATGGCCTGGCTGTGGTTGGTGTTTTTTTG
GAGACAGGAGACGAGCACCCACAGCATGAATCGTCTGACAGATGCGCTCTACATGGTCCGGTTCAAGGGCA
CCAAAGCCCAGTTCAGCTGCTTCAACCCCAAGTGCCTCCTGCCTGCCAGCCGGCACTACTGGACCTACCC
GGGCTCTCTGACGACTCCCCACTCAGTGAGAGTGTCACTGGATTGTGCTCCGGGAGCCCATCTGCATC
TCTGAAAGGCAGATGGGGAAGTTCGGGAGCCTGCTTTTTACCTCGGAGGACGATGAGAGGATCCACATGG
TGAACAACCTCCGGCCACCACAGCCACTGAAGGGCCGCGTGGTAAAGGCCCTCCTTCCGGGCCTGAGCTGC
CCATCTGCCTAGCCGGCCACTAGGGCACCATCTTCTCAAGGGCTTCCATGTCAGCAGACACCAAACCATC
TGAGGCTTCTCCCTGGGGGGTGCTGGGGACCCTCCTTCAGCCAGTTTGCTCCTTGGTACCCTGGAGGC
TTCTGGATGGGACCCTTGAGTCTGGGGCACCCTTCAGCTGCCCTGGGGACAGGAAGGACAGGAGCTAAGC
AGGGTCCAAGCCTGGGGCTGCCTCTGCTCTCCAAGACCCAAAGACCCTGGGAACCTCCTCTGGTCTTCCC
CACTGGCAGTGGCAGCAGCCCCACCCGAGCGCACACTGTGATGGAGGAGACTGAGCTCCCTGGGGCGGG
CAGCTGACACTACCAGAGAGACTCAAGCAATAATTAGAGGTGGGCAGAGCTGCCCTCTCGGCATTACCTC
TTCTGCAGGCTCTGCCATGCACGCACCTCACTGCCAGGCCATTAAAATCAGCACCCAGCATGCTGGAGGT
GACGTGGCCTTCTCCCTCCAGCCACCTGCTGCCACGGGCAGGCCCTGGCTATAGCTTATACAGTATCTCC
CCTTGTCCCCACCCAGTCACCAAAGCCACCTACATGACAGTCCATCCCTGTTGAATTAATAAATTAATGT
ATCCATGCAACAAAAAAAAAAAAA

```

Şekil 4.1. İnsan CA VII mRNA kodlayan nükleotid dizisi

#### 4.2. hCA VII Enziminin Aminoasit Dizisi

"MTGHHGWGYGQDDGPSHWHKLYPIAQGDRQSPINIISSQAVYSPSLQPLELSY  
EACMSLSITNNGHSVQVDFNDSDDRTVVTTGGPLEGPYRLKQFHFHWGKKHDV  
GSEHTVDGKSFSELHLVHWNACKYSTFGEEAASAPDGLAVVGVFLETGDEHPS  
MNRLTDALYMRFKGTAKQFSCFNPKCLLPASRHYWTYPGSLTTPPLESVTW  
IVLREPICISERQMGKFRSLLFTSEDDERIHMVNNFRPPQPLKGRVVKASFRA"

#### 4.3. hCA VII Genine Ait Primerlerin Belirlenmesi

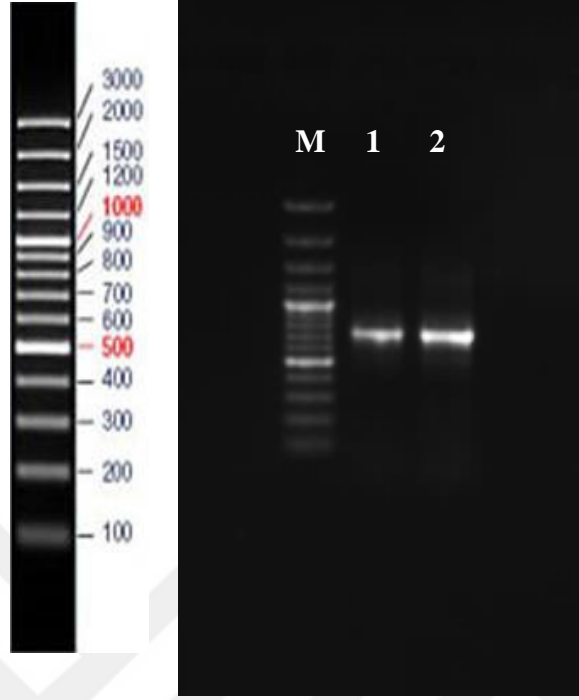
Primerler protein kodlama bölgesinin başından ve sonundan tüm geni kapsayacak biçimde seçildi. Tasarlanan primerler data banklarda bulunan DNA sekansları ile blastlanarak hCA VII genleri ile en yüksek benzerliği (%100) gösterdiği tespit edildi.

**Çizelge 4.1.** hCA VII genine ait dizayn edilen primer bilgileri

Primer	Sekans (5'-3')	Tm	Uzunluk
<b>Forward</b>	ATTGGCACAAGCTGTATCCC	52°C	20 bç
<b>Reverse</b>	AAGGAGGCCTTTACCAC	43°C	17 bç

#### 4.4. cDNA Kütüphanesinden hCA VII Geninin PCR İle Çoğaltılması

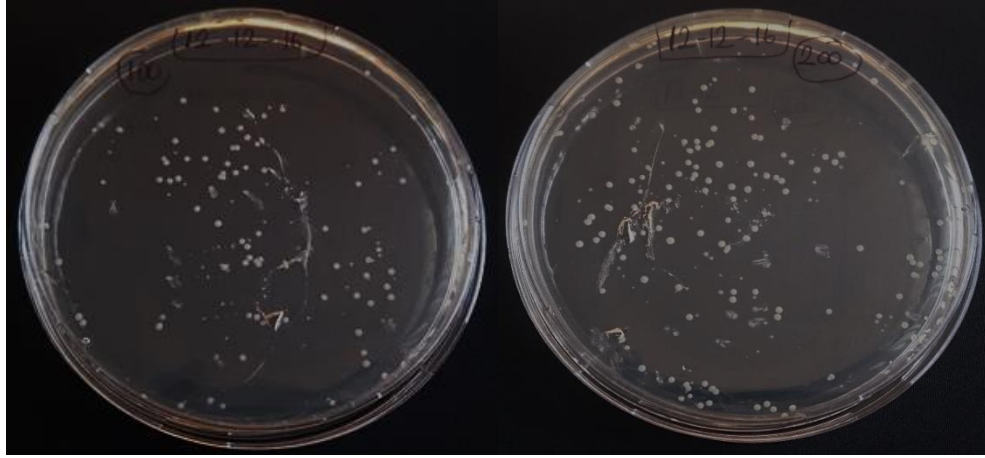
Ticari bir firmadan (İnvitrogen) hazır olarak satın alınan insan beyin cDNA'sı kullanılarak gene özgü primerler ile PCR işlemi yapıldı. Yapılan PCR denemeleri sonucunda hCA VII primerlerin bağlanma sıcaklığı 51,5°C olarak belirlendi.



**Şekil 4.2.** PCR sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M; Marker (100 bç) 1 ve 2; PCR ürünleri)

#### **4.5. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi ve Konak Organizmaya Transformasyonu**

Dizayn edilen primerler ile PCR’da çoğaltıldıktan sonra ilgili gen bölgesinin (hCA VII) vektöre (pET SUMO) yerleştirilmesi için ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen muhtemel rekombinant vektör, konak mikroorganizmaya aktarılarak işlemin doğru bir şekilde yapıp yapılmadığını kontrol etmek için LB agar-kanamisin besiyeri üzerinde büyümeye bırakıldı. 37°C’de gece boyu süren inkübasyon sonrası 100 µL ve 200 µL ekim yapılan besiyerlerinin tümünde koloni oluşumu gözlemlendi.



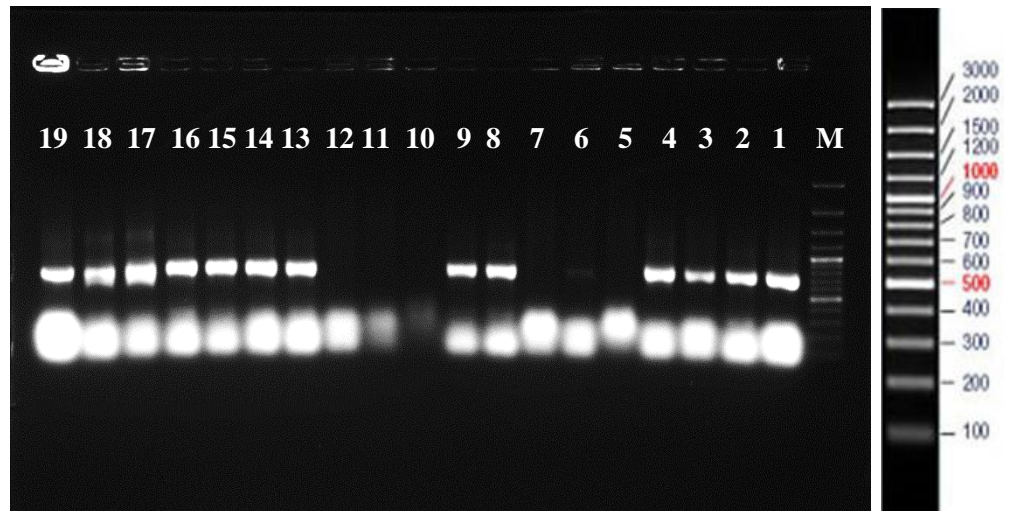
A

B

**Şekil 4.3.** İnkübasyon sonrası büyüyen transforme edilmiş bakteri kolonileri (A: 100  $\mu$ L ve B:200  $\mu$ L yayılmış transforme bakteri kolonileri)

#### 4.6. Koloni PCR

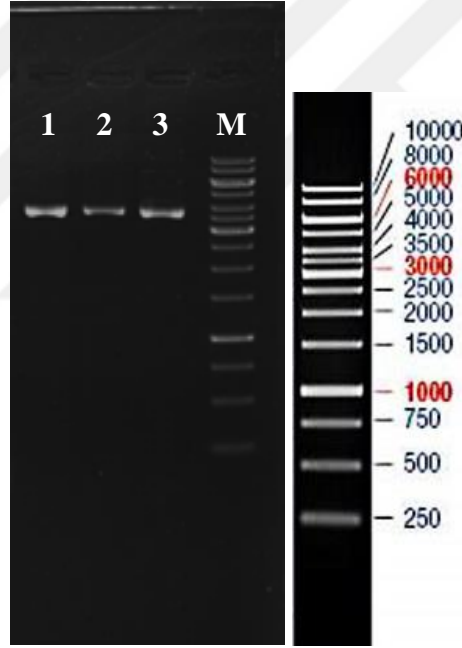
Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerden rekombinant vektörü taşıyanı belirlemek amacıyla rastgele seçilip numaralandırıldıktan sonra PCR'da kalıp DNA olarak kullanıldı. Seçilen kolonilerden gene ait primerlerle PCR yapıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ilgili geni doğru şekilde alan plazmitin 1, 2, 3, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ve 19. kolonilerde olduğu görüldü.



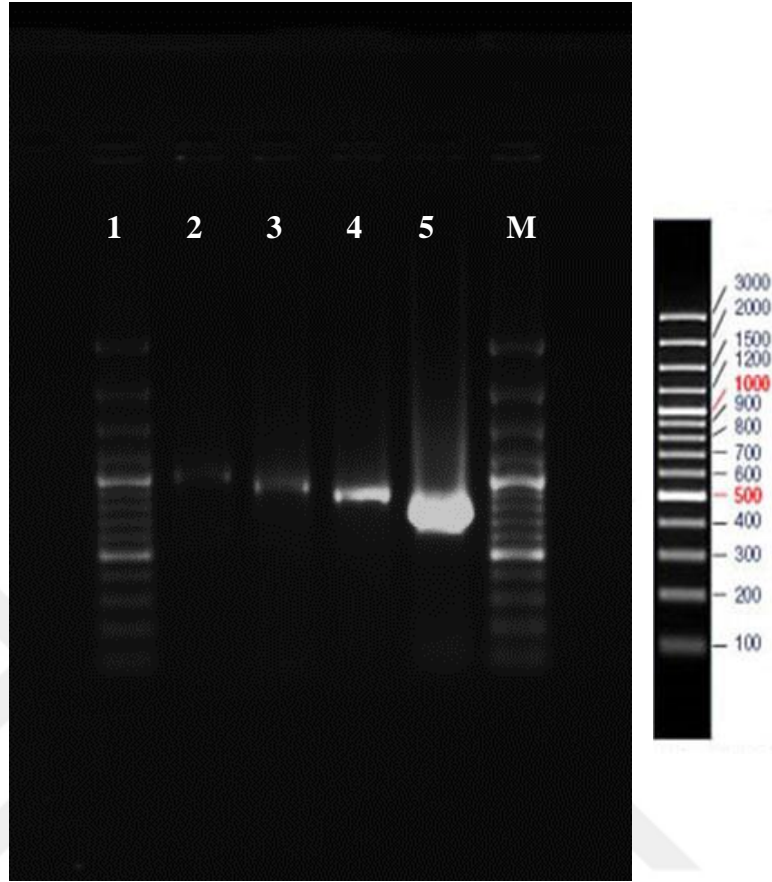
**Şekil 4.4.** Agaroz jel elektroforezinde yürütülen koloni PCR ürünleri (M; Marker (100 bç) 1,19; koloni PCR ürünleri.)

#### 4.7. Plazmit İzolasyonu ve Çapraz Kontrol PCR

Koloni PCR sonucunda elde edilen 1. koloni bir gece kanamisin içeren LB sıvı besiyeri ortamında büyütüldü. Daha sonra plazmit izolasyonunda kullanıldı ve elde edilen plazmitlerin doğruluğunu ispat etmek için plazmit agaroz jelde yürütülüp görüntüledi. Plazmit izolasyonu sonrasında elde edilen plazmitlerden de 4 farklı PCR yapıldı. Böylece genin vektöre doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediği kontrol edildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, koloni PCR'dan elde edilen sonuçları doğrular nitelikte 1. koloniden elde edilen plazmitte genin doğru şekilde yerleştiği sonucuna varıldı.



**Şekil 4.5.** İzole edilen plazmitin agaroz jel görüntüsü  
(M; Marker (1000 bç) 1, 2, 3; Plazmit)



**Şekil 4.6.** İzole edilen plazmit ile gerçekleştirilen PCR sonrası agaroz jel görüntüsü (M; Marker (100 bç),

1 numaralı kuyu; vektörün forward ve vektörün reverse primerleriyle yapılan PCR sonucu,  
 2 numaralı kuyu; vektörün reverse genin forward primerleriyle yapılan PCR sonucu,  
 3 numaralı kuyu; vektörün forward genin reverse primerleriyle yapılan PCR sonucu,  
 4 numaralı kuyu; genin forward ve reverse primerleriyle yapılan PCR sonucu)

#### 4.8. pET SUMO Vektörüne Yerleştirilen Genin Dizi Analizi

Seçilen *E.coli* (One Shot® Mach™-T1R) bakteri kolonisinden izole edilen pET SUMO hCA VII plazmitinin, muhtemel dizilimi bir ticari firma tarafından (İontek) belirlendi. Alınan dizileme sonuçları blastlandığında hCA VII dizisi ile %99 benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.7).



Download ▾ GenBank Graphics

Homo sapiens carbonic anhydrase 7 (CA7), transcript variant 2, mRNA  
Sequence ID: [NM\\_001014435.1](#) Length: 1715 Number of Matches: 1

Range 1: 317 to 1046 GenBank Graphics

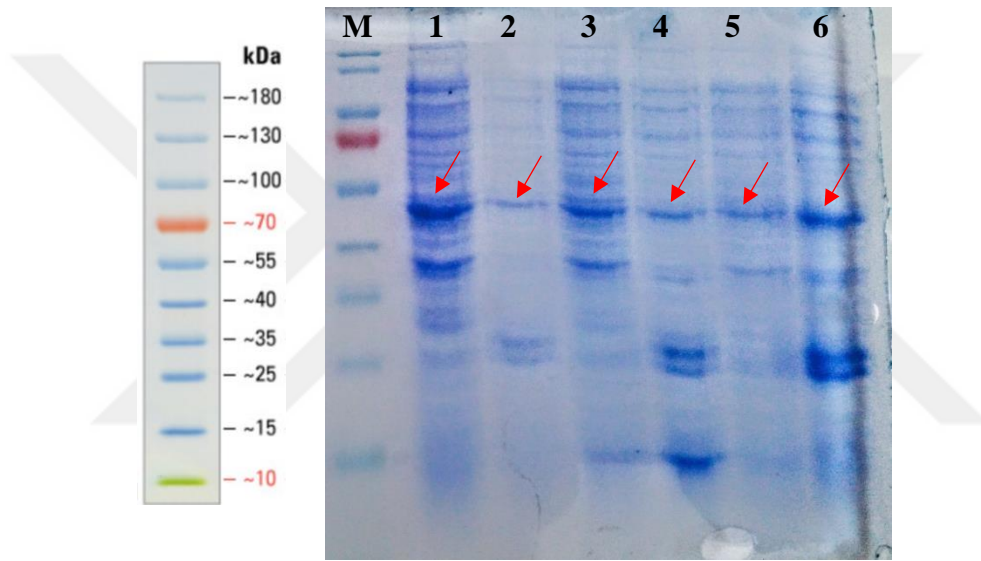
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1083 bits(586)	0.0	724/731(99%)	1/731(0%)	Plus/Plus
Query 72	ACAAGTTGSATCACACAGCCCAGGGAGATCGCCATTACCCATCAATATCATCTCCAGCC			131
Sbjct 317	ACAAGTTGSATCACACAGCCCAGGGAGATCGCCATTACCCATCAATATCATCTCCAGCC			376
Query 132	ATGCTGTGACTCTCCCAGTACTGCCACCACTGTAGATTTCCATGAAGCCTGCATGACC			191
Sbjct 377	ATGCTGTGACTCTCCCAGTACTGCCACCACTGTAGATTTCCATGAAGCCTGCATGACC			435
Query 192	CTCCTCATCACCAACAATGGCCACTCTGTCCATATATACTTCAATGACAGCAATGACCGA			251
Sbjct 436	CTCCTCATCACCAACAATGGCCACTCTGTCCATATATACTTCAATGACAGCAATGACCGA			495
Query 252	AAAGCGGTGACTGTGGGCCCACTGC AAGGTCCTACCGCCTCAAGCAGTTTCACTTCCAC			311
Sbjct 496	AAAGCGGTGACTGTGGGCCCACTGC AAGGTCCTACCGCCTCAAGCAGTTTCACTTCCAC			555
Query 312	TGCGCCCGAAGCACGATGTGGTTCTGAGCACACGGTGSACGGCAAGTCTTCCCGCAGC			371
Sbjct 556	TGCGCCCGAAGCACGATGTGGTTCTGAGCACACGGTGSACGGCAAGTCTTCCCGCAGC			615
Query 372	GAACTGTATCTGGTTCCTGGAATGCCAACAAAGTACAGTACTTTTGGGGAGGGGCTCA			431
Sbjct 616	GAACTGCATCTGGTTCCTGGAATGCCAACAAAGTACAGTACTTTTGGGGAGGGGCTCA			675
Query 432	CCACCTGATGGCCTGCCTGTGAAATGGTGTCTTTTGGAGACAGGACACCAGCACCCCGC			491
Sbjct 676	GCACCTGATGGCCTGCCTGTGAAATGGTGTCTTTTGGAGACAGGACACCAGCACCCCGC			735
Query 492	ATGAATCGTCTGACATATGCGCTCTACATGGCCCGG-TCAAGGGCACCAAATCCCAGTTC			551
Sbjct 736	ATGAATCGTCTGACATATGCGCTCTACATGGCCCGG-TCAAGGGCACCAAATCCCAGTTC			795
Query 552	AGCTGCTTCAACCCCAAGTGCCTCCTGCCTGCCAGCCGGCACTACTGGACCTACCCGGGC			611
Sbjct 796	AGCTGCTTCAACCCCAAGTGCCTCCTGCCTGCCAGCCGGCACTACTGGACCTACCCGGGC			655
Query 612	TCTCTGACGACTCCCCCACTCAGAGAGAGTGTACCTGGATTGTGCTCCGGGAGCCCATC			671
Sbjct 856	TCTCTGACGACTCCCCCACTCAGAGAGAGTGTACCTGGATTGTGCTCCGGGAGCCCATC			915
Query 672	TGCATCTCTGAAAGGCAGATGGGGAAGTTCGGAGCCCTGCTTTTACCTCGGAGGACGAT			731
Sbjct 916	TGCATCTCTGAAAGGCAGATGGGGAAGTTCGGAGCCCTGCTTTTACCTCGGAGGACGAT			975
Query 732	GAGAGGATCCACATGGTGAACAACCTCCGGCCACCACAGCCACTGAAGGGCCCGTGGTA			791
Sbjct 976	GAGAGGATCCACATGGTGAACAACCTCCGGCCACCACAGCCACTGAAGGGCCCGTGGTA			1035
Query 792	AAGGCCTCCTT 802			
Sbjct 1036	AAGGCCTCCTT 1046			

Şekil 4.7. Dizileme sonucunun hCA VII dizisi ile blastlama sonucu

#### 4.9. IPTG Kullanılarak İstenilen Genin Pilot Ekspresyonu

İçerisinde pET-SUMO-hCA VII plazmitini taşıyan *E.coli* BL21 (DE-3) bakteri hücreleri, içinde 50 µL kanamisin bulunan 10 mL'lik LB sıvı besi yerine inkübe edildi ve 37°C'de 200 rpm'de bir gece bekletildi. İnkübasyondan sonra bu kültürden 2'şer mL alınarak içinde 1 mL kanamisin bulunan 200 mL'lik 2 ayrı sıvı besiyerine inkübe edildi. 2,5 saatlik

inkübasyondan sonra 50 mM IPTG stoğundan son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde alınarak erlenlerin birine eklendi ve 2 saat 37°C'de 230 rpm'de çalkalandı. Her iki saatte bir erlenlerden yaklaşık 15'er mL örnek alındı ve 11000xg'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelletler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Peletler 500 µL liziz tamponunda çözüldü. 3 defa sıvı azotla dondurulup 42°C'de çözüldü. 4°C'de 23000xg'de 5 dakika numuneler santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve peletler alındı. Süpernatant SDS-PAGE'de görüntülendi.



