

TİYADIAZOL TÜREVLERİ BİLEŞİKLERİNİN KARBONİK  
ANHİDRAZ İNHİBİTÖRÜ OLARAK İNSAN KARBONİK  
ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Başak GÖKÇE

Yüksek Lisans

Kimya Anabilim Dalı

Şubat-2009

TİYADIAZOL TÜREVLERİ BİLEŞİKLERİNİN KARBONİK  
ANHİDRAZ İNHİBİTÖRÜ OLARAK İNSAN KARBONİK  
ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Başak GÖKÇE

Dumlupınar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Kimya Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Şubat-2009

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Başak GÖKÇE'nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Tiyadiazol Türevleri Bileşiklerin Karbonik Anhidraz İnhibitörü Olarak İnsan Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

27 / 02 / 2009

**İmza:**

Üye : Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Üye : Doç. Dr. İsmail KIRAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Bülent BÜYÜKKIDAN

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2009 gün ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atalay KÜÇÜKBURSA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**TİYADİAZOL TÜREVLERİ BİLEŞİKLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ  
İNİHİTÖRÜ OLARAK KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Başak GÖKÇE

Kimya, Yüksek Lisans Tezi, 2009

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

**ÖZET**

Karbonik anhidraz (EC. 4. 2. 1. 1), CO<sub>2</sub>'in, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve H<sup>+</sup> iyonlarına iki basamakta dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen, çinko iyonlu metaloenzimlerden biridir. İnsan gözündeki CA-I, CA-II ve CA-IV izoenzimleri bulunur. Karbonik anhidraz inhibitörleri, aköz humorun salgılanmasıyla oluşan yüksek göz içi basıncın (IOP) düşürdükleri için, glokom hastalığı tedavisinde etkili olarak kullanılırlar.

Bu çalışmada glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni karbonik anhidraz (CA) inhibitörlerinin, karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Önce insan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimleri afinite jeli kullanılarak (Sephrose-4B-L-tirozin-sülfonilamid) saflaştırılmış ve daha sonra bu enzimlerle kinetik çalışmalar yapılmıştır.

Daha sonra sentezlenen yeni bileşiklerin (1, 2, 3) insan eritrosit HCA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelendi. Çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesinin belirlenmesinde hidrataz ve esteraz aktivitelerinden faydalanıldı. HCA'nın hidrataz ve esteraz aktivitesi üzerinde 1, 2, 3 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için % aktivite-[I] grafikleri çizilerek I<sub>50</sub> değerleri bulunmuştur. CO<sub>2</sub>-Hidrataz aktivitesine göre inhibisyon gösteren 1, 2 ve 3 bileşiklerinin I<sub>50</sub> değerleri (enzimli reaksiyon süresini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu); HCA I için 0,080 ile 0,800 µM ve HCA II için 0,053 ile 0,480 µM arasında bulundu. Esteraz aktivitesine göre ise; HCA I için 0,097 µM ile 3,798 µM arasında HCA II için 0,046 µM ile 0,361 µM I<sub>50</sub> değerleri bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Glokom, I<sub>50</sub> Değerleri, Karbonik Anhidraz, Sülfonamidler

**THE INVESTIGATION OF THE CARBONIC ANHYDRASE INHIBITION EFFECTS  
OF THIADIAZOLE DERIVATIVES ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE  
ENZYME**

Başak GÖKÇE

Chemistry, M. S. Thesis, 2009

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

**SUMMARY**

Carbonic anhydrases (E.C. 4.2.1.1.) are family of zinc metalloenzymes that catalyze the reversible hydration of carbon dioxide in a two-stop reaction to yield bicarbonate and proton. The isoenzymes of human eye are CA-I, CAII and CA-IV. Carbonic anhydrase inhibitors, which reduce aqueous production with a corresponding decrease in intraocular pressure (IOP), have been used as ocular hypotensive agents for the treatment of glaucoma.

In this study, new carbonic anhydrase inhibitors's effects on carbonic anhydrase enzyme as candidates for treatment of glaucoma were investigated.

First, carbonic anhydrase enzymes from human erythrocyte were purified using affinity gel and all of the investigations were carried out with these enzymes.

Later, inhibition effects of these new compounds (1, 2, 3 ) on human carbonic anhydrase enzymes (HCA I and HCA II) were investigated in vitro. In the studies, it was taken advantage of hydrates and esterase activities for determining of carbonic anhydrase activities. It was observed that compounds (1, 2, 3) showed inhibition effect on HCA hydratase and esterase activity.  $I_{50}$  values were determined by drawing % activity-[I] graphs for drugs showing inhibition effects. For  $\text{CO}_2$ -hydratase activity of compound (1), (2), (3) inhibition effect ranged from 0,080 to 0,800  $\mu\text{M}$  for HCA I and 0,053 to 0,480  $\mu\text{M}$  with  $I_{50}$  for HCA II (molarity of inhibitor producing a %50 inhibition of CA activity). As for esterase activity of p-nitrophenyl acetate, compounds (1), (2), (3) had inhibition ranging from 0,097 to 3,798  $\mu\text{M}$  for HCA I and 0,046 to 0,361  $\mu\text{M}$  for HCA II with  $I_{50}$ .

**Key Words:** Glaucoma,  $I_{50}$  Values, Carbonic Anhydrase, Sulfonamides

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana bu çalışma olanağını sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN'a, bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi süresince desteğini ve ilgisini esirgemeyen, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Metin BÜLBÜL'e, teşekkürü bir borç bilirim.

Bu araştırmayı proje ile destekleyen Tübitak'a, yüksek lisans arkadaşlarım Hülya GÜLERYÜZ, Samet MERT, Hatice GÜNHAN, Barış Seçkin ARSLAN'a, yakın ilgi ve alakalarını gördüğüm Kimya Bölümünün değerli öğretim elemanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasınca bana moral ve destek veren, ayrıca tüm hayatım boyunca yanımda olan aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

Başak GÖKÇE

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	III
ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ .....	5
2. 1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi.....	5
2. 2.Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri.....	6
2.3. Karbonik Anhidraz I.....	8
2.4. Karbonik Anhidraz II.....	8
2. 5. Karbonik Anhidraz III.....	9
2. 6. Karbonik Anhidraz IV.....	9
2. 7. Karbonik Anhidraz VA.....	10
2. 8. Karbonik Anhidraz VB.....	10
2. 9. Karbonik Anhidraz VI.....	10
2. 10. Karbonik Anhidraz VII.....	11
2. 11. Karbonik Anhidraz VIII.....	11
2. 12. Karbonik Anhidraz IX.....	12
2. 13. Karbonik Anhidraz X.....	12
2. 14. Karbonik Anhidraz XI.....	12
2. 15. Karbonik Anhidraz XII.....	13
2. 16. Karbonik Anhidraz XIII.....	13
2. 17. Karbonik Anhidraz XIV.....	14

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devamı)

	<u>Sayfa</u>
2. 18. Karbonik Anhidraz XV.....	14
2. 19. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Fizyolojik Fonksiyonları.....	15
2. 20. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları.....	17
2. 20. 1. $\alpha$ – Karbonik Anhidraz.....	17
2. 20. 2. $\beta$ – Karbonik Anhidraz.....	17
2. 20. 3. $\gamma$ – Karbonik Anhidraz.....	18
2. 21. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması.....	19
2. 22. Karbonik Anhidraz Aktivitesi.....	20
2. 23. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	21
2. 24. Glokom Tedavisinde Kullanılan Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	24
2. 25. Hastalıkların Tedavisinde ve Teşhisinde CA İnhibitörlerinin Önemi.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	29
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	29
3.3. Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	30
3.4. Yöntemler.....	32
3.4.1 Protein Tayini.....	32
3.4.1.1. Kalitatif Protein Tayini.....	32
3.4.1.2. Coomassie Blue Yöntemi ile Protein Tayini.....	32
3.4.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini.....	32
3.4.2.1. CO <sub>2</sub> -Hidrataz Aktivitesi Tayini.....	32
3.4.2.2. Esteraz Aktivitesi Tayini.....	33
3.4.3. İnsan Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması.....	34
3.4.3.1. Sepharose-4B Matriksi Üzerinde Afinite Jelinin Hazırlanışı.....	34
3.4.3.2. Sapharose-4B'nin Aktifleştirilmesi ve Tirozin Takılması	34
3.4.3.3. Sülfonilamid kenetlendirilmesi	34
3.4.3.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile İzoenzimlerin Saflığının Kontrolü...	36
3.5. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi.....	37
3.5.1 Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit CA Enziminin Hidrataz Aktiviteleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	37



## İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devamı)

	<u>Sayfa</u>
3. 5. 2 Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit CA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	37
3. 5. 3. Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit CA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin $K_i$ Sabitleriyle Bulunması.....	38
4 ARAŞTIRMA BULGULARI.....	39
4. 1 HCA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları.....	39
4. 2 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen HCA Enziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları.....	41
4. 3 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	41
4. 3. 1 Sentezlenen Bileşiklerin insan Eritrosit CA enziminin Hidrataz Aktiviteleri Üzerinde inhibisyon Etkilerinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	41
4. 3. 2 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisinin İn Vitro Olarak İncelenmesi.....	48
4. 4 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından $K_i$ Sabitlerinin Bulunması.....	56
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	58
6. KAYNAKLAR.....	64

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Seki</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1 Dönüşümsüz inhibisyon şematik şekli.....	2
1. 2 Yarışmalı inhibisyon şematik şekli.....	3
1. 3 Yarı yarışmalı inhibisyon şematik şekli.....	3
2. 1 HCA II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi.....	17
2. 2 Karbonik anhidrazın katalizlediği CO <sub>2</sub> -hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterişi.....	18
2. 3 HCA II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri.....	21
2. 4 Anyonik inhibitörler ve sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyon mekanizması.....	23
3. 1 Glokom tedavisinde kullanılan bileşiklerin şekilleri .....	25
3. 2 CA I ve CA II inhibisyonunda kullanılan bileşiklerin şekilleri .....	27
4. 1 Afinite jelinin hazırlanması .....	35
5. 1 İnsan eritrositlerinden elde edilen HCA enziminin elüsyonunda; (.) 280 nm'de elde edilen absorbans değerleri.....	39
5. 2 Coomassie-Blue yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik.....	40
5. 3 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerini SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı.....	41
5. 4 CA I enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğin etkisi.....	42
5. 5 CA I enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğin etkisi.....	43
5. 6 CA I enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğin etkisi.....	44
5. 7 CA II enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğin etkisi.....	45
5. 8 CA II enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğin etkisi.....	46
5. 9 CA II enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğin etkisi.....	47

5. 10	CA I enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğin etkisi.....	49
-------	--	----

### ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<b><u>Sekil</u></b>		<b><u>Sayfa</u></b>
5. 11	CA I enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğin etkisi.....	50
5. 12	CA I enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğin etkisi.....	51
5. 13	CA II enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğin etkisi.....	52
5. 14	CA II enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğin etkisi.....	53
5. 15	CA II enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğin etkisi.....	54
5. 16	CA I enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	57
5. 17	CA I enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	57
5. 18	CA I enzimi üzerinde (3) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	58
5. 19	CA II enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	59
5. 20	CA II enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	59
5. 21	CA II enzimi üzerinde (3) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>	
1. 1	CA I enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yolouyla (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	42
1. 2	CA I enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yolouyla (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	43
1. 3	CA I enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yolouyla (3) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	44
1. 4	CA II enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yolouyla (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	45
1. 5	CA II enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yolouyla (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	46
1. 6	CA II enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yolouyla (3) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	47
1. 7	CA I enzimi üzerine esteraz aktivitesi yolouyla (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	49
1. 8	CA I enzimi üzerine esteraz aktivitesi yolouyla (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	50
1. 9	CA I enzimi üzerine esteraz aktivitesi yolouyla (3) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	51
1. 10	CA II enzimi üzerine esteraz aktivitesi yolouyla (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	52
1. 11	CA II enzimi üzerine esteraz aktivitesi yolouyla (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	53
1. 12	CA II enzimi üzerine esteraz aktivitesi yolouyla (3) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	54
1. 13	Sentezlenen bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin in vitro CO <sub>2</sub> -hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.....	55
1. 14	Sentezlenen bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin in vitro esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.....	55
1. 15	Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları.....	58
1. 16	Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları.....	60

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ****Simgeler**

L	Litre
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ M	Mikromolar
nM	Nanomolar

**Açıklama****Kısaltmalar**

CA	Karbonik anhidraz enzimi
CARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
E. C	Enzim kod numarası
E. U	Enzim ünitesi
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
IOP	Yüksek göz içi basıncı
Tris	Trihidroksimetilaminometan

**Açıklama**

## 1. GİRİŞ

Enzimler, günümüzde biyokimya alanında en çok çalışılan konulardan biridir. Enzimlerin, sağlıktan endüstriye konulara kadar çok sayıda geniş uygulama alanı vardır [1].

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir [2]. Vücuttaki tüm reaksiyonlar enzimler tarafından yürütülürler. Enerji açısından mümkün olan birçok biyolojik reaksiyonda enzimler reaktanları uygun yollara seçici olarak kanalize ederler. Böylece enzimler bütün metabolik olaylarda vazgeçilmez öğelerdir [3].

Enzim moleküllerinde aktif bölge denilen özel bir cep yada yuva bulunur. Aktif bölge; substrata tamamlayıcı olan üç boyutlu yapıda aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif bölge substratı bağlayarak bir enzim- substrat (ES) kompleksi meydana getirir. ES, sonradan parçalanarak enzim ve ürüne dönüşür.

Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu katalizlenmeyen reaksiyonlara göre  $10^{15}$  ile  $10^{20}$  kat daha hızlıdır. Tipik olarak, her enzim molekülü saniyede 100 ile 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. [3] Birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Karbonik anhidraz, enzimler arasında en yüksek turnover sayısına sahip olanları arasındadır ( $600.000 \text{ s}^{-1}$ ). Yani bir karbonik anhidraz molekülü  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$  tarafından reaksiyonu 1/600.000 saniyede, yani 1,7 mikro saniye de gerçekleştirilmektedir [3].

Enzimlerin büyük bir kısmının etki gösterebilmesi için protein yapılı olmayan bir kofaktöre gereksinimi vardır. Kofaktör, koenzim adı verilen organik bir bileşik veya metal iyonlu olabilir. Enzim, kofaktörü ile beraber bulunuyor ise holoenzim, holoenzimin kofaktörsüz protein kısmına apoenzim denir. Kofaktör gerektiren enzimlerde; uygun kofaktör yoksa apoenzimin biyolojik aktivitesi yoktur [4]. Bazı enzim-kofaktör bağlanmaları kovalent yapıda veya diyalizle uzaklaştırılamayacak kadar sıkıdır. Böyle kofaktörlere “prostetik grup” adı verilir [1].

Kofaktör olarak metal iyonu kullanan enzimlere metaloenzim denir. Metal iyonları ya asit-baz katalizi, ya kovalent kataliz yapar, yada enzimin konformasyonunda değişiklik yaparak substratın bağlanmasını kolaylaştırır [4].