**Şekil 4.8.** IPTG ile indüklenen ve indüklenemeyen hücelere ait SDS-PAGE fotoğrafı

(M; Standart,

1 numaralı kuyu; 2. saatin sonundaki IPTG eklenmemiş numune örneği,  
2 numaralı kuyu; 2. saatin sonundaki IPTG eklenmiş numune örneği,  
3 numaralı kuyu; 4. saatin sonundaki IPTG eklenmemiş numune örneği,  
4 numaralı kuyu; 4. saatin sonundaki IPTG eklenmiş numune örneği,  
5 numaralı kuyu; 6. saatin sonundaki IPTG eklenmemiş numune örneği,  
6 numaralı kuyu; 6. saatin sonundaki IPTG eklenmiş numune örneği).

#### 4.10. Western Blot Analizi

Western blot analizi ile hedef proteinin rekombinant olarak üretilip üretilmediği kontrol edildi. IPTG ile indüklenen *E. coli* hücrelerinden elde edilen lizatta rekombinant proteinin var olduğu görüldü. Kontrol amaçlı olarak yapılan ve IPTG ile indüklenmeyen bakterilerin ise ilgili proteini üretmediği tespit edildi (Şekil 4.9).



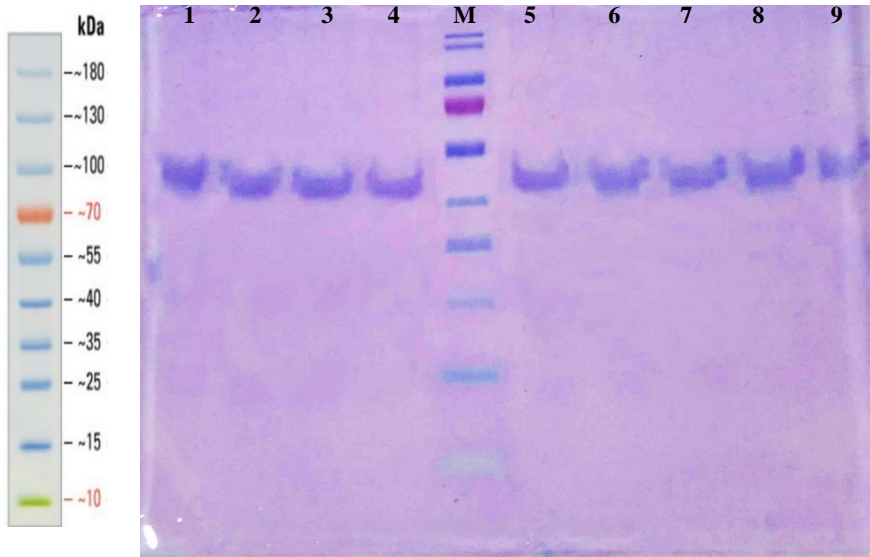
**Şekil 4.9.** Western blot analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü

(1; IPTG ile indüklenen hücre lizatı, 2; IPTG ile indüklenmeyen hücre lizatı)

Şekil 4.9’da yaklaşık 45 kDa büyüklüğünde bir bant gözlenmiştir. rhCA VII’ye ait moleküler ağırlık yaklaşık 30 kDa olarak hesaplanmaktadır (645 aa x 110 Da). Üretilen protein SUMO ve 6xHis içeren füzyon protein olduğuna göre (SUMO: ~11 kDa ve 6xHis: 4 kDa) jelde elde edilen bant hedef ürüne ait olduğu sonucuna varılabilir.

#### 4.11. Doğal Şartlar Altında Afinite Kolonundan Proteinin Saflaştırılması

8 mL’lik lizat kolona yüklendi. Bağlanma tamponuna 10 mM imidazol konuldu. Kolonun yıkama işlemi yapılarak sonrasında gradientli olarak 10 µL, 20 µL ve 30 µL imidazol içeren elüsyon tamponlarıyla protein elüe edildi. Elüsyon sonucu 280 nm’deki absorbansı yüksek çıkan elüatlar için SDS-PAGE yapıldı ve proteine ait tek bant görüldü.



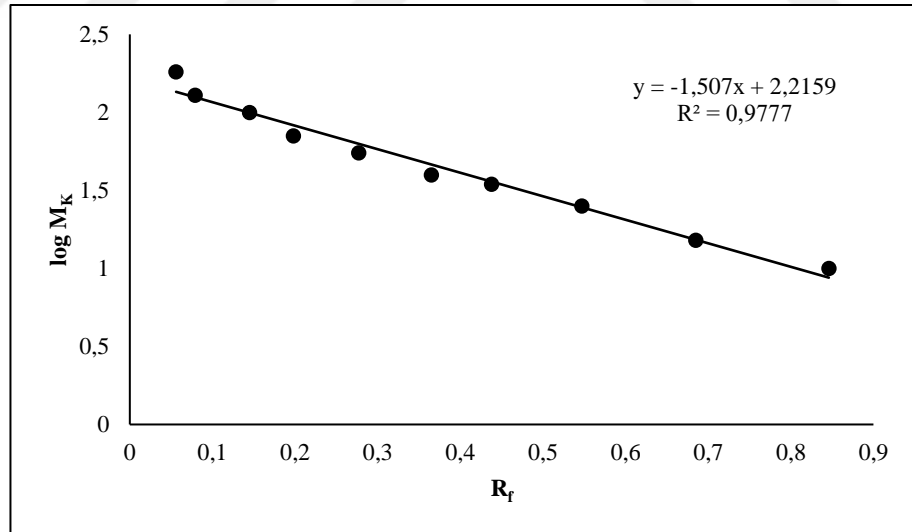
**Şekil 4.10.** Saflaştırılan SUMO-hCA VII enziminin SDS-PAGE fotoğrafı (M; standart, 1-9 nolu kuyular SUMO-hCA VII füzyon proteini)

#### 4.12. Diyaliz

Kolondan alınan numune, diyaliz torbasına alındı ve imidazolün uzaklaştırılması için 5 mM Na-fosfat (pH:8,0) tampon çözeltisine karşı 2 saat diyaliz edildi. Diyaliz işlemi +4°C’de gerçekleştirildi.

#### 4.13. SUMO-hCA VII Füzyon Proteinin SDS-PAGE İle Mol Kütlesinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

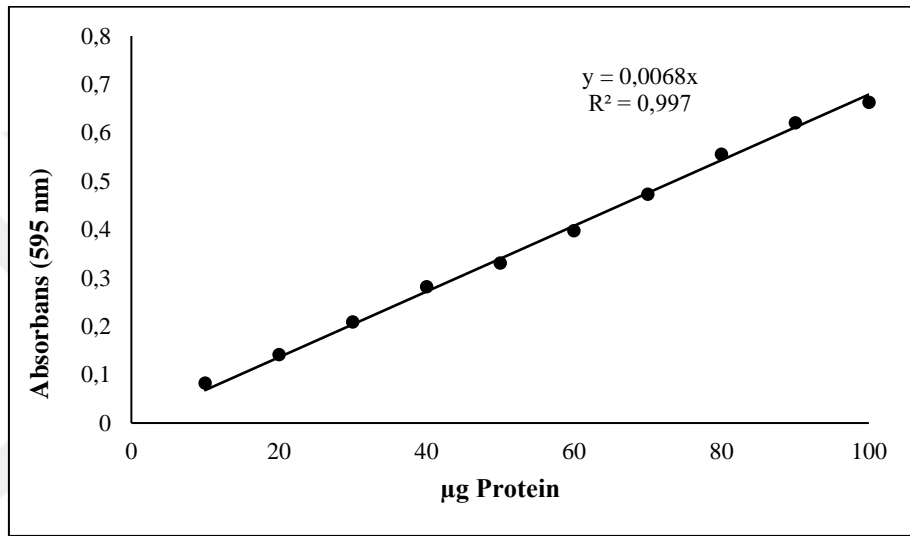
Saflaştırılan rekombinant hCA VII enzimi SDS-PAGE’de yürütüldü ve görüntüleme cihazında görüntülenerek fotoğrafı çekildi (Şekil 4.10). Enzim ve her bir standart protein için jelde yürüme mesafeleri ölçüldü ve  $R_f$  değerleri hesaplandı.  $R_f$  -  $\log M_K$  değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.11). Grafikten faydalanılarak enzimin molekül kütlesi yaklaşık 46,77 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.11. SDS-PAGE ile çizilen  $R_f$  -  $\log M_K$  grafiği

#### 4.14. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Hem lizatta hem de kolondan alınan elüsyonda bulunan protein miktarını tayin etmek için Bradford yöntemi kullanıldı. Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı gibi çizilen standart grafik yardımıyla afinite kromatografisi tekniği kullanılarak yapılan saflaştırmayla elde edilen elüsyonun protein miktarı belirlendi.



Şekil 4.12. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

Çizelge 4.2. SUMO-hCA VII füzyon proteinin afinite kolonu ile saflaştırma sonuçları (Esteraz aktivitesi sonuçları)

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Hacim (mL)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Lizat	0,84	2,52	8	6,72	20,16	0,33	100	1
Ni reçineli afinite kolonundan saflaştırılan SUMO-hCAVII	3,23	0,46	1	3,23	0,46	7,02	48,07	21,27

**Çizelge 4.3.** SUMO-hCAVII füzyon proteinin afinite kolonu ile saflaştırma sonuçları (Hidrataz aktivitesi sonuçları)

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Hacim (mL)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Lizat	40	2,52	8	320	20,16	15,87	100	1
Ni reçineli afinite kolonundan saflaştırılan SUMO-hCAVII	100	0,46	2	200	0,92	217,39	62,5	13,69

#### 4.15. Rekombinant hCA VII Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

##### 4.15.1. Optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

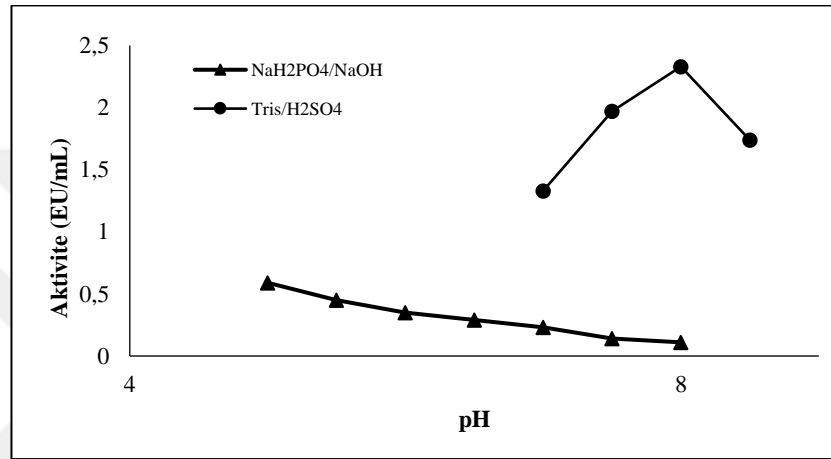
rhCA VII enziminin optimum pH'sını belirlemeye yönelik çalışmada pH'sı 5,0-8,0 aralığında olan 50 mM sodyum fosfat ve pH'sı 7,0-8,5 aralığında olan 50 mM Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözeltileri kullanılarak enzimin aktivitesi ölçüldü (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5, Şekil 4.13). Yapılan çalışmalar neticesinde rhCAVII enzimi için optimum pH'nın 8,0 olduğu tespit edildi.

**Çizelge 4.4.** 50 mM Na-Fosfat tampon çözeltisi ile rhCA VII enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan enzim aktivitesi ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EU/mL)
5,0	0,59
5,5	0,45
6,0	0,35
6,5	0,29
7,0	0,23
7,5	0,14
8,0	0,11

**Çizelge 4.5.** 50 mM Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi ile rhCA VII enziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan enzim aktivitesi ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EU/mL)
7,0	1,33
7,5	1,97
8,0	2,33
8,5	1,74



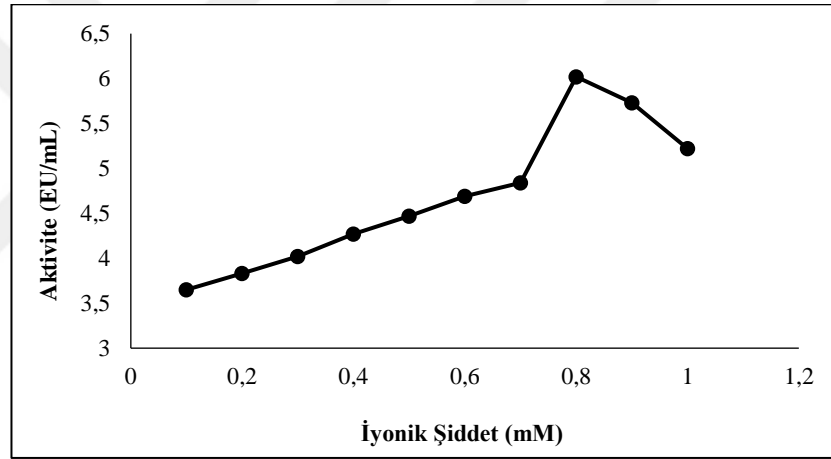
**Şekil 4.13.** rhCA VII enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi çalışması sonucuna yönelik çizilen aktivite-pH grafiği

#### 4.15.2. Optimum iyonik şiddetin bulunmasına yönelik sonuçlar

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum iyonik şiddeti belirlemek amacıyla Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponunun optimum pH'daki 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 mM'lık tampon çözeltileri hazırlandı. rhCA VII enzimi aktivite ölçümleri farklı Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonlarında yapıldı ve Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonuna (mM) karşı aktivite değerlerinden (EU/mL) oluşan grafik çizildi (Çizelge 4.6, Şekil 4.14). Yapılan çalışmalar sonucu rhCA VII enzimi için optimum iyonik şiddetin 800 mM Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi olduğu tespit edildi.

**Çizelge 4.6.** rhCA VII enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[Tris/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (mM)	Aktivite (EU/mL)
100	3,65
200	3,83
300	4,02
400	4,27
500	4,47
600	4,69
700	4,84
800	6,02
900	5,73
1000	5,22



**Şekil 4.14.** Değişik konsantrasyonlardaki pH:8,0 olan Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak rhCA VII enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği

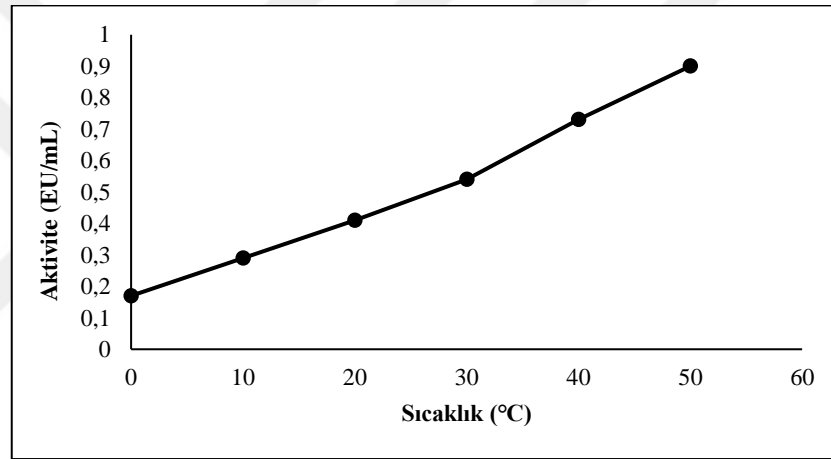
#### 4.15.3. Optimum sıcaklığın bulunmasına yönelik sonuçlar

rhCA VII enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip tampon çözelti kullanıldı. 0°C-70°C arasında 10°C'lik sıcaklık farkı oluşturularak enzim aktivite ölçümü yapıldı (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.15). Sonuç olarak rhCA VII enzimi için optimum sıcaklığın 50°C olduğu tespit edildi.