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan, önemli bir olaydır. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler de

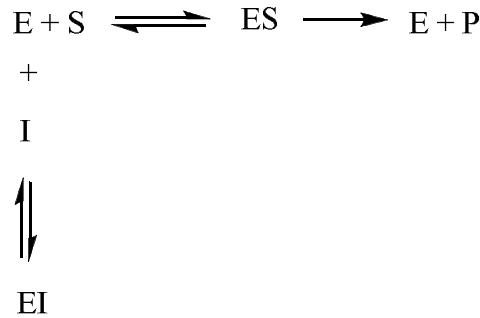
etkilerini bu yolla gösterir. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında önemlidir [2].

Bir enzimin katalitik etkisi birçok yollarla değiştirilebilir. Bir protein olan enzim molekülü denatüre edilirse üç boyutlu yapısı bozulur ve bunun sonucu enzimin katalitik etkisi kaybolur.

Enzimin aktif bölgesini oluşturan fonksiyonel grupları bloke eden herhangi bir reaksiyon, enzim aktivitesini değiştirir veya yok eder. Bu tip bir inhibitör enzime katılınca enzimin orijinal aktivitesi tekrar kazanılmayacak bir şekilde değişikliğe uğrar.

İnhibisyonlar; dönüşümlü (reversible) veya dönüşümsüz (irreversible) olabilir [4].

Dönüşümsüz inhibisyonunda inhibitör enzime ya kovalent olarak ya da zor ayrılan bir kompleks oluşturacak şekilde bağlanırlar. Bu yüzden dönüşümsüz inhibitörlere 'enzim inaktivatörleri' de denir.



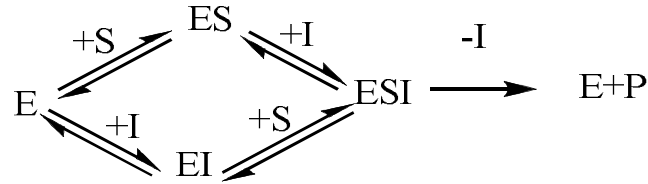
**Şekil 1. 1.** Dönüşümsüz inhibisyon şematik şekli

Dönüşümlü inhibisyonunda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon dört grupta incelenir;

- 1) Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)
- 2) Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif)
- 3) Yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif)
- 4) Lineer Karışık Tip İnhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitör; yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmez. Yarışmalı inhibitör belli

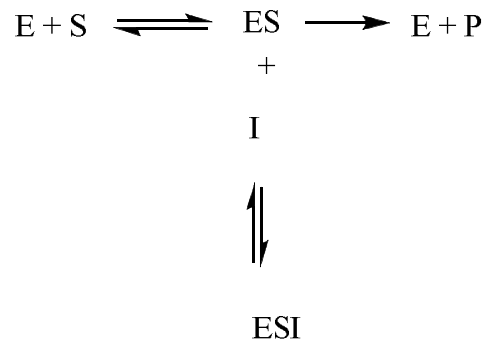
bir substrat için belirlenmiş  $K_M$ 'i (Michaelis sabiti) yükseltir. Bu, yarışmalı bir inhibitör varlığında  $1/2 V_{max}$ 'a erişmek için daha fazla substrat gerekeceği anlamına gelir [2, 3].



**Şekil 1. 2.** Yarışmalı inhibisyon şematik şekli

Dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat, enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini, enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon kaldırılmaz. Enzimin  $V_{max}$  değeri azalırken,  $K_M$  sabit kalır [2].

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime değil, sadece ES kompleksine bağlanabilir. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesi ile inhibisyon artabilir. Buna göre inhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için  $K_M$  azalır. Aynı zamanda ortamda ESI kompleksi sürekli var olacağından  $V_{max}$ 'da düşer. Yarı yarışmalı inhibisyon bir substratlı reaksiyonlarda ender görülür; buna karşılık iki substratlı reaksiyonlarda yaygındır [2].



**Şekil 1. 3.** Yarı yarışmalı inhibisyon şematik şekli



Lineer karışık tip inhibisyon türü yarışmasız inhibisyonun özel bir tipidir. Bu inhibisyon substratın EI kompleksine bağlanabildiği zaman gerçekleşir. Her iki durumda da inaktif ESI kompleksi oluşur. Buraya kadar anlatılan nonkompetetifle aynı gibi görünmesine karşın, EI kompleksinin substrata karşı afinitesi serbest enzime göre daha azdır [5].

İnhibitörleri çok defa yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Gerçekte inhibisyon genellikle karışıktır.

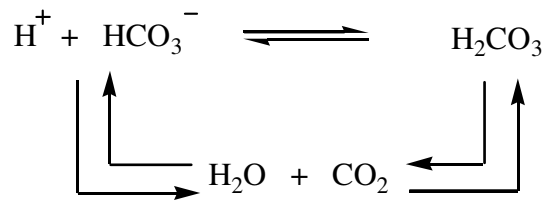
## 2. KARBONİK ANHİDRAZ

### 2.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) ilk keşfedilen  $Zn^{+2}$  iyonlu bir metaloenzimdir. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz (CA), genel olarak metabolik  $CO_2$  transportunun sağlamanın yanı sıra, bir çok dokularda,  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  'in birikiminde de rol almaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrit mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metodlarla, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularda da CA'ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak, biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böbrek ve bakterilerde kabuklu hayvanların kabuk yapısında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu da ıspatlanmıştır. CA sözü geçen canlı hücrelerinde çoğu kez stoplazmada çözülmüş, bazende hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak yer almaktadır [ 6 10].

Eritrosit CA'sının en önemli fonksiyonu ise, doku kılcıl damarlarında, metabolizma ürünü olan  $CO_2$ 'i  $H_2CO_3$ 'e, akciğer pulmoner kapilerde ise  $H_2CO_3$ 'i  $CO_2$ 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek, solunum olayında yer almaktadır.

Katalizlenen reaksiyon;



Böbrek tubullerinde ise, aynı reaksiyonlarla,  $Na^+$  ve  $H_2O$  geri emilimini sağlamaktadır. Diğer dokularda da yine yukarıdaki reaksiyonla ya  $CO_2$  transferini, yada  $H^+$  iyonu birikimini temin ederek, hücre için gerekli ortamı meydana getirir. Nitekim omurgalıların kan ve hücreler arası sıvısındaki en önemli tampon sistemidir [2, 11, 12].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığı gösterilmiştir. Bu durum, mitokondriyel CA enziminin (CA IV), sitrulin sentezi için gerekli

olan  $\text{HCO}_3^-$  iyonunu, sitrik asit devrinden gelen  $\text{CO}_2$ 'den sağlayarak üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanabilir.

Yine iskelet kasında CA, laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [13]. Bitki kloroplastlarındaki CA enziminin rolü, atmosferden gelen  $\text{CO}_2$ 'in yapraklarda  $\text{HCO}_3^-$  halinde taşınması ve daha sonra tekrar  $\text{CO}_2$ 'e dönüştürülerek fotosentezde kullanılması şeklinde ifade edilmektedir [13, 15]. Nitekim CA'nın kuvvetli bir inhibitörü olan asetazolamid'in (2-asetilamino-1, 3, 4-tiyazol-5-sülfonamid) fotosentez olayını inhibe etmesi bu ifadeyi doğrulamaktadır [14].

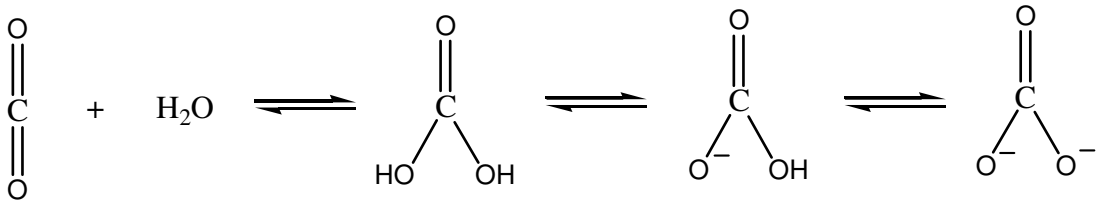
Karbonik anhidrazın bulunduğu canlı dokuların da bilinen veya muhtemel olan fizyolojik rolleri Maren ve Carter tarafından geniş bir şekilde anlatılmıştır [6, 8].

Son olarak, karbonik anhidrazın  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}_2\text{O}$  arasındaki dönüşümleri gerçekleştirmesi ile bir çok dokularda hayati öneme sahip olduğunu söylemek mümkün

## 2. 2. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri

Son on yıldan beri karbonik anhidraz, enzimatik katalizin prensiplerinin aydınlatılmasında, önemli bir rol oynamaktadır. CA, metabolizmasında, önemli bir rol oynamaktadır. CA, metabolizmada son derece önemli rol oynamasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kayıp olmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir [16].

Karbonik anhidraz,  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}_2\text{CO}_3$  veya ortamın pH'sına göre  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{CO}_3$  iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlem bir molekül olan  $\text{CO}_2$ 'in farklı açılara sahip piramidal yapıda  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 'e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır.



Karbonik anhidrazın bilinen on altı izoenziminden üçü olan CA I, CA II ve CA III kristallendirilmiş ve yapıları hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir. Üç izoenzim de sitoplazmada çözülmüş halde bulunur. Molekül ağırlıkları 28000 dalton olup, 259 veya 260

amino asitten ibaret tek bir polipeptid zincir halindedir. Her bir enzim molekülünün aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş  $Zn^{+}$  iyonu ihtiva etmektedir.  $Zn^{+}$  iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA'lar tam manasıyla aktiveden yoksundurlar [17 20].

İnsan eritrositlerinden elde edilen CA I ve CA II'nin amino dizilişlerinin tesbiti, bu konudaki çalışmaların başlangıcı olmuştur. Daha sonraki yıllarda sığır, at, şempaze ve rhesusu maymunlarına ait CA I'lerin ve yine sığır, at, koyun ve tavşan kaynaklı CA II'lerin amino asit dizilişleri tam olarak tayin edilmiştir.

Kas izoenzimi olarak da bilinen CA III'ün amino asit dizilişi ise insan için belirlendiği gibi sığır ve atlarda da araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda üç izoenzimin amino asit dizilişleri ve üç boyutlu yapıları yönünden büyük ölçüde benzerliğe sahip olduğu gösterilmiştir [21].

Karbonik anhidrazın sözü edilen üç izoenzimi, yapıları yönünden çok benzemesine rağmen, aktiviteleri çok farklıdır. CA II izoenzimi CA I'den 60 ile 100 kat daha fazla aktif olup, bilinen enzimler arasında katalitik aktivitesi (turnover sayısı) en yüksek olanıdır. CA III ise, en az aktif olan izoenzimdir ve  $CO_2$ -hidrataz aktivitesi CA I'in %5'i kadardır. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin memelilerdeki molekül ağırlıkları 28000, bitki kloroplastlarından elde edilen ve hegzamerik bir yapıya sahip olan CA'nın ise 180000 dalton olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra insan böbreğinde hücre zarına bağlı 66000 dalton molekül ağırlığında ve yine tavşan eritrositlerinde 54000 dalton molekül ağırlığında, karbonik anhidraz aktivitesine sahip proteinlere rastlanmıştır [22].

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin izoelektrik pH'ları türden türe farklılık göstermekte ve aktivitesi ile bir korelasyona rastlanmamaktadır [23]. Amino asit bileşimleri yönünden benzerlik gösteren memeli, bakteri ve balık CA'ları ise bunlara nispeten daha yüksek seviyede siseitin taşırlar [24].

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin,  $CO_2$ ,  $HCO_3^-$  ve  $H_2O$  arasındaki dönüşüm reaksiyonlarının katalizlemesinin yanı sıra, elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, bazı reaksiyonları da katalizlediği bilinmektedir. Bu reaksiyonlar, aldehit, piruvat ve alkil piruvatların hidratasyonu, ayrıca piruvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizini içeren dönüşümlerdir [7]. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile

organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir [25]. Ayrıca tavşan CA III izoenziminin ise hem asit hem de alkalin fosfataz etkisi olduğu bildirilmiştir [26].

### 2. 3. Karbonik Anhidraz I

CA-1 30 kDa molekül ağırlıklı düşük aktiviteli bir enzimdir. Kapiler endotelyum, korneal endotelyum, göz lensi, plasenta ve memeli fetal membranlarında bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. CA-1 geni insan genomik cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır.

Sitoplazmik CA-I'in insan beslenme sisteminde özofagus epitelyumunda, boş bağırsak, kıvrım bağırsak, kolon ve pankreatik Langerhan adacıklarının A-hücrelerinde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca epitel altı kapiler endotel hücrelerinde bulunmuştur.

### 2. 4. Karbonik Anhidraz II

Fizyolojik koşullarda  $1,3-1,9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$  turnover sayısına sahip CAII izoenzimi bilinen en verimli enzimlerden biridir. İnsan CA II geni, CA I ve CA III genleri gibi kromozom 8 üzerindedir. Hemen hemen tüm insan doku ve organlarında bulunan CA II karbonik anhidraz gen familyasında en fazla dağılmış izoenzimdir. İlk olarak CO<sub>2</sub>'nin hidratasyonunda yer aldığı eritrositlerde bulunmuştur.

CA II birçok sindirim sistemi organında bulunur. Paratoid ve Mandibula altı bezleri seröz acinar hücrelerinde bulunur ve bikarbonat iyonlarını salgı içerisinde serbest bıraktığı düşünülür. Özofagusun skuanöz (pullu) epitelinin CA II ihtiva ettiği görülmekte ve özofagusta endojen bikarbonat üretimine katıldığı düşünülmektedir. Mide'de mide özsuyunun asiditesini düzenlediği gastrik mukazanın çepere ait ve yüzey epitelyum hücrelerinde bulunur.

Duodonumun yüzey epitelyum hücreleri ve Bruner's bezleri de CA II içerir. Gastrik ve duodonal yüzey epitelyum hücreleri, epitelyumu örten ve sindirimden koruyan, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> içeren mukus jel tabakasını şekillendirmek için mukusu ve bikarbonat salgılar. İmmunohistokimyasal teknikler, boş bağırsak yüzey epitelyum hücrelerinin CA II ihtiva ettiği açığa vurmuştur, ayrıca NaCl reabsorpsiyonunun düzenlendiği memeli kolonunun non-goblet epitel hücrelerinde de bulunmuştur.

Karaciğer'de hepatositlerde ve safra kanallarının epitelyum hücrelerinde CA II bulunduğu ispatlanmıştır. Bilinen en önemli fizyolojik fonksiyonu safranın alkalizasyonu için HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> üretmektir. Ayrıca safra konsantrasyonunda asidifikasyonunda görev aldığı safra kesesinin epitelyum hücrelerinde de mevcuttur. Pankreas'ta CA II, hidrokarbonatın pankreas özsuyna salgılanmasındaki rolünün iyice yerleştiği epitelyum kanal hücrelerinde yer alır.