**Çizelge 4.7.** rhCA VII enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EU/mL)
0	0,17
10	0,29
20	0,41
30	0,54
40	0,73
50	0,90
60	-
70	-



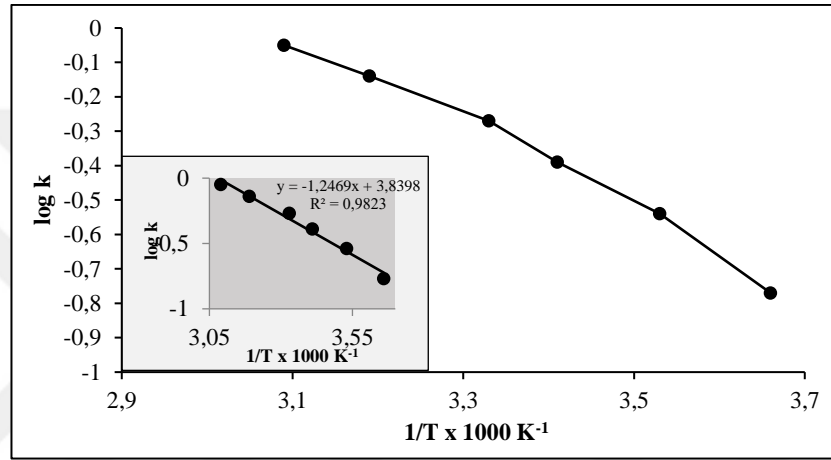
**Şekil 4.15.** rhCA VII enzimi için optimum sıcaklığı belirlemek için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

#### 4.15.4. Aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ), aktivasyon entalpisi ( $\Delta H$ ) ve Q10 değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

rhCA VII enzimi için optimum sıcaklık çalışmalarında elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak  $\log k^{-1}/T$  grafikleri çizildi. Bu grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi. Sonuçlar Çizelge 4.8 ve Şekil 4.16'de gösterildiği gibidir. Bu ölçümler sonucunda  $E_a$ :1,843 kcal/mol,  $\Delta H$ :1,199 kcal/mol ve Q10:1,4 olarak belirlendi.

**Çizelge 4.8.** rhCA VII enzimi için aktivite ölçümünün logaritma değerleri

$1/T \times 1000 \text{ K}^{-1}$	$\log k$
3,09	-0,05
3,19	-0,14
3,30	-0,27
3,41	-0,39
3,53	-0,54
3,66	-0,77

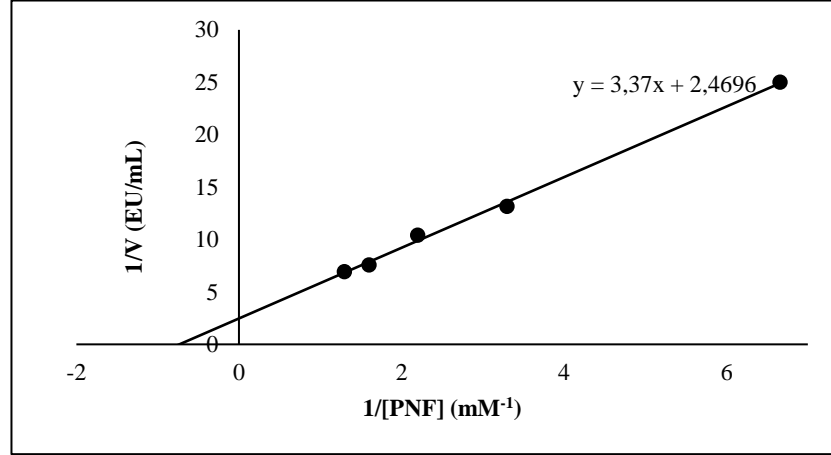


**Şekil 4.16.** rhCA VII enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

#### 4.16. PNF Substratı İçin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışma Sonuçları

rhCA VII enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesinde substrat olarak kullanılan PNF çözeltisinden en az beş farklı PNF konsantrasyonu (50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 150  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$ ) kullanıldı ve optimum şartlar altında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlarla Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve grafik denkleminde  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini bulmak için hesaplama yapıldı.

rhCA VII enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek üzere bölüm 3.5.7.e’de bahsedilen çalışma yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17’de gösterildi. Bu çalışmalar sonucu  $K_M$ :1,36 mM ve  $V_{max}$ :0,405 EU/mL olarak hesaplandı.



**Şekil 4.17.** rhCA VII enzimi için 5 farklı PNF konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

#### 4.17. rhCA VII Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için;

$$K_M I = K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

formülü ile  $K_i$  hesaplanırken, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için ise;

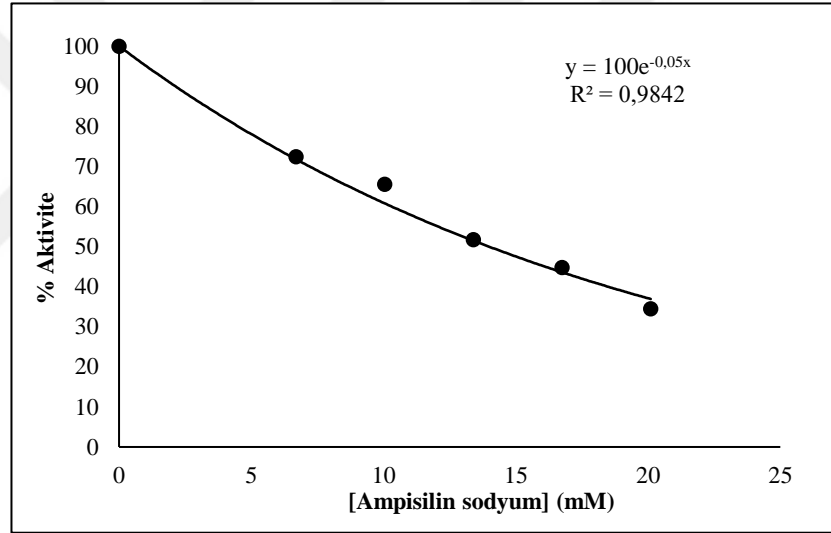
$$V_{max} I = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

formülü kullanılarak  $K_i$  değeri hesaplandı.

Bu çalışmada bakteri tarafından üretilen ve saflaştırılan rhCA VII enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlar altında araştırıldı.

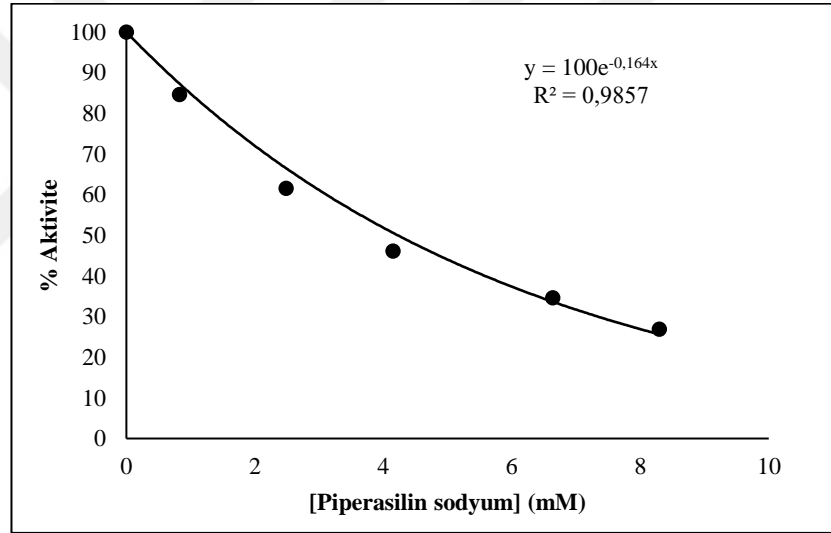
**Çizelge 4.9.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine ampisilin sodyumun etkisi

%Aktivite	[Ampisilin sodyum] mM
100	0
72,41	6,7
65,52	10,05
51,72	13,4
44,83	16,75
34,48	20,1

**Şekil 4.18.** Ampisilin sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.10.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine piperasilin sodyumun etkisi

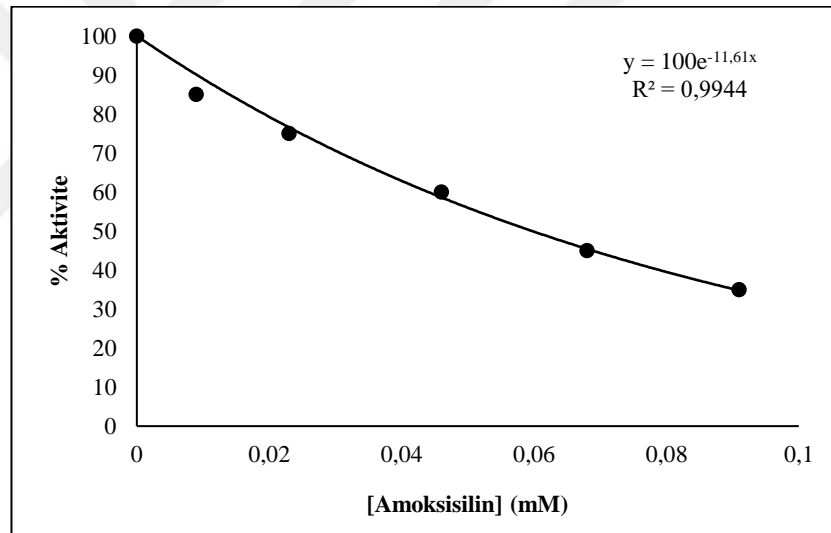
%Aktivite	[Piperasilin sodyum] mM
100	0
84,62	0,83
61,54	2,49
46,15	4,15
34,62	6,64
26,92	8,3



**Şekil 4.19.** Piperasilin sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

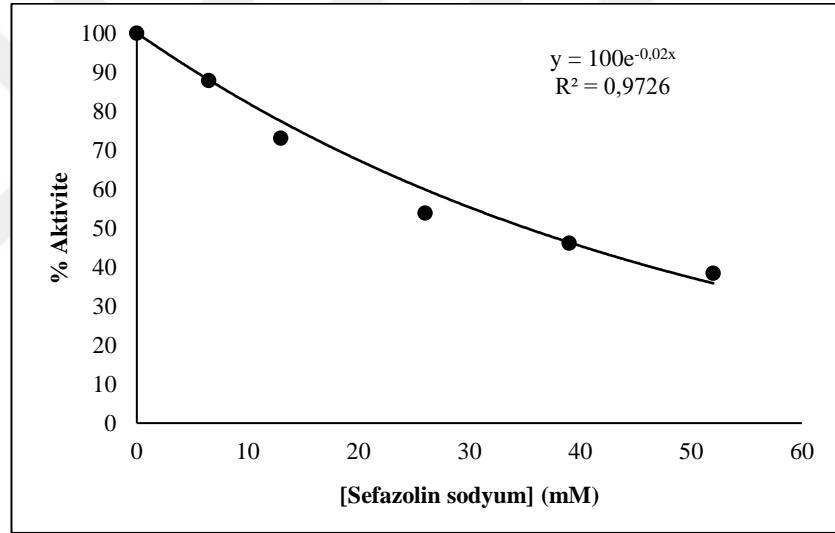
**Çizelge 4.11.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine amoksisilinin etkisi

%Aktivite	[Amoksisilin] mM
100	0
85	0,009
75	0,023
60	0,046
45	0,068
35	0,091

**Şekil 4.20.** Amoksisilinin rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.12.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyumun etkisi

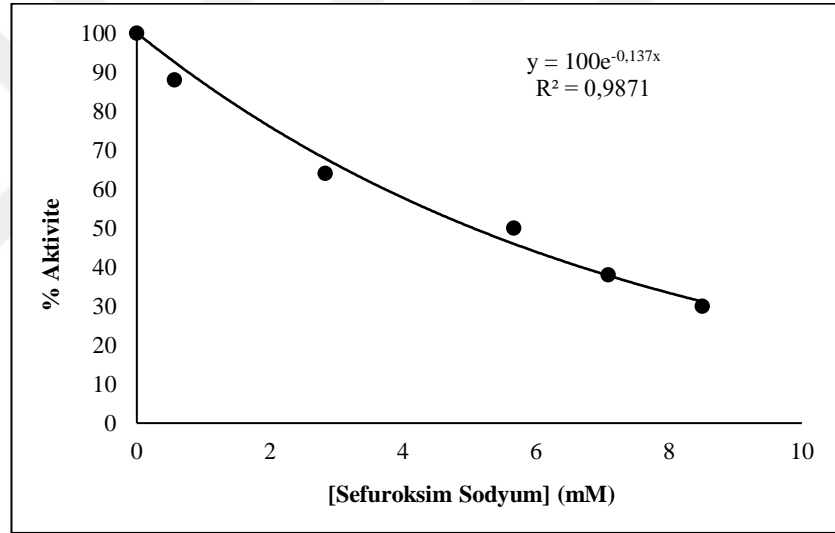
%Aktivite	[Sefazolin sodyum] mM
100	0
87,80	6,5
73,08	13
53,85	26
46,15	39
38,46	52



**Şekil 4.21.** Sefazolin sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.13.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyumun etkisi

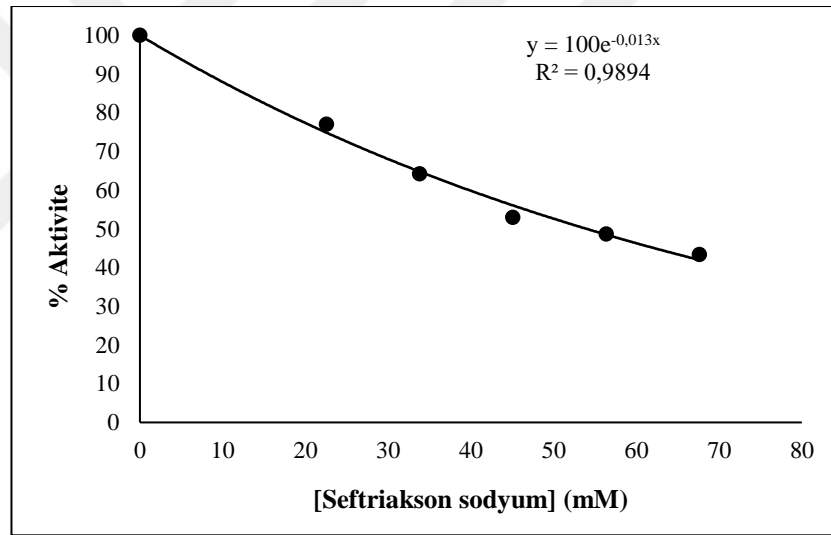
%Aktivite	[Sefuroksim sodyum] mM
100	0
88	0,567
64	2,835
50	5,670
38	7,088
30	8,505

**Şekil 4.22.** Sefuroksim sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi



**Çizelge 4.14.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine seftriakson sodyumun etkisi

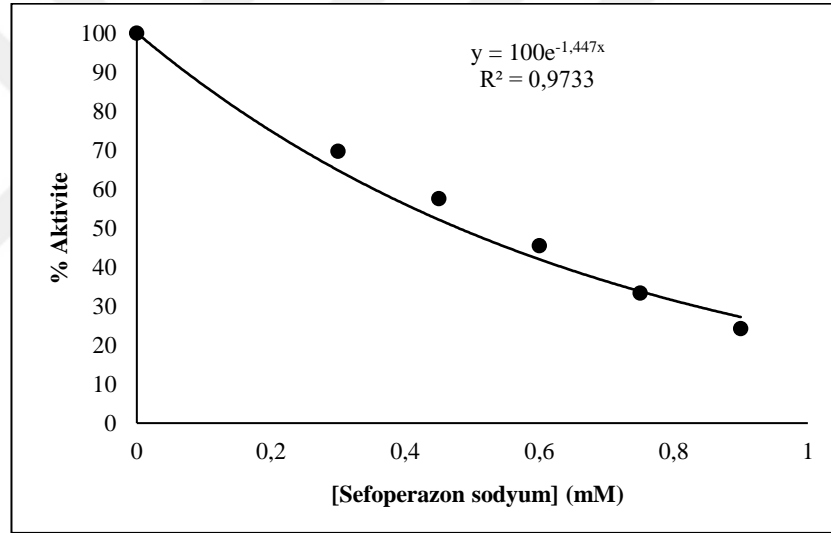
%Aktivite	[Seftriakson sodyum] mM
100	0
77,01	22,54
64,17	33,81
52,94	45,08
48,66	56,35
43,32	67,62



**Şekil 4.23.** Seftriakson sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

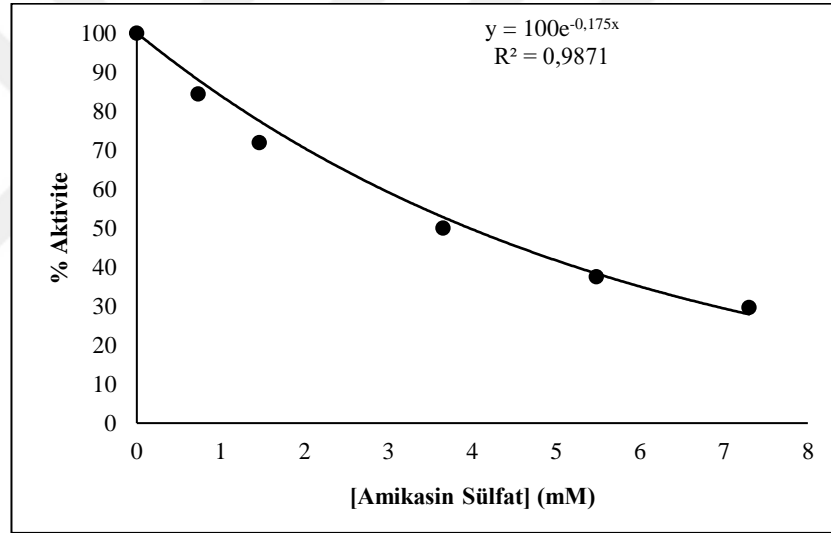
**Çizelge 4.15.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefoperazon sodyumun etkisi

%Aktivite	[Sefoperazon sodyum] mM
100	0
69,69	0,30
57,58	0,45
45,45	0,60
33,33	0,75
24,24	0,90

**Şekil 4.24.** Sefoperazon sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

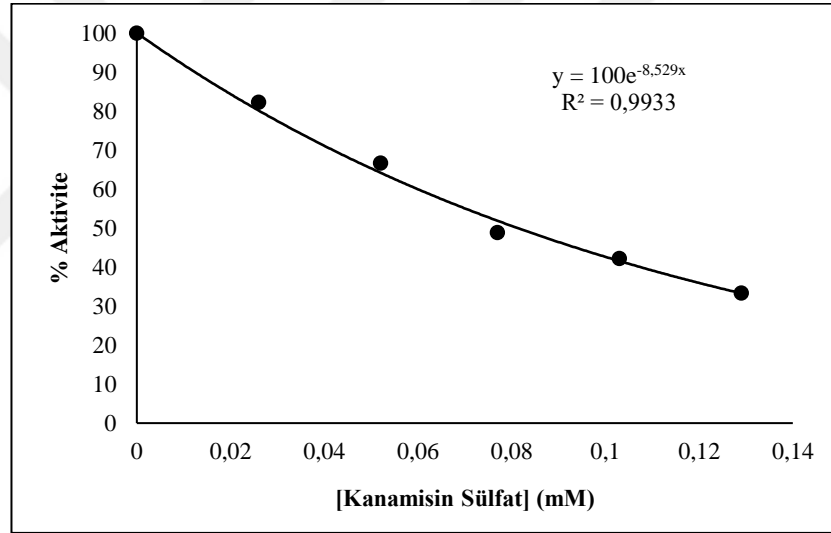