Karbonik anhidraz II eksikliği osteopetroz olarak bilinen büyüme bozukluğu, çiğneme sırasında dişlerin kapanması ve zihinsel gecikme ile birlikte böbrek tübüler asidosiz ve beyinsel kireçlenmeyi de içeren birincil bir kusurudur. Şimdiye kadar bu tehlikeli fakat nispeten az rastlanılan hastalıkla sonuçlanan beş mutasyon belirlenmiştir . CA II alimenter sistemde en bol bulunan izoenzim olmasına rağmen, CA II eksikliği olan hastalarda mide ve bağırsaklarla ilgili hiçbir septom belirtilmemiştir. Son zamanlarda sitomegalovirüs promotör ekspresyon kasetine konjuge edilmiş normal insan CA II cDNA'sının CA II eksikliği olan fareye enjekte edildiği ve gen transferinden sonra üç hafta süren fakat altı hafta sonunda kaybolan idrar asidikleştirme yeteneğinin geliştirilmesine sebep olan başarılı bir gen terapi deneyini belirtmiştir.

### **2. 5. Karbonik Anhidraz III**

CA III iskelet kası tipi I fiberlerinin sitoplazmasında bol miktardadır. Bunun yanında insan ve fare karaciğerinde bulunur. Molekül kütlesi 30 kDa'dır ve gen mimarisi CA II geni için tanımlanana çok benzerdir. CA III çok düşük CA aktivitesine sahiptir ve asetazolamid'e karşı nispeten daha dirençlidir. Ayrıca karboksil esteraz ve fosfataz aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir.

Karaciğerde CA III ekspresyonu androjenler tarafından düzenlenmektedir, ek olarak aşırı etanol tüketimi pervienöz hepatositlerde ekspresyona neden olmaktadır, CA- II'ün reaktif aldehit ürünlerinin eş zamanlı olarak indüklendiği yer olan hepasitleri oksidatif hasara karşı koruduğu önerilmektedir. İlginç olarak, CA III'ün oksitleyici çevrede fonksiyonlarını ve karaciğerde oksidatif olarak en fazla modifiye edilen protein olduğunu göstermiştir. Son yıllardaki bir çalışmada, CA III NIH3T3 hücrelerinde vardır. Ayrıca CA III cDNA'sıyla transfekte edilen hücrelerin kontrol hücrelerine nazaran poliferasyon (çoğaltma) denemelerinde daha hızlı büyüdüğü ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin sitotoksik konsantrasyonlarına karşı daha dirençli olduğu görülmüştür. Bu sonuç CA III'ün oksidatif hasardan korunmayı sağladığının önermektedir.

### **2. 6. Karbonik Anhidraz IV**

CA IV, tanımlanan ilk membrana bağlı izoenzimidir. 35 kDa'luk protein üreten insan böbrek CA IV enzimini kodlayan cDNA, COS-7 hücrelerinde eksprese edilmiş, klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır.

CA IV'ün insan ve fare gastrointestinal sisteminde ekspresyonu incelenmiştir. Gastrik epitelyumda hiçbir sinyal gözlenmemiştir. Oysa kolonik epitelyumun apikal plazma membranında güçlü blotlanma tespit edilmiştir. Küçük bağırsağın epitel çok zayıf bir pozitif reaksiyon gözlemlenmiştir. Gastrointestinal kanalın bütün segmentlerinde alt epitelyum kapiler

endotelium güçlü sinyal göstermiştir. Safra kesesi lüminal plazma membranı ve safra kanalı epitelyumu CA IV'e şiddetli bir immuno reaksiyon ifade etmiştir. Karaciğerde sadece biliyer epitelyum hücreler CA IV için pozitif sinyal göstermiştir. RT-PCR ve Northern blot analizleri negatif olduğu halde, sadece RT-PCR-Southern blot kombinasyonu bunu aydınlatmaya yeterli oldu. Bu bulgular bir önceki gözlemlerle açıklandı. CA IV sadece intrahepatik safra kanalı biliyer epitelyum hücrelerinde bulunmuştur ve hepatositlerde eksprese olmamıştır.

### **2. 7. Karbonik Anhidraz VA**

CA VA sadece mitokondriyal matrikse lokalizasyona sahip bir izoenzimdir. Varlığı insan ve kemirgenlerin karaciğer ve pankreasında bilinmektedir ve cDNA'sı insan karaciğer cDNA kütüphanesinden klonlanmış ve geni kromozom 16'ya haritalanmıştır. CA VA düşük CA aktivitesine sahiptir, fakat hepatositlerin mitokondrisinde üre devri ve glukoneogenez gibi iki önemli metabolik proseste görev aldığı düşünülmektedir. Üre siklüsünü ilk enzimi olan karbamoil fosfat sentaza ve pirüvat karboksilazın piruvatı okzalasetata dönüştürdüğü glukoneogenezin ilk basamağı için bir bikarbonat iyonu sağlar. CA inhibitörlerin ekvator domuzları ve fare karaciğerinde bu prosesleri yavaşlattığı gözlemlenmiştir. CA VA'nın pankreas langerhan adacıklarında eksprese olduğu gösterilmiştir. CA inhibitörü asetazolamid glukoz uyarımlı insülin salgılamasını inhibe etmiştir ve CA VA'nın insülin salgılanmasında önemli rol oynadığı konusunda öneri sunulmuştur.

### **2. 8. Karbonik Anhidraz VB**

Yeni bir mitokondriyal karbonik anhidraz izoformu olan CA VB, son zamanlarda klonlanmış ve kromozom X'e haritalanmıştır. Northern blot, CA VB'in mRNA'sının normal insan kalp ve iskelet kasında bulunduğunu açığa vurmuştur. Ayrıca pankreas, böbrek ve salgı bezlerinde hassas RT-PCR tekniğiyle pozitif sinyal belirlenmiştir, karaciğerde gözlenmemiştir. Deneysel yaklaşımlarla kanıtlanmasına rağmen mitokondriyal CA VA ve CA VB izoenzimlerinin farklı dağılımları, değişik fizyolojik roller oynadıklarını önermektedir.

### **2. 9. Karbonik Anhidraz VI**

CA VI'e ilk olarak memelilerde tükürük bezleri ve tükürükte rastlanmıştır. Biyokimyasal ve immunokimyasal özellikleriyle sitozolik izoenzimlerden önemli derecede farklılık gösterir, 34-36 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir. Polipeptid zinciri diğer birçok ekstraselüler proteinler gibi disülfit bağlarla stabilize olur. İmmunohistokimyasal çalışmalar CA VI'nın memeli kulak altı bezi ve mandibula altı bezlerinin seröz acinar ve demülin

hücrelerinde bulunduğunu göstermiştir. CA VI'nın başlangıçta tükrükte bikarbonat seviyelerinin sürekliliğinde uzmanlaşmış bir rol oynadığı düşünülmüyordu. İlginç olarak Kivela, bu enzimin tükrükte direkt olarak pH ve tamponlama kapasitesini düzenlemede görev almadığını fakat belki mine pelkülünde (dişi kaplayan ince protein tabakası) fonksiyonu olduğu, ihtimal olarak da karyojenik (çürütücü) bakteri tarafından üretilen asitin nötralizasyonunu katalizleyerek dişi çürümeye karşı koruduğu düşünülmüştür.

Daha önceki bir araştırma CA VI'nın yüksek konsantrasyonları günlük olarak tükrükle mideye yutulduğunu göstermiştir. CA VI'nın yüzey epitel hücrelerde eksprese olmamasına rağmen mide yüzey epitel hücrelerindeki mukus tabakası CA VI içerir. Bu da tükrük orjininde gastrik CA VI bulunmadığını gösterir. Tükrük CA VI, karbondioksit ve su üreten nötralizasyon reaksiyonunu hızlandırarak pH gradientinin sürekliliğine katkıda bulunabilir. Bu manzara gözlemler tarafından desteklenmiştir ki CA VI mutemelen gastrik lümende sert ortamda aktivitesini sürdürmektedir. Özafajit, gastrit veya duodenal ülseri olan hastaların normal insanlara nazaran düşük tükrük CA VI konsantrasyonlarına sahip oldukları belirlenmiştir.

Son yıllardaki bir çalışma, insan pankreasında CA VI mRNA'sının ekspresyonunu RT-PCR tekniğini kullanarak ispatlamıştır. Pozitif sonuçlar; eğer pankreasta ekspresyon olmuşsa, sekretuar CA VI'nın pankreas kanal sisteminde lümenal pH düzenlemede görev alabileceğini önermektedir.

## **2. 10. Karbonik Anhidraz VII**

İlk kez Montgomery tarafından aydınlatılmıştır, CA VII izoenzimlerinin CA I, CA II ve CA III gibi sitoplazmik bir enzim olduğu aydınlatılmıştır. Rekombinat CA VII, CA II'ye bağlandığında yaklaşık % 4 CA aktivitesine sahip olmuştur ve sülfonamidler tarafından inhibe edilmiştir. CA-VII'nin aminoasit sekansı, memelilerde en fazla korunan enzim olduğunu göstermiştir. İnsan tükrük bezlerinde, fare akciğerlerinde ve fare beyinde bu enzimin mRNA'sı belirlenmiştir.

## **2. 11. Karbonik Anhidraz VIII**

Son yıllarda yeni CA izoenzimlerini kodladığı düşünülen en az dört memeli geni sekans edilmiştir. CA bağlantılı genler insan ve fare genomik kütüphanelerinden izole edilmiş ve karbonik anhidraz türünden proteinleri (CA-RPs) keşfetmek ve isimlendirmek için numaralandırılmıştır, karbondioksit hidrasyon aktivitesi yoktur. mRNA'sının ekspresyonu fare beyinde tespit edilmiştir. CA VIII sekansı ayrıca PCR ile insan salgı bezleri, testis, plasenta ve akciğeri cDNA kütüphanelerinden tanımlanmıştır.



Yine yapılan çalışmalarda beyin, kalp, iskelet kası, böbrek, pankreas, serebellum ve koroid plekusta ekspresyonu gözlemlenmiştir.

## **2. 12. Karbonik Anhisraz IX**

CA IX ilk olarak tümöre bağlı yeni bir antijen olarak tanımlandı (MN), insan serviks kanser hücrelerinde ekspresyonu yapıldı. MN/CA IX geni 11 ekzon ve 10 introndan oluşur. MN proteinini kodlayan cDNA ilk defa Pastorek tarafından klonlandı, translasyon olan protein 459 aminoasit içerir ve 49,7 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Amino asit sekansı MN molekülünün bir n-terminal sinyal peptid, bir ekstraselüler bölge, bir transmembran çengel ve C-terminusta bir intraselüler kuyruk. Büyük ekstraselüler domain iki farklı kısımdan oluşur.

Fligonetik olarak MN/CA IX membrana bitişik (CA IV, XII, XIV) ve salgı (CA VI) izoenzimlerinin farklı bir koluna aittir. CA domaini insan CA VI'sıyla % 40,8 amino asit özdeşliği gösterir. Zavada immunoblotlama metodlarını kullanarak uterus serviks, yumurtalık ve endometriyum karsinomalarında MN proteinin ekspresyonunun tanımlandı. MN proteinine ait ilk immunohistokimyasal çalışmada % 90 dan fazla displastik ve kötü huylu servikal epitelyum örnekleri pozitif immunoreaksiyon verdiği halde normal servikal epitelyum ekspresyonu zayıf bir blotlama gösterdi. MN proteini servikal displastik örneklerde eksprese olduğu için servikal sitolojide umut verici bir biyomarker olarak düşünüldü. Bütün çalışmalar MN proteinin servikal neoplazi'de potansiyel bir biyomarker olduğu ve displastik ve kötü huylu hücreleri aydınlatmada kullanılabileceği sonucuna yönlendirildi.

## **2. 13. Karbonik Anhidraz X**

Katalitik izoenzim CA X kısmi cDNA sekansı bir cDNA kütüphanesinde bulunmuştur. Beyin, böbrek, serebellum, amigdala, serebral korteks, hipokampus, talamus, spinal kort, yumurtalık ve hipofiz bezinde bulunduğu belirlenmiştir.

## **2. 14. Karbonik Anhidraz XI**

İlk olarak 36 kDa molekül ağırlıklı CA-RP XI'i koyun beyin cDNA kütüphanesinde açıklanmıştır. Protein güçlü bir sinyal sekansa, çeşitli potansiyel fosforilasyon bölgeleri ve bağlama motiflerine sahiptir ve sinyal uyumunda rol oynadığı önerilmektedir. İnsan cDNA sekansı 328 amino asitlik ve aktif CA izoenzimleriyle % 42-53 benzerlik gösteren polipeptidi kodlar ve Northern Blot analizleriyle beyinde kuvvetli bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde mRNA'sının ekspresyonu RT-PCR ile normal insan pankreası,

böbrek, karaciğer, tükrük bezi ve spinal kort'da gözlenmiştir. İlginç olarak normal pankreasa göre pankreatik kanser hücresinde daha güçlü sinyal görülmüştür.

## 2. 15. Karbonik Anhidraz XII

Türeci yeni bir membrana bağlı izoenzim olan CA XII'nin renal hücre karsinomasında klonlanarak karakterize edildiğini açıklamıştır. cDNA sekansı 354 amino asitlik 39 kDA'luk ve tipik bir membran proteini özellikleri gösteren bir polipeptid zinciri ihtiva eder. Sekans 29 amino asitlik sinyal sekansı, 261 amino asitlik CA domaini, ek olarak kısa bir ekstraselüler segment, 26 amino asitlik hidrofobik transmembran domain ve iki fosforilasyon bölgesi ihtiva eden 29 amino asitlik bir hidrofilik C-terminal stoplazmik kuyruk içerir. Ekstraselüler CA domaini bilinen CA'larla % 30-42 homoloji gösterir, Zn bağlayıcı aktif CA'larda bulunan üç histidin rezidüsü ve glikozilasyon için iki potansiyel bölge ihtiva eder. A 549 (akciğer adenokarsinoma) hücreleri bol ekspresyon gösterdiği halde beyin ve akciğer dokularında düşük ekspresyon bulunmuştur. Türeci renal hücre kanseri (RCC) olan hastaların % 10'u tümörlü dokularının etrafındaki normal böbrek dokularına nazaran yüksek CA XII ekspresyonu gösterdiği belirtmiştir.

Son zamanlardaki bir çalışmada Kivela duedonum, boş bağırsak ve kıvrım bağırsak'ta negatif olduğu halde, kolon ve rektum yüzey epitelyum hücrelerinin basolateral plazma membranlarında şiddetli CA XII immunoreaksiyonu gözlemlemiştir. Asidik çevre kötü huylu hücrelerin yayılım potansiyelini artırdığından, Ivanov MN/CA IX ve CA XII'nin kanser hücrelerinin etrafındaki alanı asidleştirerek tümör büyümesine ve yayılmasına katkıda bulunabileceğini önermişlerdir. Hamli RT-PCR metoduyla fare sıçan beyinde CA XII mRNA'sını tespit ettiler. Sıçan CA XII'sinin klonlanması fare CA XII'si ile %94 homoloji gösterdiğini açığa vurmuştur. CA XII'nin dış granül hücrelerinde, kortekste ve koroid pleksusta eksprese olduğu görülmüştür. Kainik asit muamelesi CA XII ekspresyonunun kortikal tabaka boyunca uyarıştırır. Bu membrana bitik enzimin koroid pleksusta yüksek ekspresyonu, analog bir rolünün olduğunu önermiştir.