**Çizelge 4.16.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfatın etkisi

%Aktivite	[Amikasin Sülfat] mM
100	0
84,38	0,73
71,88	1,46
51,2	3,65
37,5	5,48
29,69	7,3

**Şekil 4.25.** Amikasin sülfatın rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.17.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine kanamisin sülfatın etkisi

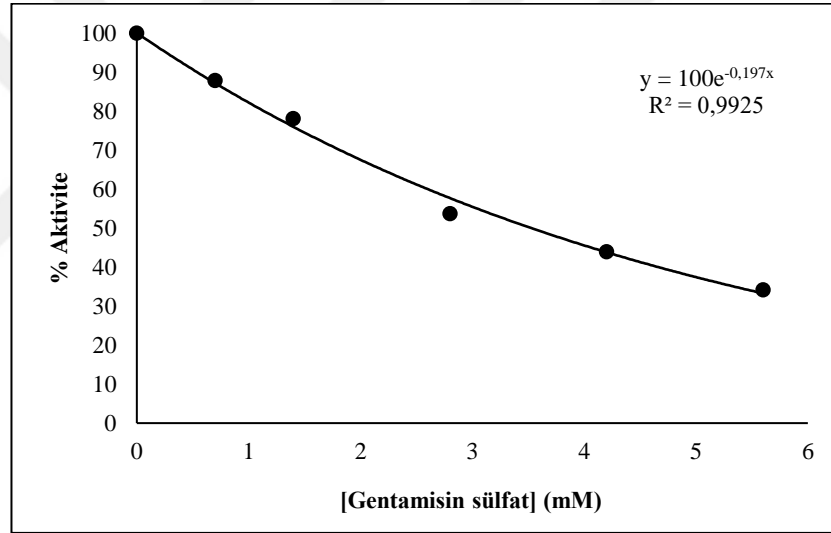
%Aktivite	[Kanamisin sülfat] mM
100	0
82,22	0,026
66,67	0,052
48,89	0,077
42,22	0,103
33,33	0,129



**Şekil 4.26.** Kanamisin sülfatın rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.18.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfatın etkisi

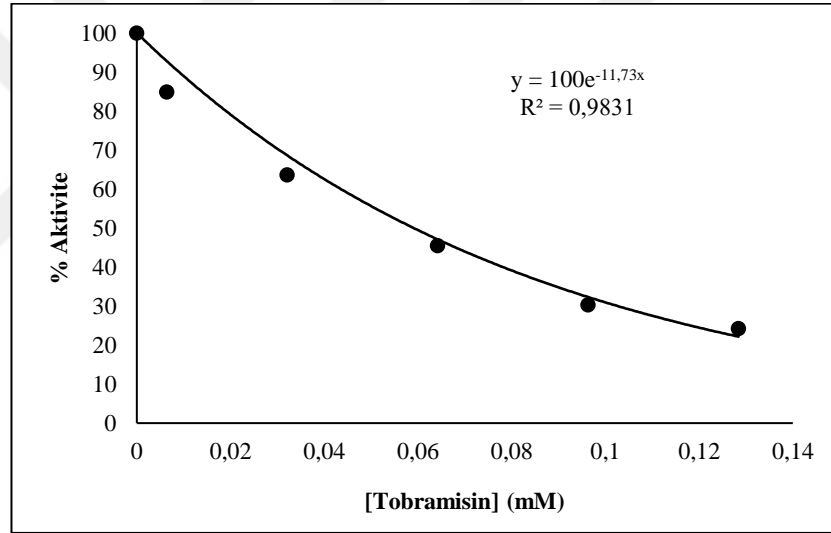
%Aktivite	[Gentamisin sülfat] mM
100	0
87,80	0,7
78,05	1,4
53,66	2,8
43,9	4,2
34,15	5,6



**Şekil 4.27.** Gentamisin sülfatın rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

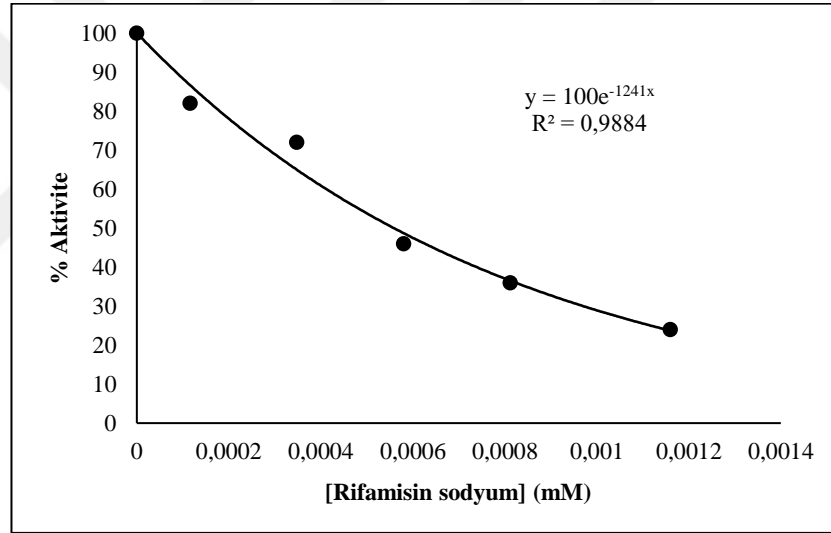
**Çizelge 4.19.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine tobramisinin etkisi

%Aktivite	[Tobramisin] mM
100	0
84,85	0,0064
63,64	0,0321
45,45	0,0647
30,30	0,9630
24,24	0,1284

**Şekil 4.28.** Tobramisinin rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

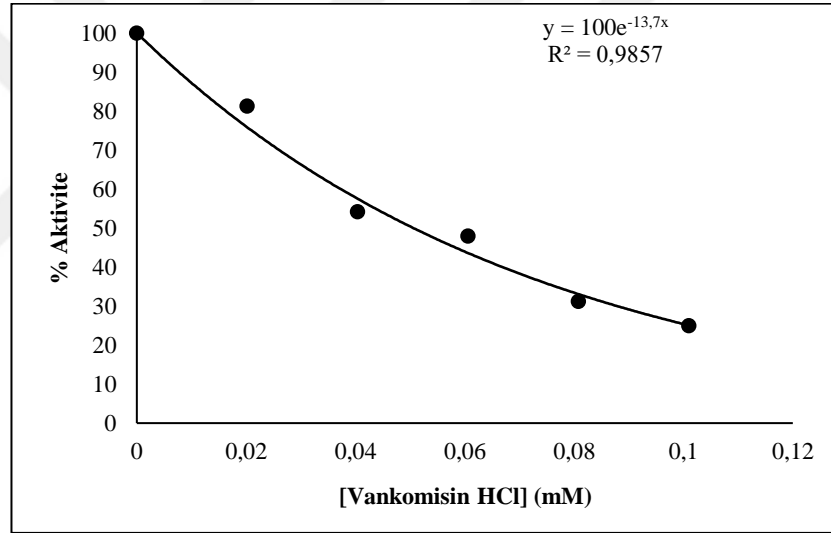
**Çizelge 4.20.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine rifamisin sodyumun etkisi

%Aktivite	[Rifamisin sodyum] mM
100	0
82	0,000116
72	0,000348
46	0,000580
36	0,000812
24	0,001160

**Şekil 4.29.** Rifamisin sodyumun rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.21.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in etkisi

%Aktivite	[Vankomisin HCl] mM
100	0
81,25	0,0202
54,17	0,0404
47,92	0,0606
31,25	0,0808
25	0,1010

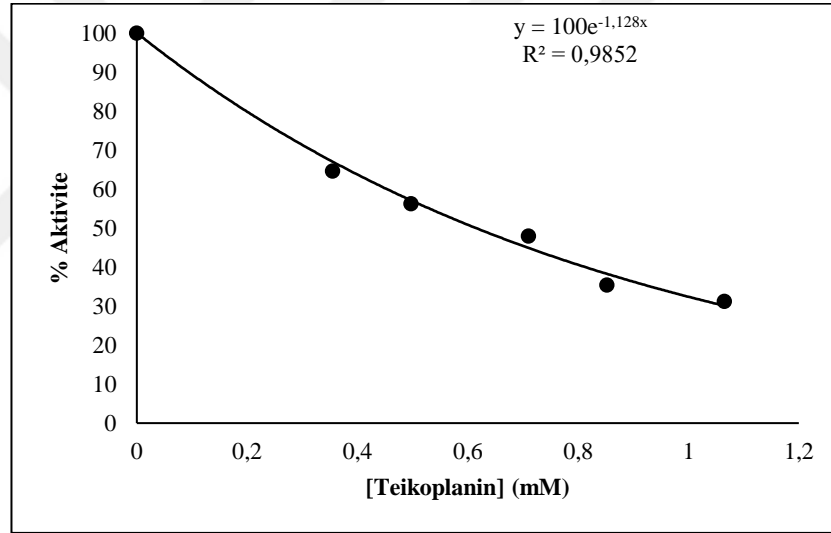


**Şekil 4.30.** Vankomisin HCl'in rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi



**Çizelge 4.22.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine teikoplaninin etkisi

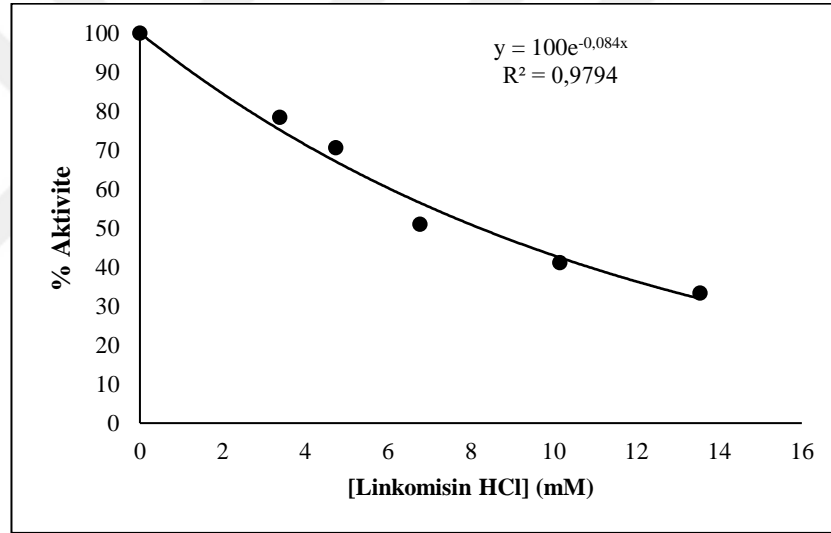
%Aktivite	[Teikoplanin] mM
100	0
64,58	0,355
56,25	0,497
47,92	0,710
35,42	0,852
31,25	1,065



**Şekil 4.31.** Teikoplaninin rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.23.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisi

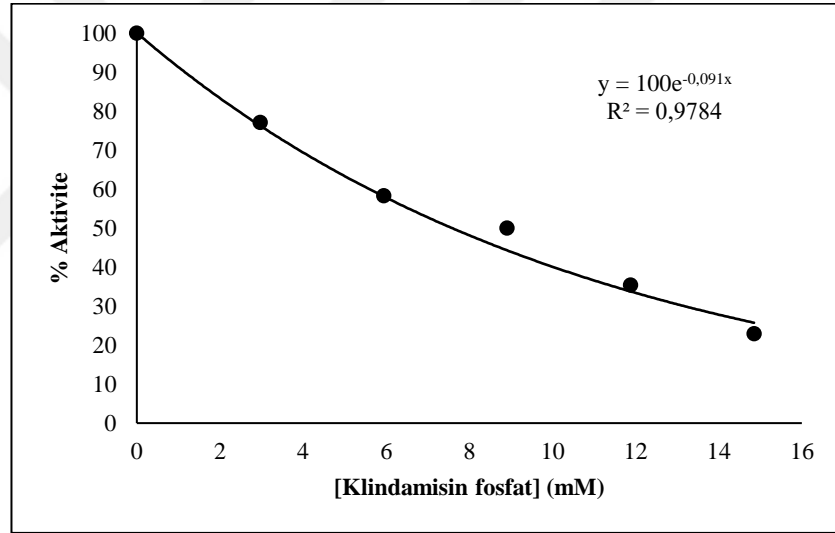
%Aktivite	[Linkomisin HCl] mM
100	0
78,43	3,385
70,59	4,739
50,98	6,770
41,18	10,155
33,33	13,540

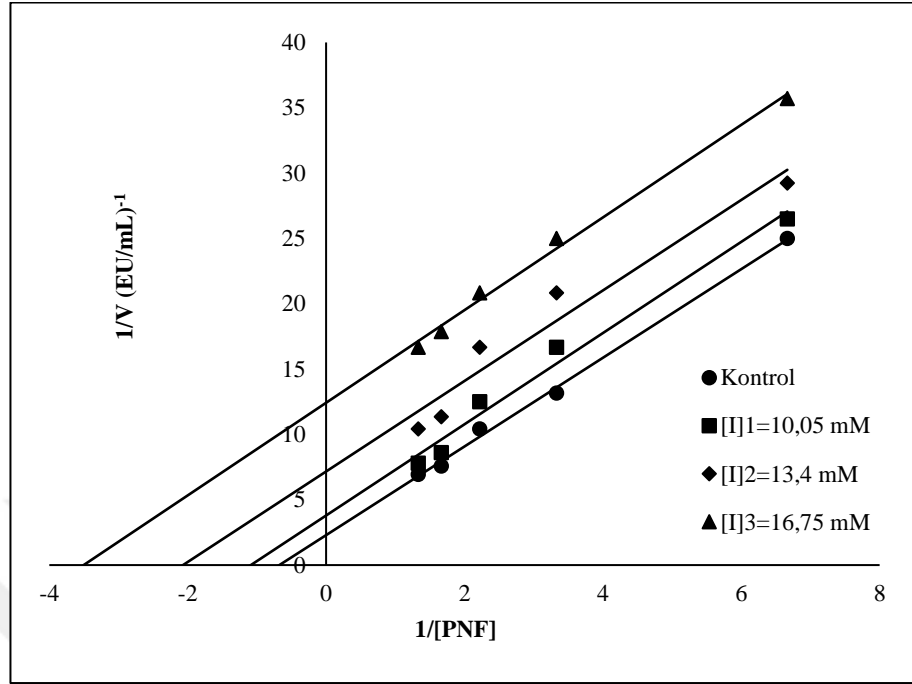


**Şekil 4.32.** Linkomisin HCl'in rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi

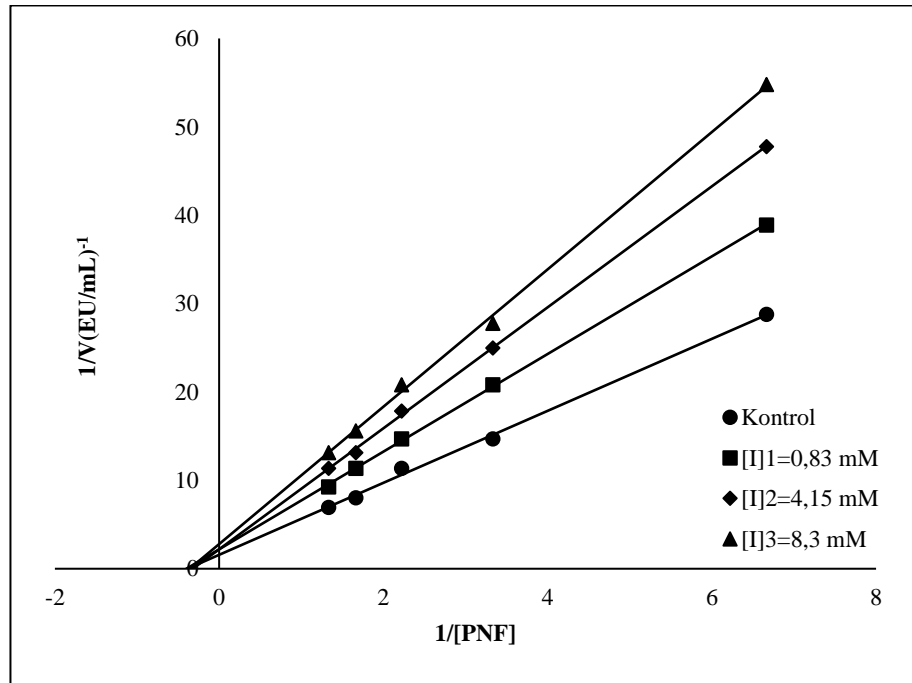
**Çizelge 4.24.** rhCA VII enzim aktivitesi üzerine klindamisin fosfatın etkisi

%Aktivite	[Klindamisin fosfat] mM
100	0
77,08	2,97
58,33	5,94
50	8,91
35,44	11,88
22,92	14,85

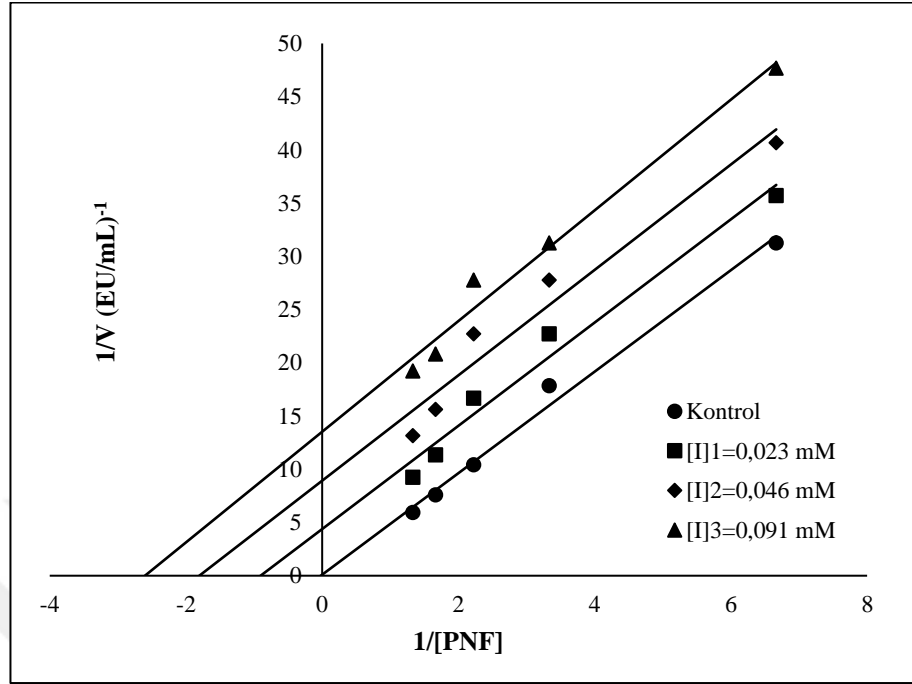
**Şekil 4.33.** Klindamisin fosfatın rhCA VII enzim aktivitesi üzerine etkisi



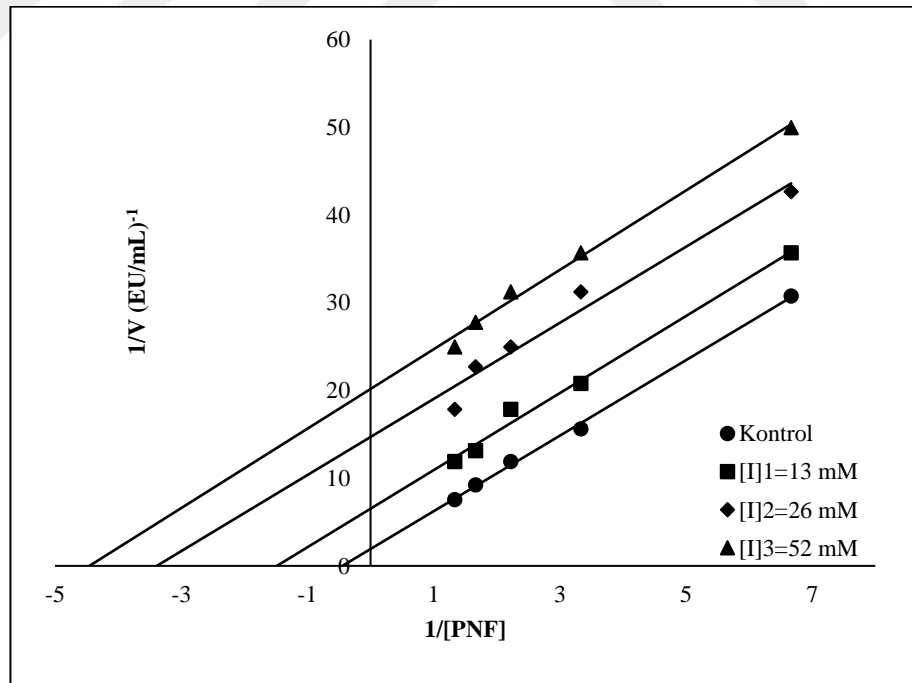
Şekil 4.34. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine ampisilin sodyumun Lineweaver-Burk grafiği



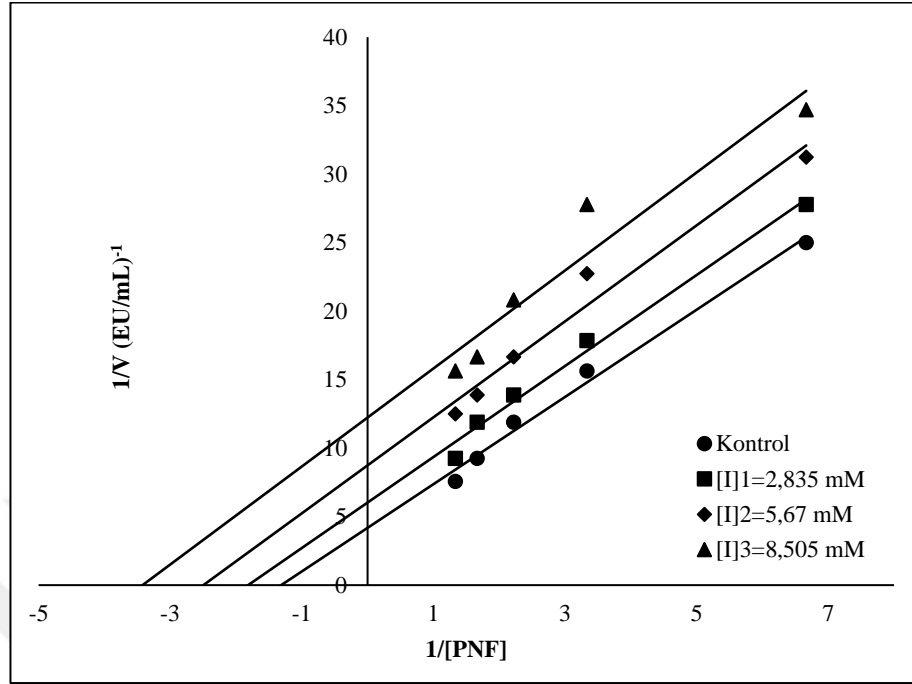
Şekil 4.35. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine piperasilin sodyumun Lineweaver-Burk grafiği



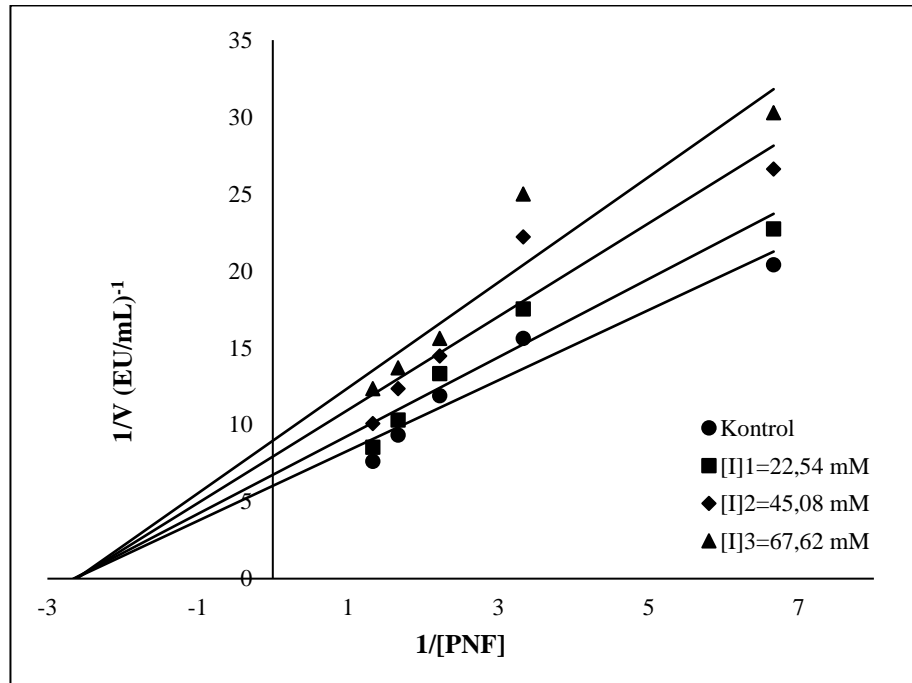
Şekil 4.36. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine amoksisilin Lineweaver-Burk grafiği



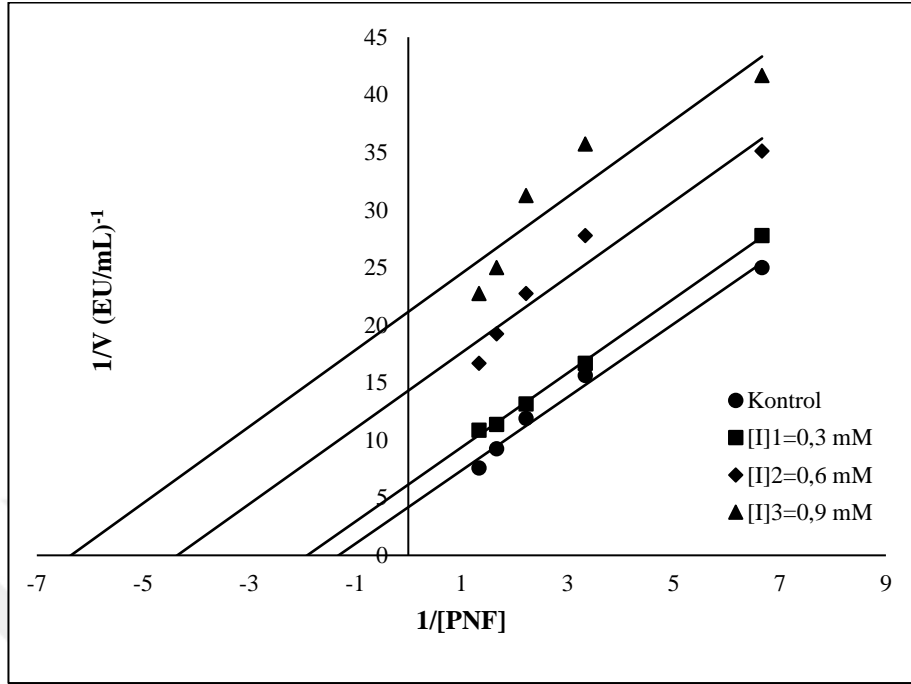
Şekil 4.37. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyumun Lineweaver-Burk grafiği



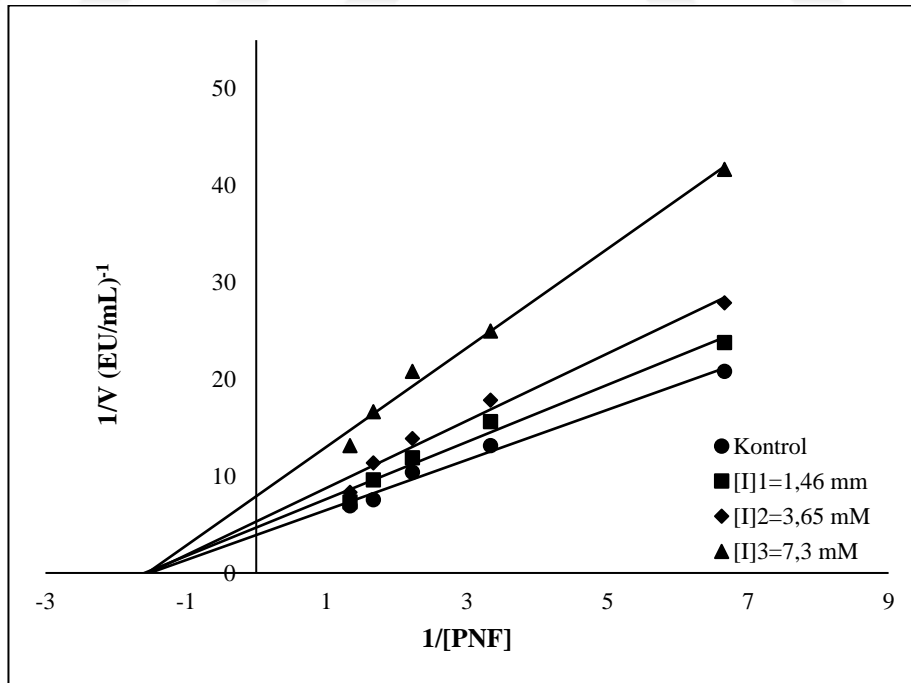
Şekil 4.38. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyumun Lineweaver-Burk grafiği



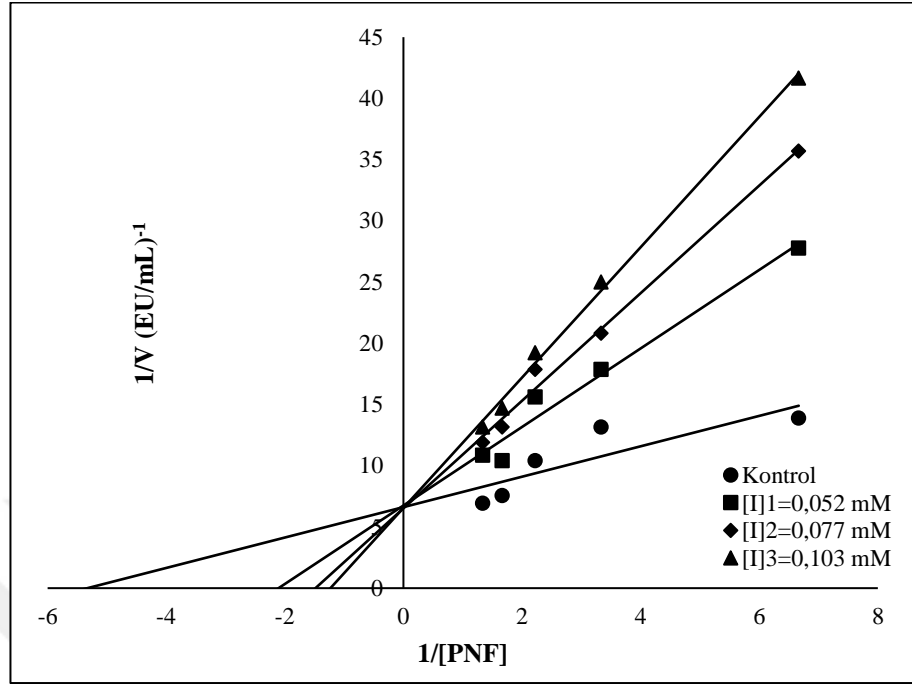
Şekil 4.39. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine seftriakson sodyumun Lineweaver-Burk grafiği



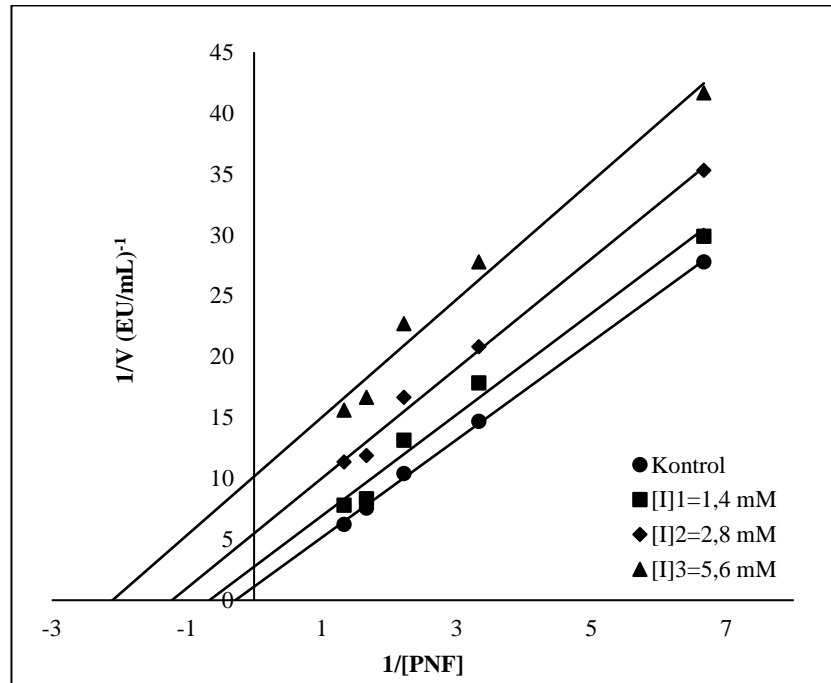
Şekil 4.40. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine sefoperazon sodyumun Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.41. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine amikasin sulfatın Lineweaver-Burk grafiği

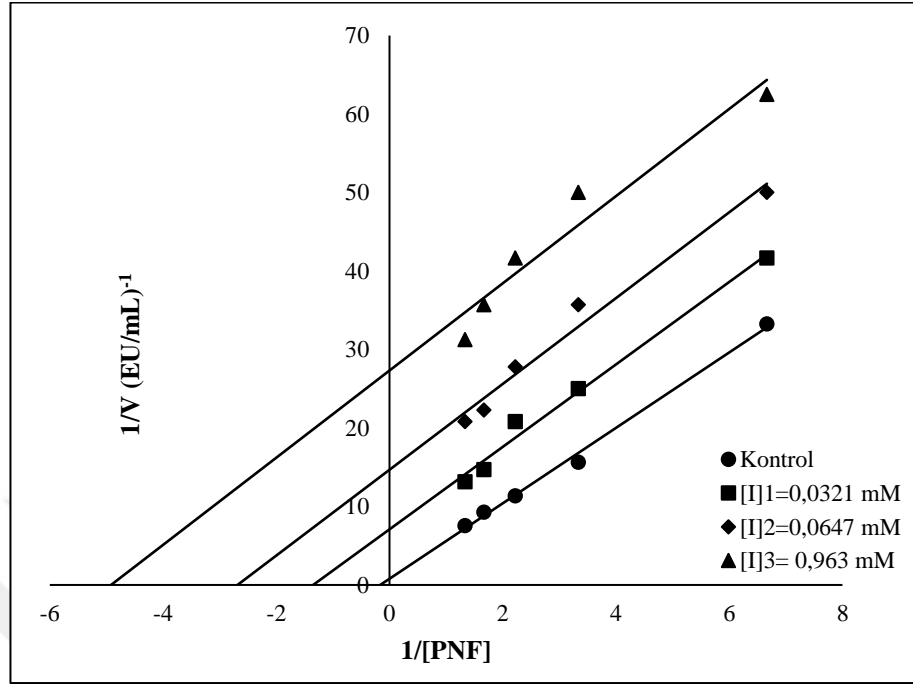


Şekil 4.42. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine kanamisin sülfatın Lineweaver-Burk grafiği

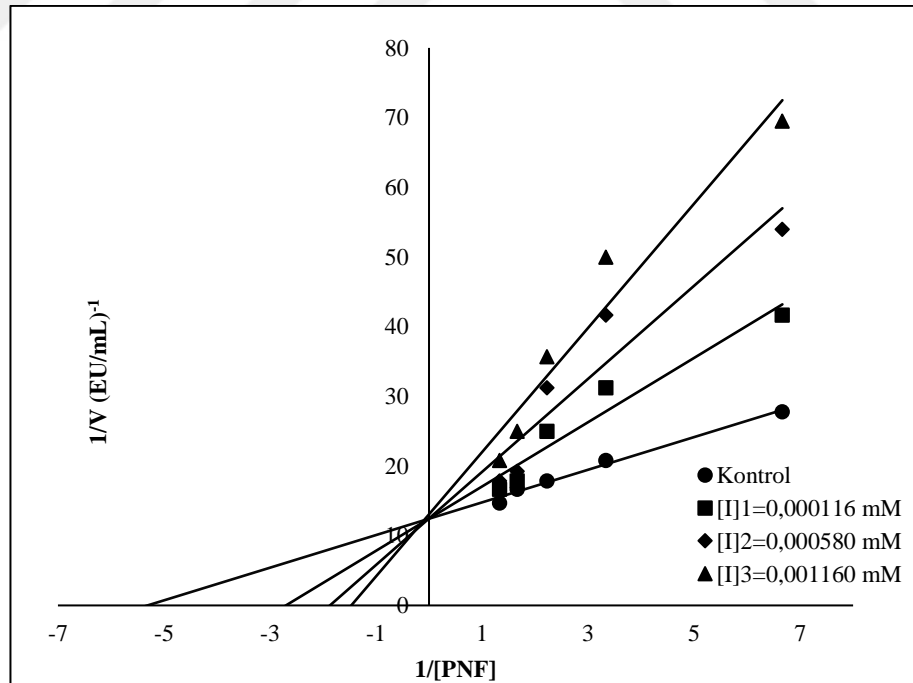


Şekil 4.43. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine gentamisin sodyumun Lineweaver-Burk grafiği

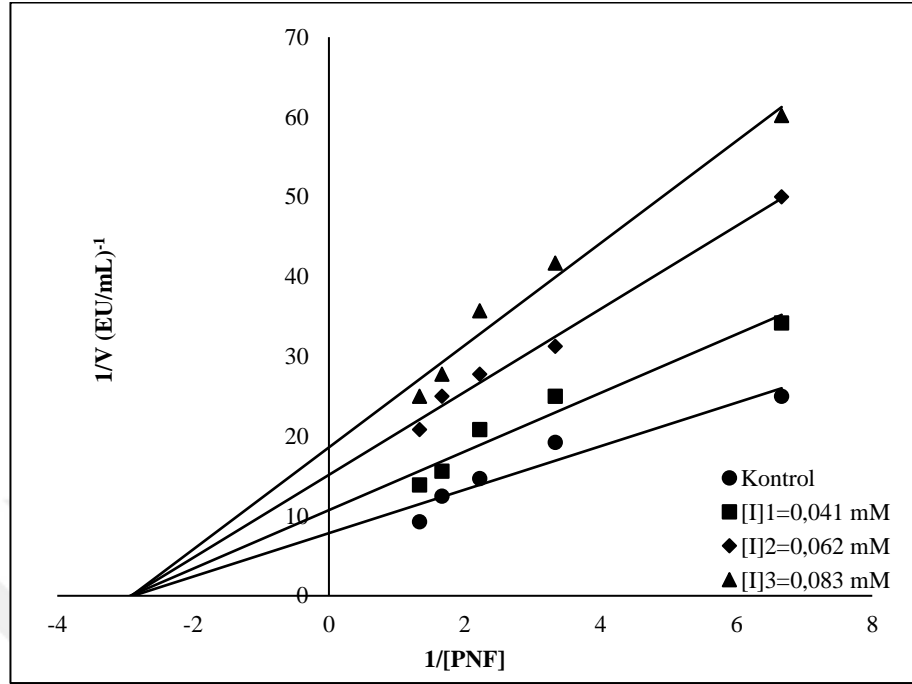




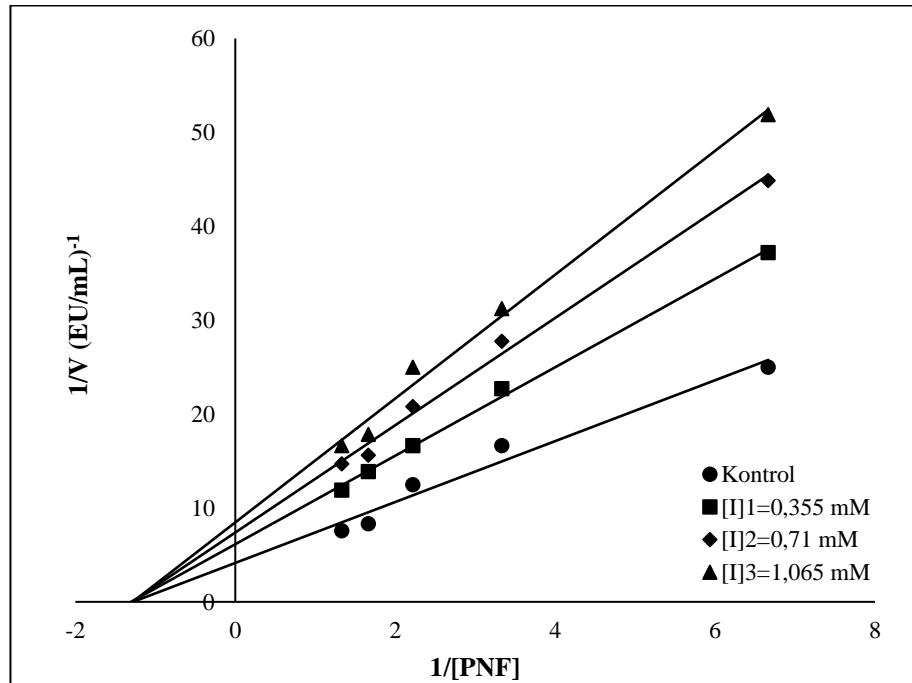
Şekil 4.44. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine tobramisin Lineweaver-Burk grafiği



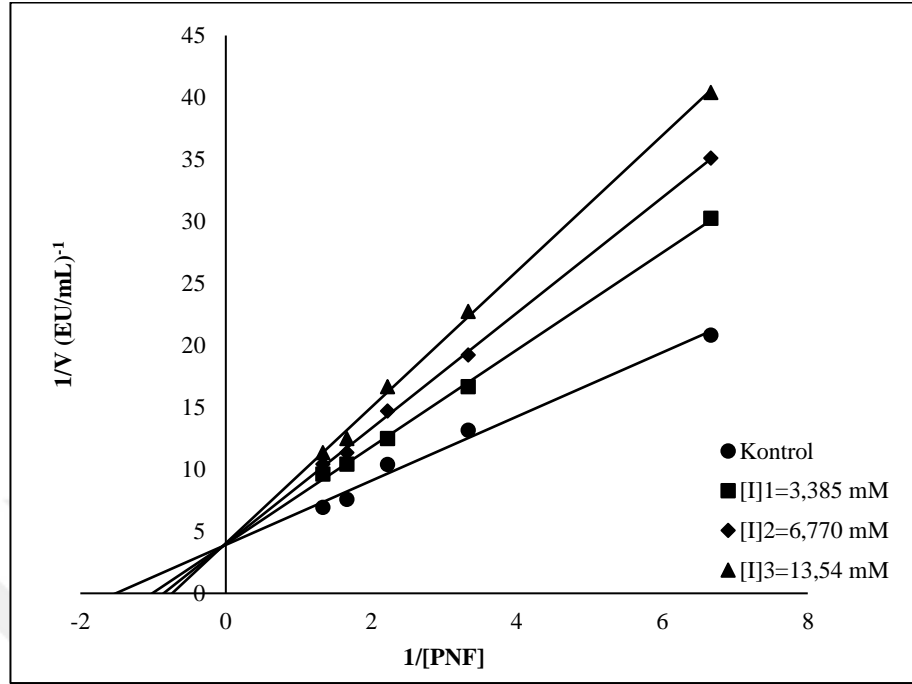
Şekil 4.45. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine rifamisin sodyumun Lineweaver-Burk grafiği



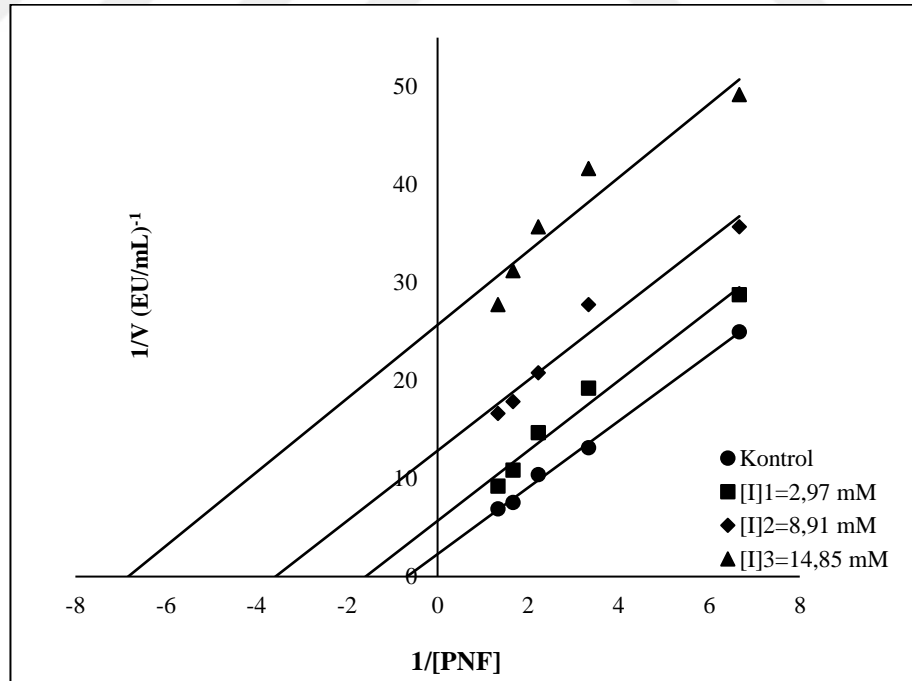