## 2. 16. Karbonik Anhidraz XIII

CA XIII tükrük bezleri, böbrek, ince bağırsak, kolon, uterus ve testisi içeren çeşitli dokularda eksprese olmuş yeni bir enzimdir. CA XIII proteinini modelleme çalışmaları globüler bir molekül olduğunu ve CA I, II ve III sitozolik enzimleriyle yüksek derecede (% 60) özdeşlik gösterdiğini açığa vurmuştur. Bu yüzden CA XIII sitozolik/intraselüler bir izoform olarak kümelenmiştir. Yapılan gen ekspresyon çalışmalarında insan dokularında; timus, ince bağırsak,

dalak, prostat, yumurtalık, kolon ve testiste; farede: dalak, akciğer, böbrek, kalp, beyin, iskelet kası ve testilerden pozitif sinyal elde edilmiştir.

### **2. 17. Karbonik Anhidraz XIV**

İlk olarak fare böbreğinde; en çok eksprese olduğu proksimal çapraşık tübüllerde tanımlanmıştır. Bir tane amino terminal sinyal sekansı, diğer ekstraselüler CA'larla büyük oranda homoloji gösteren bir CA domaini, bir transmembran domain ve kısa bir intraselüler C-terminal kuyruktan oluşur. Fare dokularındaki blot analizleri CA XIV mRNA ekspresyonunun en bol böbrek ve kalpte, daha sonra iskelet kası, beyin ve karaciğerde olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda CA XIV genini kromozom 1q21'e haritalayan Fujikawa-Adachi tarafından insan CA XIV'ü kodlayan bir cDNA açıklanmıştır. cDNA 337 amino asitlik 37,6 kDa molekül ağırlığında bir polipeptidi kodlamaktadır. Amino asit sekansı diğer aktif CA'larla %29-46 benzerlik göstermektedir. Blot metodu insan kalbinde, karaciğerinde, beyin ve iskelet kasında mRNA ekspresyonu gösterdiği halde RT-PCR analizleri normal insan karaciğeri ve spinal kort'da şiddetli sinyal belirlemiştir. Sadece RNA Dot Blot analizleri ince bağırsak, kolon, böbrek ve mesane'de zayıf sinyaller göstermiştir.

### **2. 18. Karbonik Anhidraz XV**

CA aktivitesi için gerekli olan amino asit rezidüsünün mevcut olduğu CA XV'i kodlayan genomik sekansa sahip 8 tür tespit edilmiştir. RT-PCR çalışmaları insanlarda CA-XV'in eksprese olmadığını onaylamıştır. Aksine RT-PCR ve in situ hibridizasyon çalışmaları farede yapılmış ve böbrek, beyin ve testiste pozitif sinyal elde edilmiştir. CA XV'in yapısının CA XIV ile çok benzer olduğu filogenetik çalışmalarla belirlenmiştir. Her iki enzimde COS-7 hücrelerinde eksprese olmuştur ve paralel deneylerde çalışılmıştır. Sonuçlar CA XV'in CA XIV ile çeşitli özellikleri paylaştığını göstermiştir. CA XV'in katalitik aktivitesi düşüktür. Sonuçlar CA XV'in  $\alpha$ -Ca gen familyasının bir üyesi olduğunu önermiştir.

Pukerson and Schwartz tavşan dokularında CA IV, IX, XII ve XIV izoenzimlerinin ekspresyonu incelenmiştir. Sonuçlar: CA IV mRNA'sı başlıca böbrek, kalp, akciğer, kolon ve safra kesesinde, CA IX mRNA'sı mide, safra kesesi, duodenum ve boşbağırsakta, CA XII mRNA'sı böbrek ve kolonda, CA XIV mRNA'sı kalp, akciğer, iskelet kası ve karaciğerde tespit edilmiştir.

Datalar değişik dokularda değişik CA ekspresyon modelleri olduğunu göstermiştir. CA IX proksimal gastrointestinal sistemde, CA IV ve CA XII önemli böbrek izoformlarıdır. CA

XIV karaciğer, kalp, akciğer ve iskelet kası gibi metabolik olarak aktif dokularda bol miktarda eksprese olmuştur. İzofomların ekspresyonunda türlere ait bazı önemli farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin; CA XIV fare böbreğinde bol miktarda bulunmasına rağmen tavşan böbreğinde eksprese olmuştur. İzofomların ekspresyonunda türlere ait bazı önemli farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin; CA XIV fare böbreğinde bol miktarda bulunmasına rağmen tavşan böbreğinde eksprese olmamıştır. Maturasyon çalışmaları sonucunda; CA IX mRNA ve proteininin ekspresyonu, sütten kesme ile önemli oranda arttığı ve gastrik H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaz'ın α alt ünitesinin maturasyon ekspresyonu ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Bu da CA IX ve gastrik H<sup>+</sup> pompasının fonksiyonlarının yetişkin gıda maddelerinin sindiriminde bağlantılı olduğunu önermiştir.

Karbonik anhidrazın değişik izoenzimleri farklı bir şekilde dokulara dağılmıştır. Bazı izoenzimler aynı dokularda birlikte bulunduğu gibi (eritrosit CA I ve CA II), diğer bazı dokularda tek bir izoenzim bulunmaktadır (membrana bağlı CA IV gibi). Eritrositlerde bol miktarda bulunan CA I izoenzimi yanında, CA II değişik dokularda H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> salgılamaktadır. Ayrıca böbrek kortekslerinden izole edilen CA II ile eritrosit CA II'nin bütün özelliklerinin tamamen aynı olduğu bulunmuştur. Diğer dokularda ise CA II izoenzimi eser miktarda bulunmaktadır. Membrana bağlı bir izoenzim olan CA IV ise insan böbreği ve akciğerlerinden izole edilmiştir. Epitelyum hücrelerinde CA IV, CA II ile birlikte bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar, CA IV erişkin kişilerin dokularının büyük bir bölümünde ve bazı fetal dokularda bulunduğu tespit edilmiştir.

## 2. 19. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Fizyolojik Fonksiyonları

Genel olarak insandaki CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucunda izoenzimler ortaya çıkarılmıştır. Eritrositlerde CA I izoenzimi yanında CA II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonu ise, doku kılcal damarlarında, metabolizma ürünü olan CO<sub>2</sub>'i H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'e, akciğer pulmoner kapillerde ise H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'i CO<sub>2</sub>'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır. HCA I eksikliği sendromu belirlenmiş olmasına rağmen herhangi bir klinik semptomla ilişkisi bulunamamıştır [27 29].

CA II izoenzimi karbonik anhidrazın üzerinde en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 25 °C'de 10<sup>6</sup> s<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. CA II'nin doku dağılımı geniştir ve pek çok farklı organ ve hücre tipinde bulunur. Osteoporoz, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyonla ilişkili olması bu izoenzimin kemikte, böbrekte ve beyindeki önemini gösterir [30].

HCA II ve HCA IV izoenzimleri, göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda bulunmaktadır. Glokom hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucunda gözdeki HCA II izoenziminin önemi anlaşılmıştır.

Glokom hastalığı, yüksek göz içi basıncından ileri gelmekte (intraocular pressure, IOP) ve dönüşümsüz körlüğe neden olmaktadır. IOP'nin tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (humor aköz). Karbonik anhidraz enziminin humor aközün salgılanmasında uyarıcı etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu ile silyer epitelinin salgı aktivitesi %25–30 oranında azalmaktadır [31].