Şekil 4.46. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.47. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine teikoplaninin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.48. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.49. rhCA VII enzim aktivitesi üzerine klindamisin fosfatın Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.25.** rhCA VII enzimi için bulunan IC<sub>50</sub> değerleri, K<sub>i</sub> sabitleri ve inhibisyon türleri

<b>Antibiyotik Türü</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>	<b>Ortalama K<sub>i</sub> (mM)</b>	<b>İnhibisyon Türü</b>
Ampisilin sodyum	13,86	8,46 ± 6,06	Yarı yarışmalı
Piperasilin sodyum	4,23	7,78 ± 4,92	Yarışmasız
Amoksisilin	0,06	0,0006 ± 0,00008	Yarı yarışmalı
Sefazolin sodyum	34,65	4,95 ± 0,893	Yarı yarışmalı
Sefuroksim sodyum	5,06	5,34 ± 1,01	Yarı yarışmalı
Seftriakson sodyum	53,32	157,6 ± 28,618	Yarışmasız
Sefoperazon sodyum	0,48	0,304 ± 0,211	Yarı yarışmalı
Amikasin sülfat	3,96	8,27 ± 1,73	Yarışmasız
Kanamisin sülfat	0,081	0,032 ± 0,0022	Yarışmalı
Gentamisin sülfat	3,52	0,73 ± 0,219	Yarı yarışmalı
Tobramisin	0,059	0,012 ± 0,005	Yarı yarışmalı
Netilmisin	-	-	-
Siprofloksasin	-	-	-
Levofloksasin	-	-	-
Ofloksasin	-	-	-
Moksofloksasin	-	-	-
Rifamisin sodyum	0,00056	0,000293 ± 0,000163	Yarışmalı
Vankomisin HCl	0,051	0,078 ± 0,0278	Yarışmasız
Teikoplanin	0,614	0,89 ± 0,143	Yarışmasız
Linkomisin HCl	8,25	9,52 ± 3,09	Yarışmalı
Klindamisin fosfat	7,62	1,798 ± 0,299	Yarı yarışmalı
Ornidazol	-	-	-
Metronidazol	-	-	-

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Epilepsi, yaygın olarak görülen nörolojik bozukluklardan biridir. Nöbetlerin meydana geldiği tetikleyici mekanizmalar belirsizdir. Ancak bu durum iyonik kompozisyondaki hızlı bir değişiklikle ilişkilidir, bunlar arasında hücre içi potasyum konsantrasyonu ve beyindeki pH değişimleri de yer alır. Hücre içi boşlukların pH tamponlaması esas olarak CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub> sistemi tarafından gerçekleştirilir ve bu denge karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) enzimi tarafından katalizlenir. Epilepsi, migren ve diğer merkezi sinir sistemi bozukluklarının tedavisi için antiepileptik ilaçlar (AED), asetazolamid (AAZ), zonisamid (ZNS), topiramet (TPM) ve lakosamid (LAC) gibi bazı CA inhibitörleri klinik olarak kullanılmaktadır. Ancak, CA inhibisyonu ve nöbetler arasındaki bağlantı esas olarak anlaşılammıştır. Çünkü beyinde birçok CA izoformu (CA'lar; I, II, III, IV, VB, VII, VIII, X, XI, XII ve XIV) bulunmaktadır. Karbonik anhidraz enzim ailesi sınıfından CA II, CA VII ve CA XIV gibi birçoklarının epileptiform aktiviteye katkılarının olduğu bilinmektedir. Bu yüzden bu enzimlerin spesifik inhibitörlerini bulmak günümüzde önem arz etmektedir (Hen *et al.* 2011).

Anlatıldığı üzere karbonik anhidraz enzim ailesi canlılar için hayati rol üstlenmektedir. Bundan dolayı bu enzimler üzerinde yapılan çalışmalar, bu enzimin metabolizmadaki rolünün anlaşılması ve spesifik inhibitörlerin geliştirilmesi açısından oldukça önem teşkil etmektedir. Dolayısıyla yapmış olduğumuz bu çalışmanın önemi gayet açıktır.

Bu çalışmada ilk olarak insan karbonik anhidraz VII (hCA VII) geninin insan beyin cDNA'sı kullanılarak klonlanması ve *E.coli* bakterisinde bu izoenzimin ekspresyonunun gerçekleştirilmesi amaçlandı. Bu sebeple gene özgü primerler kullanımıyla kaynak dokuya ait olan cDNA kütüphanesi yardımıyla bu izoenzimi kodlayan ilgili genin izolasyonu gerçekleştirildi. Bir seri reaksiyonlar ve yapılan deneyler sonucunda elde edilen gen bölgesi taşıyıcı bir vektöre transfer edildi. Bunu takiben meydana gelen rekombinant vektör, konağa transfer edildi ve ekspresyonla üretilmesi hedeflenen enzimin üretimi gerçekleştirildi. Üretilen enzim, belli uygun yöntemlerin kullanılmasıyla hücreden alınarak kromatografik bir teknik yardımıyla saflaştırıldı ve daha sonra da

enzim için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Elde edilen saf enzimin aktivitesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin *in vitro* etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Yaptığımız çalışmada klonlama ve ekspresyon işlemlerinde pET SUMO vektörü kullanıldı. SUMO proteinleri, ubikuitinler gibi hedef proteine konjuge olmadan önce öncü bir formda sentezlenebilirler. Ubikuitinlerin bir proteine hedeflenmesi ile onun degradasyonu amacıyla, SUMO hedeflemesi yapılan protein üzerinde nükleer transport, transkripsiyonel regülasyon ve protein kararlılığı gibi hücresel işlemler bu iki grup arasındaki temel farktır (Boggio *et al.* 2004). Özellikle *E. coli* gibi düşük seviyeli konaklarda karşılaşılan en önemli sorunların başında, verimli ve çözünebilir formda rekombinant protein üretimi gelmektedir (Wang *et al.* 2010). Bu problemten kurtulmak için füzyon proteinlerinin kullanımı, promotör alterasyonu ve şaperon ko-ekspresyonu gibi yaklaşımlar genellikle tercih edilmektedir. Füzyon proteinleri hedef proteinin ekspresyonunu ve düzgün katlanmasını sağlamasına ek olarak ilgili proteini degradasyondan korur, saflaştırma ve tespit işlemlerinde de kolaylık sağlar. Bu nedenle rekombinant üretim tekniklerinde oldukça sık bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır.

Çalışmaya ilk olarak insan beyin cDNA'sı Clontech firmasından ticari olarak satın almayla başlandı. hCA VII enziminin gen bölgesi, gene spesifik primerlerle PCR işlemi ile çoğaltılarak ligasyon işlemiyle pET SUMO klonlama vektörüne klonlandı. hCA VII enziminin gen bölgesini içeren klonlama vektörü ısı şoku uygulamasıyla *E.coli* (One Shot® Mach1™-T1R) hücrelerine transforme edildi ve farklı miktarlarda (100 µL ve 200 µL olacak şekilde) yayma işlemi yapılan petriler üzerinde koloniler gözlemlendi. Bu koloniler ile çapraz PCR ve plazmit izolasyonu yapıldı. Klonlanan gen bölgesinin DNA dizi analizi yapılarak klonlamanın doğru olup-olmadığı kontrol edildi. Dizi analizi sonucu 1068 bç'lik PCR amplifikasyon ürününün hCA VII olduğu doğrulanıp, PCR'a işlemiyle meydana gelmiş herhangi bir mutasyonun olmadığı görüldü. Elde edilen diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information)'a ait internet adresi kullanılarak biyoinformatik olarak karşılaştırıldı. DNA dizi analizi ile doğruluğu kanıtlanan hCA VII enziminin gen bölgesi ekspresse edilmek maksatıyla pET-SUMO ekspresyon vektörüne aktarıldı. T7 promotör sistemi ile başlatılması için, hCA VII genini taşıyan pET-SUMO

plazmiti ısı şoku uygulaması ile *E.coli* BL21 (DE-3) hücrelerine transforme edildi. Bu hücreler T7 RNA polimeraz genine sahiptirler. Ayrıca IPTG (izopropiltiyogalaktozid) ile indüklenebilirler. Sentezlenen proteinin degrade edebilen bazı proteazlar açısından eksiktir. Bu özellikleri göz önünde bulundurularak çalışmamızda protein üretimi için pET ekspresyon sistemine uygun olan bu soy tercih edilmiştir.

IPTG ile indüklenen enzimlerin ekspresyon profilleri belirlenme çalışmaları yapılmıştır. Western blot yöntemi kullanılarak enzimlerin IPTG varlığında ekspresyonları teyit edilmiştir. Yaklaşık 100 aa'ten oluşmakta olan SUMO'nun moleküler ağırlığı 11 ila 20 kDa civarlarında tespit edilmiştir (Marblestone *et al.* 2006; Herrmann *et al.* 2007). Yaptığımız çalışmamızda western blot analizi sonucu jel görüntüsü (Şekil 4.16) incelendiğinde hedef proteinlerin üzerindeki füzyon eki ve His kuyruğunun olduğu da hesaba katıldığında His antikoru ile elde edilen yaklaşık 45 kDa'luk bandın rekombinant hCA VII enzimi için doğru olduğu sonucunu vermektedir.

Rekombinant proteinler *E.coli*'de bazen doğru bir şekilde katlanamayabilir ve çoğunlukla birçok hayvan proteininde var olan disülfid bağlarını sentezleyemeyebilirler. Proteinin üç boyutlu yapısının düzgün oluşmaması durumunda ortamda inklüzyon cisimcikleri adı verilen çözünmez agregatlar oluşmaktadır. Bunun sonucunda proteinin biyolojik aktivitesinde sorunlar meydana gelmektedir. Proteinin inklüzyon cisimciklerinden geri kazanımı sırasında sorun oluşmamaktadır, ancak deney tüpü içerisinde proteini doğru katlandırmak oldukça zor bir süreçtir.

Saflaştırma işlemi için afinite kolon kromatografisi kullanıldı. Vektörümüzün yapısında bulunan 6xHistidin kuyrukları dörtlü koordinasyon bölgesi oluşturan nitriloasetik asite (NTA) immobilize  $Ni^{2+}$  metal iyonlarına etkili bir şekilde bağlandı ve bu sayede istenilen protein kolon materyaline tutundu. Numune kolona tatbik edildikten sonra ortamda bulunan safsızlıkların uzaklaştırılması için, kolon farklı oranlarda imidazol içeren tamponlarla gradientli olarak yıkandı. Pilot ekspresyonun denemesinde IPTG bulduran ve IPTG buldurmeyen sıvı besi yerlerinde deney şartları oluşturuldu. Kontrol grubu ile deney grubu aynı şartlar altında geliştirildi.  $OD_{600}=0,6-0,8$  oluncaya kadar kültür

büyümeye bırakıldı. Yeterli bakteri konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra protein ekspresyonunun gerçekleşmesi için 1 mM izopropiltiyogalaktozid (IPTG) bakteri kültürüne eklendi. Kültür 37°C'de 260 rpm'de ekstra 8 saat inkübasyona bırakıldı. Böylece ekspresyonun gerçekleşmesine teşvik edildi. 2 saatte bir numune örneği alındı. Ekspresyon sonrası bakteri hücreleri lizis edilerek ham ekstraktlar SDS-PAGE ile kontrol edildi. Sonuçta IPTG içeren deney grubunda hCA VII enziminin ekspresyonu gözlemlendi.

Saflaştırma işleminde ekspresyon sonrası besiyerleri santrifüj edilerek pelletler alındı. Pelletler sıvı azotla dondurma-çözme yöntemi kullanılarak parçalandı. Parçalama işlemi sonucunda ortama DNA fragmentleri karışıp lizatın viskoz yapıda olmasını sağlamasıyla saflaştırma işleminde sıkıntılar oluşturulabilir. Bunun önüne geçmek için ortama ya DNase eklendi. Çözeltide bulunan tuzları uzaklaştırmak için 3 saat diyaliz işlemi yapıldı. Saflaştırma işlemi için nikel şelatlayıcı reçine kullanıldı. Afinite kromatografisi ile gerçekleştirilen saflaştırma işlemi kullanışlı, basit, hızlı ve yüksek verime sahip olması bakımından tercih edilmektedir (Hall and Schaer 1983; Bursal 2009).

Kolon yapısında bulunan metal iyonlarına bağlanan enzim imidazol ilavesiyle kolondan elüe edildi. Elüsyonda histidin ile etiketlenen protein için yarışmalı inhibitör özelliği sergileyen imidazol kullanılmıştır. rhCA VII enziminin aktivitesini belirlemek için hem esteraz hem de hidrataz yöntemleri kullanıldı. Esteraz yönteminde substrat olarak *p*-nitrofenil asetat (PNF) kullanıldı. Bu madde imidazol tarafından hidroliz edilmektedir. Buna bağlı olarak ortamda enzim olmadığında da hidroliz sonucu olarak aktivite görülmektedir. Bu durum rekombinant hCA VII aktivitesinde anormal düzeyde artışa sebep olmaktadır. Bu durumu ortadan kaldırmak için enzim çözeltisi diyaliz edilerek ortamdaki imidazolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Başka bir yöntem olarak da enzim çözeltisinin kolondan gradientli olarak pH değerleri düşürülmesi ile elüe edilmesi yöntemidir. Bu yöntemle histidinlerin protonlanması sağlanıp nikel reçinesi için afinitesi azaltılarak enzim kolondan elüe edildi.

Rekombinant DNA teknolojisi kullanarak elde ettiğimiz rhCA VII enziminin molekül kütlesini tayin etmek amacıyla SDS-PAGE metodundan yararlanıldı. SDS-PAGE'de



füzyon proteini ile birlikte kütlesi bilinen standart protein numuneleri aynı zamanda yürütüldü ve Şekil 4.9'da gösterilen jel elde edildi. Mevcut jelde tek bandın görülmesi füzyon proteininin saf olduğunu göstermektedir. Daha sonra Şekil 4.10'da verildiği üzere  $R_f$ -log  $M_K$  standart grafiği çizilerek SUMO-hCA VII enziminin molekül kütlesi belirlendi. CA enziminin molekül kütlesi yaklaşık 30 kDa'dur. Yaklaşık 100 aminoasitten oluşan SUMO'nun moleküler ağırlığı 11 ila 20 kDa civarlarındadır. (Marblestone *et al.* 2006; Dorval and Fraser 2006; Herrmann *et al.* 2007). Bu duruma istinaden SUMO-hCA VII proteini molekül kütlesi yaklaşık olarak 45 kDa civarlarında olması beklenmektedir. Çalışmamızda SUMO-hCA VII enziminin molekül kütlesi 46,77 kDa olarak belirlendi.

Bilindiği gibi enzimleri saflaştırmak zor bir süreçtir. Enzimler protein yapısındaki makromoleküller olmaları nedeniyle şartların değişmesine karşı hassastırlar. Bu nedenle bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki gösterdiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu meydana gelen ürün ya da enzimatik reaksiyona öncülük eden diğer parametreler üzerinden belirlenmektedir. Enzimlerin aktivitesi üzerine etki eden faktörler arasında, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, pH, allosterik etkiler, iyonik şiddet, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı sayılabilir.

HücreSEL metabolizma, canlının hareketlerine izin veren gerekli reaksiyon serilerini içerir. Hücredeki bu reaksiyon serilerine metabolik yollar denir. Metabolik yolların organizmadaki metabolik ağın gerçek işlevsel birimleri olduğu iyi bilinmektedir (Schilling *et al.* 2000). Bu açıdan, herhangi bir yolda görülen bir bozukluk, tüm metabolizmada artan bir kartopu etkisi yaratır. Hemen hemen tüm metabolik reaksiyonlar, reaksiyonun hızlı ve etkili olmasını sağlamak için çeşitli enzimler tarafından katalize edilir. Enzimlerin eksikliği, inhibisyonu veya aktivasyonu, enzimin gerçekleştirdiği metabolik yolu ve buna bağlı olarak da tüm metabolik sistemi etkiler. Bu nedenle, enzim-ilaç etkileşimi çalışmaları her zaman göz önünde bulundurulur. İlaçların, kimyasalların veya bunların metabolitlerinin mekanizmaları, metabolizma içindeki enzim faaliyetlerini etkilemek suretiyle yürütülür. Çünkü enzimler ksenobiyotiklerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, CA inhibitörlerinin belirlenmesinin normal ve hastalık süreçlerindeki rolleri anlamak açısından muazzam bir değere sahip olduğunu göstermektedir. Bu da daha güçlü CA inhibitörlerinin sentezlenmesi çalışmalarını teşvik etmiştir. Bu nedenle bugün birçok araştırmacı güçlü ve spesifik CA inhibitörleri geliştirmek için çalışmaktadır.

Her enzimin optimal şartlarda enzimin kendisine özgü substratının en çok değişikliğe uğratıldığı belirli bir sıcaklık değeri bulunmaktadır. Bu sıcaklık değerine söz konusu enzimin 'optimum sıcaklığı' denilmektedir. rhCA VII enzim aktivitesinin optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 50°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak gerçekleştirildi ve rhCA VII enzimi için optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. Enzimin optimum sıcaklık değerinden yararlanılarak  $\Delta H$ :1,199 kcal/mol,  $E_a$ :1,843 kcal/mol ve  $Q_{10}$ :1,4 olarak belirlendi. Ayrıca rhCA VII enzimi için optimum pH Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponuyla pH:8,0 olarak, optimum iyonik şiddet ise 800 mM olarak belirlendi.

Tez çalışmamız kapsamında, hCA VII enzimi klonlanmış, *E.coli*'de eksprese edilip saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi nikel reçineli afinite kromatografisi tekniğini kullanarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem sonucunda rhCA VII enzimi 7,02 EU/mg spesifik aktivite, %48,07 verimle yaklaşık 21 kat saflaştırılmıştır.

CA inhibitörlerinin önemi ve yapılan literatür araştırmaları sonucunda CA VII izoenzimi üzerine yapılan çalışmalarda, enzimlerin tıbbi ilaçlarla etkileşimi üzerine çalışmalara rastlanılmamıştır. Çalışmamızda tıbbi uygulama da yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin *in vitro* şartlarda inhibisyon etkileri incelenmiştir. Çalışmada seçilen antibiyotiklerin hCA VII izoenzimi üzerine etkilerinin araştırıldığı hiçbir literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Literatürde, değişik kaynaklardan saflaştırılmış farklı enzimlerin antibiyotiklerle etkileşimleri ile ilgili çalışmalar günden güne artmaktadır. Örneğin; insan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerine antibiyotiklerin etkisi incelenmiştir.  $K_i$  değerlerine

göre küçükten büyüğe doğru antibiyotiklerin sıralanışı; teikoplanin > rifamisin > tobramisin > seftriakson sodyum > sefuroksim sodyum > seftazidim pentahidrat > ornidazol > amikasin sülfat şeklinde bulunmuştur (Ekinci and Beydemir 2009).

Seftriakson sodyum, imipenem ve ornidazol gibi bazı antibiyotiklerin insan karbonik anhidraz izoenzimleri I ve II'nin enzimatik aktivitesi üzerindeki *in vitro* inhibitör etkileri incelenmiş ve antibiyotiklerin bu izoenzimleri çok düşük oranlarda inhibe ettiği tespit edilmiştir (Ekinci *et al.* 2007).

Antibiyotiklerin enzimler üzerine etkisini inceleyen başka bir çalışmada, sefalosporin sınıfında bulunan sefoperazon, sefazolin, sefuroksim, seftazidim ve seftriakson antibiyotiklerinin koyun böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz (AR) ve sorbitol dehidrogenaz (SDH) enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. AR enzimi çalışılan ilaçlar tarafından inhibe edilirken, SDH enzimi yalnızca sefuroksim tarafından inhibe edilmiştir (Şengül and Beydemir 2017).

Yapılan bir başka çalışmada koyun karaciğerinden saflaştırılan alkol dehidrogenaz enzimi üzerine kanamisin sülfat, amikasin sülfat, gentamisin, linkomisin, ve klindamisin antibiyotiklerinin etkisi incelenmiştir. Bu antibiyotiklerin  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla, 43.31, 36.47, 20.38, 18.73 ve 1.31 mM olarak bulunmuştur. En iyi inhibisyon etkisini klindamisin antibiyotiği göstermiştir (Demir *et al.* 2017).

Çalışmamızda rhCA VII enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler için  $K_i$  sabitlerinin ve inhibisyon tiplerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Lineweaver and Burk 1934). Sonuçların hassas bulunabilmesi için her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri elde edilmiştir. Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır.

$IC_{50}$  değeri, enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. rhCA VII enzimi aktivitesi üzerine yaptığımız inhibisyon çalışmalarında her bir inhibitör için  $IC_{50}$  değerleri hesaplanarak belirlendi. Çalışmamızda

en yüksek inhibisyonu  $IC_{50}$  değeri  $0,56 \mu\text{M}$  olan rifamisin sodyum göstermiştir. Bu bileşiği  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla  $51 \mu\text{M}$  ve  $59 \mu\text{M}$  olan vankomisin HCl ve tobramisin bileşikleri izlemektedir. rhCA VII enzimi aktivitesi üzerine çalışılan inhibitörlerin büyüklükleri büyükten küçüğe doğru sıralaması şu şekildedir; rifamisin sodyum > vankomisin HCl > tobramisin > amoksisilin > kanamisin sülfat > teikoplanin > gentamisin sülfat > amikasin sülfat > piperasilin sodyum > sefuroksim sodyum > klindamisin fosfat > linkomisin HCl > ampisilin sodyum > sefazolin sodyum > seftriakson sodyum. Çalışılan bileşikler içerisinde rifamisin sodyum bileşiğinin güçlü bir rhCA VII inhibitörü olduğu sonucuna varılabilir.

İnhibisyon çalışmalarımızın sonuçlarına, göre rifamisin, rhCA VII enzimi üzerine yüksek oranda inhibisyon etkisi göstermiştir. Rifamisinde bulunan hidroksil ve metil gruplarının etkili bir inhibisyon sağladığını düşünmekteyiz. Amoksilin ve ampisilin ilaçlarının kimyasal yapılarının tek bir hidroksil iyonu haricinde tamamen aynı olduğu halde inhibisyon oranlarının oldukça farklı olduğunu gözlemledik.  $IC_{50}$  değerlerine göre kıyaslama yapıldığında amoksilin, ampisilinden 231 kat daha fazla inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu durumda hidroksil iyonunun rhCA VII enzimi için etkili bir inhibisyon sağladığı sonucuna varılmıştır.

Sefalosporin grubu kendi içinde kıyaslandığında, sefaperazon sodyumun grupta bulunan diğer antibiyotiklerle göre en iyi inhibisyon etkisi göstermiştir ( $K_i:0,304 \text{ mM}$ ) Bu da yukarıda bahsedildiği gibi yapısında hidroksil iyonu ihtiva etmesiyle açıklanabilir. Florokinon sınıfına giren antibiyotikler (siprofloksasin, levofloksasin, oflaksasin ve moksofloksasin) rhCA VII enzimi üzerine inhibisyon etkisi göstermemiştir. Aminoglikozit sınıfı antibiyotikler yapısında hidroksil ve amino grupları ihtiva etmektedir. Bu sınıf antibiyotik netilmisin haricinde rhCA VII enziminin inhibisyonunda etkili olmuştur.

Linkozamidler sınıfında bulunan linkomisin HCl ve klindamisin fosfat kendi içinde kıyaslandığında klindamisin fosfat daha fazla inhibisyon etkisi göstermiştir ( $K_i:1,80 \text{ mM}$ ). Bu antibiyotiğin bir klor atomu ihtiva etmesi inhibisyon oranını yaklaşık 5,3 kat

değiştirmiştir. Antistafilokokal sınıfı antibiyotiklerde vankomisin HCl teikoplanine göre 11 kat daha etkili bir inhibisyon sergilemiştir. Bunu da teikoplaninden fazladan bir klor atomu ihtiva etmesi sonucuna bağlayabiliriz. Buna göre, rhCA VII enziminin klor, amino ve hidroksil gruplarına karşı hassas olduğu ve bu grupları serbest olarak ihtiva eden moleküllerin rhCA VII enzimi için potansiyel inhibitör olabileceği sonucuna varabiliriz.

Ayrıca bu tez kapsamında çalışılan bütün antibiyotiklerin inhibisyon türü incelendiğinde sadece aminoglikozit sınıfında bulunan kanamisin sülfat ile linkozamidler sınıfında bulunan linkomisin HCl yarışmalı inhibisyon etkisi göstermiştir. Yapısında bulunan hidroksil iyonları aktif bölgeye bağlanma konusunda substratla yarışma içerisindedir. hCAVII enziminin aktivitesinin azalması bazı durumlarda hayati tehlike doğuran sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle bu enzimin hangi maddeler tarafından inhibe edildiğinin araştırılması oldukça önemlidir. Bunun için de çok daha kapsamlı inhibisyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bu bilgiler göz önüne alındığında bu tez kapsamında yapılan çalışmaların önemi anlaşılmaktadır.

Yapılan deneysel çalışmalar ışığında elde edilen verilerden faydalanarak tedavi edici amaçlar için, elde edilmesi zor olan proteinlerin kolay ve yüksek verimde üretilmesi oldukça değerli olan bir durum olmasına ek olarak tartışmasız oldukça büyük bir önem taşımaktadır. Bu nedenle mevcut çalışmanın getirmiş olduğu sonuçlar hem literatüre önemli ölçüde katkı sağlamış hem de rekombinant teknolojinin asıl hedefi olan kısa sürede verimli ürün elde etme hedefinin amacına ulaştığının bir göstergesi olmuştur.

Günümüzde çeşitli hastalıkların işleyiş mekanizmalarını çözme ve doğru teşhisi koyup gerekli tedavi yaklaşımları anlamında gerek tıp alanında, gerek genetik alanında ve gerekse proteinler hakkında sahip olunan bilgi düzeyindeki artışa bağlı olarak yeni bir çağa yaklaşılmaktadır. Bahsi geçen konu uzun yıllardır bilim insanları tarafından uygulamaya konulmaktadır. Günümüzde birçok hastalığın teşhis ve tedavisinde kullanılan antikorlar, aşılar, doğal interferonlar ve çeşitli metabolik enzimler gibi birçok insan proteini rekombinant olarak üretilerek kullanıma sunulmuştur. Bu ürünler tıp başta olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır (Leader *et al.* 2008).

Yakın gelecekte de bu amaca uygun bir şekilde on binlerce insan veya başka tür organizmalara ait proteinlerin rekombinant teknoloji ile elde edilmesi yüksek oranda gerçekleşme ihtimali olan bir durumdur. Sonraki yıllarda bu teknoloji daha da gelişerek üretilen rekombinant ürünler ayrıca sinerjistik etki gösterebilecek başka küçük moleküllerle birleştirilerek kullanımları gerçekleştirilebilecektir (Cunningham *et al.* 2004).

Gerek gelişen teknolojik imkânlar olsun, gerek yeni üretim metotları olsun ve gerekse bugüne kadar elde edilen verilerin kullanılmasıyla olsun rekombinant teknoloji sayesinde hem daha ucuz ve hem de daha fazla miktarlarda ürün elde edilmesi varsayımlar arasındadır. Çok sayıda biyoteknoloji ve farmakoloji firması bünyesinde görev alan protein üretim birimleri, yeni ilaçlar keşfetme konusunda oldukça mühim bir önem taşımaktadırlar. Bu birimlerin amacı rekombinant proteinlerin kullanılmasıyla ilaç keşfi için hayati önemi olan yolakların mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlamaktır. Bu nedenle daha hızlı ve daha yüksek verimle rekombinant ürün elde etmek bu amaçla çalışan birçok firma için oldukça önemli rol oynamaktadır.

### **Sonuç olarak bu tez kapsamında;**

1. hCA VII enzimine ait gen bölgesi, gene özgü primerlerin kullanıldığı PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı.
2. PCR ürünü TA klonlama yöntemi ile pET SUMO vektörüne yerleştirildi.
3. hCA VII enziminin gen bölgesini taşıyan muhtemel rekombinant vektör, *E.coli* (One Shot® Mach1™-T1R) hücrelerine transforme edildi.
4. Koloni PCR yapıldı. Doğru şekilde geni aldığı belirlenen koloniden plazmit saflaştırıldı ve DNA dizi analizi yapıldı.
5. Saflaştırılan rekombinant plazmit *E.coli* BL21 (DE-3) bakterisine transforme edildi ve IPTG ile indüklenerek genin ekspresyonu sağlandı.
6. Saflaştırılan ürün spesifik aktivite tayin yöntemi ve Western blot analizi ile doğrulandı.

7. Rekombinant vektörü taşıyan hücreler indükleyici bir ajanın olduğu sıvı besiyerinde büyütüldükten sonra lizis tamponunda parçalanıp hücre içeriği açığa çıkarıldı.
8. SUMO-hCA VII füzyon proteini nikel reçineli afinite kromatografisi ile %48,07 verimle, 7,02 EU/mg spesifik aktivite ile yaklaşık 21 kat saflaştırıldı.
9. SDS-PAGE ile füzyon proteinin saflığı kontrol edildi ve molekül kütlesi 46,77 kDa olarak hesaplandı.
10. hCA VII enziminin karakterizasyonu yapılarak enzimin optimum iyonik şiddet, optimum pH, optimum sıcaklık,  $E_a$ ,  $\Delta H$ ,  $Q_{10}$ ,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi.
11. hCA VII enzimi aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkileri incelendi. Bu amaçla; ampisilin sodyum, piperasilin sodyum, amoksisilin, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, seftriakson sodyum, sefoperazon sodyum, amikasin sülfat, kanamisin sülfat, gentamisin sülfat, tobramisin, netilmisin, siprofloksasin, levofloksasin, ofloksasin, moksofloksasin, rifamisin sodyum, vankomisin HCl, teikoplanin, linkomisin HCl, klindamisin fosfat, ornidazol, metronidazol bileşikleri kullanıldı.
12. hCA VII enzimi aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkisi gösteren ampisilin sodyum, piperasilin sodyum, amoksisilin, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, seftriakson sodyum, sefoperazon sodyum, amikasin sülfat, kanamisin sülfat, gentamisin sülfat, tobramisin, netilmisin, siprofloksasin, levofloksasin, ofloksasin, moksofloksasin, rifamisin sodyum, vankomisin HCl, teikoplanin, linkomisin HCl, klindamisin fosfat, ornidazol, metronidazol bileşikleri için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplanarak, inhibisyon tipleri belirlendi.
13. Çalışma kapsamında elde edilen bütün sonuçlar Çizelge 5.1'de aşağıdaki gibi özetlendi.

**Çizelge 5.1.** hCA VII enziminin saflaştırılması ve inhibisyonu ile ilgili sonuçlar

<b>hCAVII Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar</b>			
Spesifik aktivite (EU/mg protein)	<b>7,02</b>		
Saflaştırma katsayısı	<b>21,27</b>		
Verim (%)	<b>48,07</b>		
<b>Molekül Kütlesi Tayini (kDa)</b>			
SDS-PAGE metodu ile (kDa)	<b>46,7</b>		
<b>Karakterizasyon Çalışmaları</b>			
Optimum pH (Tris /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	<b>8,0</b>		
Optimum iyonik şiddet (mM)	<b>800</b>		
Optimum sıcaklık (°C)	<b>50</b>		
E <sub>a</sub> (kcal/mol)	<b>1,843</b>		
ΔH (kcal/mol)	<b>1,199</b>		
Q10	<b>1,4</b>		
K <sub>M</sub> (mM)	<b>1,36</b>		
V <sub>max</sub> (EU/mL)	<b>0,405</b>		
<b>Kinetik Çalışmalar</b>			
<b>Antibiyotikler</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>	<b>K<sub>i</sub> (mM)</b>	<b>İnhibisyon Tipi</b>
Ampisilin sodyum	13,86	8,46	Yarı yarışmalı
Piperasilin sodyum	4,23	7,78	Yarışmasız
Amoksisilin	0,06	0,0006	Yarı yarışmalı
Sefazolin sodyum	34,65	4,95	Yarı yarışmalı
Sefuroksim sodyum	5,06	5,34	Yarı yarışmalı
Seftriakson sodyum	53,32	157,6	Yarışmasız
Sefoperazon sodyum	0,48	0,304	Yarı yarışmalı
Amikasin sülfat	3,96	8,27	Yarışmasız
Kanamisin sülfat	0,081	0,032	Yarışmalı
Gentamisin sülfat	3,52	0,73	Yarı yarışmalı
Tobramisin	0,059	0,012	Yarı yarışmalı
Netilmisin	-	-	-



**Çizelge 5.1. (devam)**

Siprofloksasin	-	-	-
Levofloksasin	-	-	-
Ofloksasin	-	-	-
Moksofloksasin	-	-	-
Rifamisin sodyum	0,00056	0,000293	Yarışmalı
Vankomisin HCl	0,051	0,078	Yarışmasız
Teikoplanin	0,614	0,89	Yarışmasız
Linkomisin HCl	8,25	9,52	Yarışmalı
Klindamisin fosfat	7,62	1,798	Yarı yarışmalı
Ornidazol	-	-	-
Metronidazol	-	-	-

**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. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 3583–3587.
- Adeva-Andany, M.M., Fernandez-Fernandez, C., Sanchez-Bello, R., Donapetry-García, C., Martínez-Rodríguez, J., 2015. The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans. *Atherosclerosis*, 241:183-191.
- 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), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11, 899–902.
- Akincioğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2013. Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 1379–1385.
- Akkemik, E., Çalışır, Ü., Çiçek, B., 2017. İnsan karbonik anhidraz I,II izoenzim aktiviteleri üzerine bazı tiyocrown eterlerin etkisi. *BAUN Fen Bil. Enst. Dergisi*, 19(2), 192-199.
- Aksu, K., Topal, F., Gülçin, I., Tümer, F., Göksu, S., 2015. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities of novel symmetric sulfamides derived from phenethylamines. *Archiv der Pharmazie*, 348(6), 446-455.
- Alterio V., Di Fiore A., D'Ambrosio K., Supuran C.T., De Simone G., 2009. X-ray crystallography of carbonic anhydrase inhibitors and its importance in drug design. In: Supuran CT, Winum J-Y editors. *Drug design of zinc-enzyme inhibitors: functional, structural, and disease applications*. Hoboken, NJ: Wiley, 73–138.
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio K, Supuran, C.T., De Simone G., 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chemical Reviews*, 112:4421–4468.
- Alterio, V., Fiore D.A., D'Ambrosio, K., Supuran, C.T., Simone G.D., 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *American Chemical Society*, 112, 4421–4468.
- Angeli, A., Tanini, D., Capperucci, A., Supuran, C.T., 2018. First evaluation of organotellurium derivatives as carbonic anhydrase I, II, IV, VII and IX inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 76: 268–272.
- Anonim, 2018. <http://www.antibiyotik.gen.tr>. 25.04.2018
- Anonymous, 2018. [www.drugbank.ca/drugs](http://www.drugbank.ca/drugs). 28.02.2018
- Aslan, H.E., 2013. Koyun karaciğerinden aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin saflaştırılması ve bazı fenolik asitlerin enzimlerin aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Aspatwar, A., Haapanen, S. and Parkkila, S., 2018. An Update on the Metabolic Roles of Carbonic Anhydrases in the Model Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Metabolites*, 8(1), 22; doi:10.3390/metabo8010022.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014. Biyokimya. Palme Yayıncılık, 241-247p, Ankara.
- Bertucci A, Moya A, Tambutté S, Allemand D, Supuran CT, Zoccola D., 2013. Carbonic anhydrases in anthozoan corals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21:1437–50.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Büyükokuroğlu, M.E., 2002. Effects of gentamicin sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25:966-969.
- Beydemir, Ş., Gülçin İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197.
- Boggio, R., Colombo, R., Hay, R. T., Draetta, G. F., Chiocca, S., 2004. A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Molecular cell*, 16(4), 549-561.
- Bootorabı F., 2011. Production and Characterization of Carbonic Anhydrase VII, 10-12.
- Boztaş, M., Çetinkaya, Y., Topal, M., Gülçin, İ., Menzek, A., Şahin, E., Tanc, M., Supuran, C.T., 2015. Synthesis and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII inhibitory effects of dimethoxy-bromophenol derivatives incorporating cyclopropane moieties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58 (2), 640-650.
- 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.
- Bülbül, M., Hisar, R.O., Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. The *In vitro* And *In Vivo* Inhibitory Effects Of Some Sulfonamide Derivatives On Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Erythrocyte Carbonic Anhydrase Activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 371-375.
- Bülbül, M., Saraçoğlu, N., Küfrevioğlu, Ö.İ., Çiftçi M., 2002. Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Syntesis and investigation of inhibition effects. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 2561.
- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Ceylan, H., 2016. İnsan Beyin Asetilkolinesteraz Enziminin Klonlanması, E. Coli'de Ekspresyonu Ve Enzimin Karakterizasyonu Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Champion™ pET SUMO Protein Ekspresyon kiti prosedürü, 2010.
- 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., New York, 2165–2204.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Muesser, M., Harstrick, A., Versluis, C., Chau, I., Cutsem, E.V., 2004. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(4), 337-345. doi: 10.1056/NEJMoa033025
- Danişan, A., Ceyhan, D., Oğus, I. H. and Özer, N., 2004. Purification and Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Rat Small Intestine. *Protein J*, 23, 317-324.

- De Simone G., Supuran C.T., 2012. (In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111:117–123.
- Demir, Y., 2014. İnsan Karaciğeri PON1 Enzim Geninin Klonlanması, İnküzyon Cisimciklerinden Arındırılarak Protein Yapısının Yeniden Katlandırılması Ve Enzimin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Demir, Y., Şengül, B., Ergun, B., Beydemir, Ş., 2017. Alcohol dehydrogenase from sheep liver: Purification, characterization and impacts of some antibiotics. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 7(3), 151-159.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry with clinical correlations*. 5th Ed., Wiley-Liss Inc., New York.
- Dhami, N.K., Reddy, M.S., Mukherjee, A., 2014. Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages, *Frontiers in Microbiology*, 5:304.
- Di Fiore A, Truppo E, Supuran CT, Alterio V, Dathan N, Booterabi F., 2010. Crystal structure of the C183S/C217S mutant of human CA VII in complex with acetazolamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20:5023–5026.
- Dorval, V. and Fraser, P.E., 2006. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 9919-9924.
- Ekinci, D, Beydemir, Ş., 2009. Evaluation of the impacts of antibiotic drugs on PON 1; a major bioscavenger against cardiovascular diseases. *European Journal of Pharmacology*, 617(1-3),84-89.
- Ekinci, D., Beydemir, S., Alım, Z., 2007. Some drugs inhibit in vitro hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. *Pharmacological Reports*, 59, 580–587.
- Erdoğan, O., Ceyhun, S.B., Şişecioglu, M., Karakuş, E., Budak H., 2016. III. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı. Aktif Yayınevi. 77-95, Erzurum.
- Feldstein, J.B., Silverman, D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 259:5447-5453.
- Gambhir K.K., Ornasir J., Headings V., Bonar A., 2007. Decreased total carbonic anhydrase esterase activity and decreased levels of carbonic anhydrase 1 isozyme in erythrocytes of type II diabetic patients. *Biochemical Genetics*, 45:431–439.
- Gao B.B., Clermont A., Rook S., 2007. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nature Medicine*, 13:181–8.
- Gilmour, K.M., 2010. Perspectives on carbonic anhydrase. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 157: 193-197.
- Gitto, R., Agnello, S., Stefania, F., Daniela, V., Supuran, C.T., Chimirri, A., 2010. Identification of Potent and Selective Human Carbonic Anhydrase VII (hCA VII) Inhibitors, *ChemMedChem*. 5, 823 – 826.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2015. Carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitory effects of carbamates and sulfamoylcarbamates. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(2), 316-320.

- Göçer, H., Gülçin İ., 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *International Journal of Academic Research*, 5, 149-154.
- Gönül N., 2013. Karaciğer Spesifik Tıp60 Nakavt Farelerde Karbonik Anhidraz Enzimlerinin (I, III ve VII) Ekspresyon Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Hall, G.E. and Schraer, R., 1983. Characterisation of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *Salmo Gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75B, 81-92.
- Hassan, Md. I., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad. F., Sly, W.S., 2013. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15;21(6):1570-1582.
- Hen, N., Bialer, M., Yagen, B., Maresca, A., Aggarwal, M., Robbins, A. H., McKenna, R., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2011. Anticonvulsant 4 Aminobenzenesulfonamide Derivatives with Branched-Alkylamide Moieties: X-ray Crystallography and Inhibition Studies of Human Carbonic Anhydrase Isoforms I, II, VII, and XIV. *J. Med. Chem.* 54, 3977–3981.
- Herrmann, J., Lerman, L. O., & Lerman, A., 2007. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circulation research*, 100(9), 1276-1291.
- Hewett-Emmett, 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 29: 78.
- Hilvo M., Innocenti A., Monti S.M., De Simone G., Supuran C.T., Parkkila S., 2008. Recent advances in research on the most novel carbonic anhydrases, CA XIII and XV. *Current Pharmaceutical Design* 14: 672-678.
- Holmes, R., S., 1997. Purification, Molecular Properties and Ontogeny of Carbonic Anhydrase Isozymes Evidence for A, B and C Isozymes in Avian and Mammalian Tissues, *European Journal of Biochemistry*, 78: 511.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, AD., Heyneker, HL., Bolivar, F., Boyer, HW., 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, 9;198(4321):1056-63.
- Juozapaitienė, V., Bartkutė, B., Michailovienė, V., Zakšauskas, A., Baranauskienė, L., Satkūnė, S., Matulis, D., 2016. Purification, enzymatic activity and inhibitor discovery for recombinant human carbonic anhydrase XIV. *Journal of Biotechnology*, 240:31–42.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Kılıç, D., Erdoğan, O., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2017. Effect of mutation in active site residue Trp209 to Val, Leu, Ile and Pro on the catalytic activity and affinity for some benzenesulfonamides of human carbonic anhydrase II. *Turkish Journal of Biology*, 41, 835-840.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Leader, B., Baca, Q. J., and Golan, D. E., 2008. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(1), 21-39. doi: 10.1038/nrd2399

- Lee, C.D., Sun, H.C., Hu, S.M., Chiu, C.F., Homhuan, A., Liang, S.M., Leng, C.H. and Wang, T.F., 2008. An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins. *Protein Science*, 17,1241–1248.
- Leppilampi, M., 2006. Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, University of Oulu, P.O. Box 5000, FI-90014 University of Oulu, Finland Acta Univ. Oul. D 868, Oulu, Finland.
- Lindskog, S., Coleman, J.E., 1973. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*;70, 2505-2508.
- Lineweaver, H., Burk, D. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S., Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquatic Toxicology*, 48, 561-571.
- Lowe N., Brady H.J., Barlow J.H., Sowden J.C., Edwards M., Butterworth P.H., 1990. Structure and methylation patterns of the gene encoding human carbonic anhydrase I. *Gene*, 93:277–83.
- Marblestone, J.G., Edavettal, S.C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X., & Butt, T.R., 2006. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Science*, 15(1), 182-189.
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 126-130.
- Meldrum, N.U., Roughton, F.J.W., 1933. Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *The Journal of Physiology*. 80, 113–142.
- Mirjafari, P., Asghari, K., Mahinpey, N., 2007. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO<sub>2</sub> sequestration purposes, *Industrial & Engineering Chemistry Research* ,46(3):921-926.
- Missner, A., Kugler, P., Saparov, S.M., Sommer, K., Mathai, J.C., Zeidel, M.L., Pohl, P., 2008. Carbon dioxide transport through membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 283:25340-25347.
- Montgomery J.C., Venta P.J., Eddy R.L., Fukushima Y.S., Shows T.B., Tashian R.E., 1991. Characterization of the human gene for a newly discovered carbonic anhydrase, CA VII, and its localization to chromosome 16. *Genomics*, 11: 835-48.
- Monti M. S., Supuran C.T. De Simone G., Di Fiore A., 2015. Carbonic Anhydrase VII. *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts*, 151–168.
- Muller, S., Hoegge, C., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S., 2001. SUMO, Ubiquitin's Mysterious Cousin. *Nature Molecular Cell Biology Review*, 2, 202-210.
- Neri D, Supuran CT., 2011. Interfering with pH regulation in tumors as a therapeutic strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10:767–77.
- Onganer, Y., Şakiroğlu, H. and Kufrevioğlu, O. I., 1998. Temperature effect on polyphenol oxidase and investigation of thermodynamic functions. *Chim. Acta Turcica*, 26, 41-46.
- Öztaşkın, N., Taslimi, P., Maraş, A., Gülçin, İ., Göksu, S., 2017. Novel antioxidant bromophenols with acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory actions. *Bioorganic Chemistry*, 74: 104–114.

- Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H., Shah, G.N., Grubb, J.H., Waheed, A., Sly, W.S., 2001. Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 98: 1918-1923.
- Qiao, M., Ying, G.G., Singer, A.C., Zhu, Y.G., 2018. Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, 160-172.
- Ramanan, R., Kannan, K., Deshkar, A., Yadav, R., Chakrabarti, T., 2010. Enhanced algal CO<sub>2</sub> sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp. and *Spirulina platensis* in a mini-raceway pond, *Bioresource Technology*, 101;8: 2616-2622.
- Ramanan, R., Kannan, K., Sivanesan, S., Mudliar, S., Kaur, S., Tripathi, A.K., Chakrabarti, T., 2009. Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from *Citrobacter freundii*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:981-987.
- Ridderstrale Y., Fierke C.A., Roush E.D., Wistrand P.J., 2002. Localization of a protein inhibitor of carbonic anhydrase in pig tissues. *Acta Physiologica Scand*, 176:27–31.
- Roy, A., Taraphder, S., 2010. Role of protein motions on proton transfer pathways in human carbonic anhydrase II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 352-361.
- Saitoh, H., Pu, R. T., Dasso, M., 1997. SUMO-1: Wrestling with a New Ubiquitin Related Modifier. *Trends Biochemical Science*, 22, 374-376.
- Schilling, C.H., Letscher, D., Palsson, B.Ø., 2000. Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway oriented perspective. *Journal of theoretical biology*, 203, 229–248.
- Scozzafava, A., Kalin, P., Supuran, C.T., Gülçin, İ., Alwasel S., 2015. The impact of hydroquinone on acetylcholine esterase and certain human carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I, II, IX, and XII). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(6), 941-946.
- Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2002. *Biorganic Medicinal Chemistry Letters*, 12, 1177-1180. With permission from Elsevier.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, p: 403.
- Şengül, B., Beydemir, Ş., 2017. The interactions of cephalosporins on polyol pathway enzymes from sheep kidney. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(1), 35-44.
- Smith K.S., Ferry J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases, *FEMS Microbiology Reviews*, 24,335-366.
- Sugrue, M.F., 2000, Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research* 19 (1): 87-112.
- Sumi, K.R., Kimb, S.C., Natarajanc, S., Choid, K.S., Choib, M.K., Kimc, H.T., Parkc, J., Nouc, I.S., Gilmoire, K.M., Khoa, K.H., 2018. Molecular cloning and characterization of secretory carbonic anhydrase VI in pufferfish (*Takifugu rubripes*). *Gene*, 640:57–65.
- Supuran C.T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7:168–81.
- Supuran C.T., 2011. Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics? *Frontiers in Pharmacology*, 2:1–6.

- Supuran C.T., 2012. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27:759–72.
- Supuran C.T., De Simon G., 2015. Carbonic anhydrases as biocatalysts.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors--Part 94. 1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamidederivatives as antitumor agents?, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35: 867.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1, 61-97.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2007. Carbonic anhydrase as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 4336-4350.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2007. Carbonic anhydrase as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 4336-4350.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23, 146-189.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23, 146-189.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J., 2004. Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators. CRC Press Online, Boca Raton.
- Tripp, B.C., Bell, C.B., Cruz, F., Krebs, C., Ferry, J.G., 2004. A role for iron in an ancient carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(8):6683-6687.
- Truppo, E., Supuran, C.T., Sandomenico, A., Vullo, D., Innocenti, A., Di Fiore A., Alterio, V., De Simone, G., Monti, S.M., 2012. Carbonic anhydrase VII is S-glutathionylated without loss of catalytic activity and affinity for sulfonamide inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22: 1560–1564.
- Ugochukwu *et al.* 2010. Crystal Structure of Human Carbonic Anhydrase VII [isoform 1], CA7. <https://doi.org/10.2210/pdb3MDZ/pdb>
- Uygun, M., 2012, Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojellerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adnan Menderes Üniversitesi.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases. B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4229.
- Villalba, M.L., Palestro, P., Ceruso, M., Gonzalez Funes, J.L., Talevi, A., Blanch, L.B., Supuran, C.T., 2016. Gavernet, L. Sulfamide derivatives with selective carbonic anhydrase VII inhibitory action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24; 894–901.
- Vullo, D., Voipio, J., Innocenti, A., Rivera, C., Ranki, H., Scozzafava, A., Kailab, K., Supuran, C.T., 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the human cytosolic isozyme VII with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15: 971–976.
- Wang, Z., Li, H., Guan, W., Ling, H., Wang, Z., Mu, T., Shuler, F.D., Fang, X., 2010. Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility. *Protein expression and purification*, 73(2), 203-208.
- Waugh, D.S., 2005. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnology*, 23,316–320.
- Wilbur, K.M., Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.



- Wistrand, P. J., 1981. The Importance of Carbonic Anhydrase B and C for the Unloading of CO<sub>2</sub> by the Human Erythrocyte, *Acta Physiologica Scandinavica*, 343.
- Yazıcıoğlu, M., 2013. Sığır Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, On Dokuz Mayıs Üniversitesi.
- Yerlikaya, E., 2012. İnsan Karbonik Anhidraz IX İzoenziminin Klonlanması, Üretilmesi, Antitümör İlaçların ve Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Yıldırım, A., Atmaca, U., Keskin, A., Topal, M., Çelik, M., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2015. N-Acylsulfonamides strongly inhibit human carbonic anhydrase isoenzymes I and II. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(10), 2598-2605.
- Yin, J., Li, G., Rena, X., Herrler, G., 2007. Select What You Need: A Comparative Evaluation of the Advantages and Limitations of Frequently Used Expression Systems for Foreign Genes. *Journal of Biotechnology*, 127, 335.

## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kars’ta tamamladı. 2008 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümünden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yılın Ağustos ayında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2015 Mayıs ayında tamamladı. Aynı yılın Ağustos ayında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı.