CA III'ün turnover sayısı  $8.10^3 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Düşük aktiviteli bir enzimdir. Diğer CA izoenzimlerine göre, sülfonamidlerin inhibisyonuna daha az hassastır. Başlıca çözünür protein olduğu ve CO<sub>2</sub>'in doku kılcal damarlarına difüzyonunu kolaylaştırmada rol oynadığı sanılmaktadır. Yavaş kasılan kırmızı kas liflerinde en çok bulunur. Ayrıca, yağ hücrelerinde de bu izoenzimin konsantrasyonu yüksektir. CA I ve CA II gibi CA III'te p-nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Öte yandan, CA III'ün fosfataz aktivitesi gösterildiğı bildirilmiştir [32].

HCA IV ve HCA VI izoenzimleri sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasını sağlarlar. HCA IV membrana bağlıdır. Akciğerdeki ve bazı diğer organlardaki kılcal damarların endotel hücrelerinin plazma yüzeyinde ve ayrıca böbrek membranına bağlı bulunduğu gibi bazı epitel hücrelerinin membranına bağlı olarak bulunur [33].

HCA V, belirli dokuların mitokondrilerinin matrikslerinde bulunur. CA V'in sırasıyla karbamoil fosfat sentetaz-I'e ve piruvat karboksilaz enzimlerine bikarbonat iyonu sağlayarak ürogenez ve glukoneogenez de rol oynadığı ileri sürülmektedir. CA V'in lipogenez olayında da rol oynaması mümkündür [34].

HCA VI izoenzimi tükürük bezlerinden salgılanan bir enzimdir ve insan tükürüğünden yalıtılmış olup, tükürüğün pH düzenlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir. HCA VII izoenzimi ise tükürükteki bikarbonatın salgılanmasında rol oynayabilir [35].

Çinko iyonları ise alt üniteler arasında bulunur ve bir alt üniteden His-81 ve His-122'ye ve bitişik bir alt birimden His-117 ile ligand oluşturmuştur. Varsayılan bir su molekülü bükülmeyi sağlayarak, tetrahedral yapının oluşumunu tamamlar. *M. thermophila* CA'sındaki ve insan CA II'deki metal merkezli bu pozisyon önemli benzerlikler gösterir ve bu durumda katalitik fonksiyonların yakın olması da çinko bağlı bölgelerin benzer olduğuna işaret etmektedir [35].

## 2. 20. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları;

CA varlığı bakımından incelenen tüm hayvanlarda ve fotosentez yapan organizmalarda ve aynı zamanda fotosentetik olmayan bakterilerde bulunan yaygın bir enzimdir.  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ -CA olarak adlandırılan, evrimsel açıdan ilgisiz üç CA ailesinin varlığı, şaşırtıcı yeni buluşlardan biridir [36]. Farklı CA ailelerinin temsilcileri arasında kayda değer sekans homolojileri bulunmaz; ancak, hepsi çinko enzimleridir.

Dolayısıyla, bu CA aileleri, katalitik işlevin yakınsak evrimi için güzel örnekler olarak görünmektedir.

### 2. 20. 1 $\alpha$ -Karbonik anhidrazlar

İnsan CA I ve CA II'nin kristal yapısında, sığır CA III'ün ve ekspresyonu E.coli'de yapılan sıçan CA V'in kesik bir formunun kristal yapıları belirlenmiştir. Hint mandasına ait CA II için de bir yapı mevcuttur. Bu izozim formlarının genel yapıları çok benzerdir. Moleküller neredeyse küresel, yaklaşık boyutları ise  $5 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$ 'tür. Molekülün kalan kısmına gevşek şekilde bağlı olan amino terminal bölge haricinde (yaklaşık 24 aminoasit), bu  $\alpha$ -CA'lar tek etki alanlı proteinler olarak düşünülebilir [37].

Aktivite bölgesi, neredeyse molekülün merkezine uzanan büyük, koni biçimli bir oyukta bulunur. Çinko iyonu bu oyukun tabanına yakındır. Dördüncü ligandın  $\text{H}_2\text{O}$  veya  $\text{OH}^-$  olduğu tetrahedral geometrideki His-94, His-96 ve His-119'dan üç azot atomuna bağlıdır. Ligandlar proteindeki diğer gruplara hidrojen bağlarıyla tutunmuş ve bir "dolaylı ligand" kabuğu oluşturmuştur (şekil 2.1) [37].

Metal iyon ligandları ve dolaylı ligandların  $\alpha$ -CA amino asit dizilişleri sabittir. Doğrudan ve dolaylı çinko ligandlarına ek olarak, sıralı bütün  $\alpha$ -CA'larda 17 aminoasit rezidüsü kesin şekilde korunur. Bu rezidülerden bazıları katalitik aktivite açısından önem taşıırken, diğerleri protein yapısının kararlılığında rol oynar. Esasen bilinen, bütün  $\alpha$ -CA ailesi ve  $\alpha$ -CA ile ilişkili proteinler içinde, sadece 10 aminoasit rezidüsü tamamen sabittir.

Bu rezidülerden bazılarının insan CA II'nin kararlılığı açısından önemi, bölgeye özel mutajenez ile test edilmiştir.

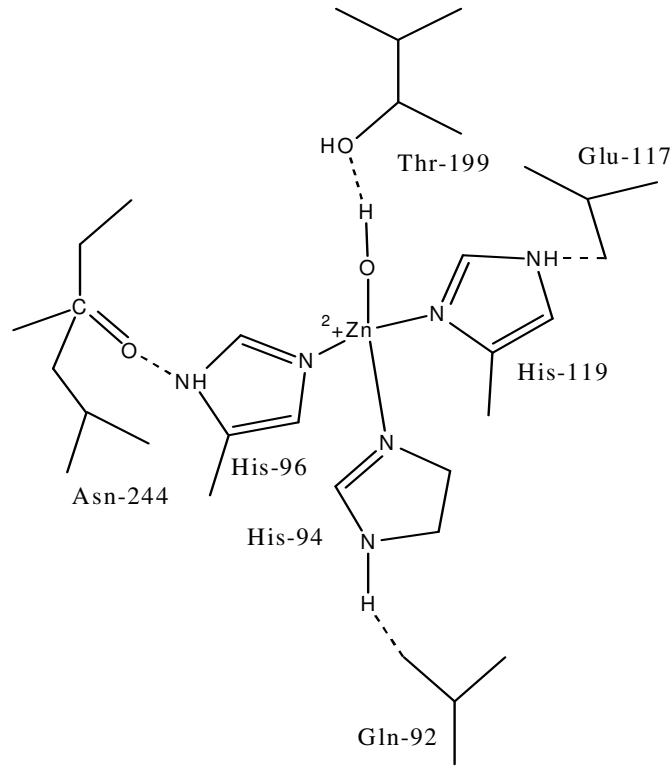
### 2. 20. 2 $\beta$ -Karbonik anhidrazlar

Henüz hiçbir  $\beta$ -CA yapısı belirlenmemiştir. Doğal ve mutant bezelye kloroplast CA'sı çapraz bağ çalışmaları, enzimin belirlenen bir alt birimin oktamer yapısında olduğunu kuvvetle

savunur. X-ray absorpsiyon spektroskopisinden ve mutasyonlardan elde edilen kanıt, ispanak enzimindeki çinko iyonunun  $\alpha$ -CA'ların aksine Cys-His-Cys-H<sub>2</sub>O grubuyla koordine olmuş olduğunu ortaya koyar [38].

### 2. 20. 3 $\gamma$ -Karbonik anhidrazlar

Son araştırmalarda *M. thermophila*'dan elde edilen bir yapı olarak  $\gamma$ -CA'nın yapısı ortaya konmuştur. Bu trimetrik moleköl  $\alpha$ -CA'lardan tamamen farklı katlanmalara sahip olup ve bu bölge kalıtsal bölgeyi vurgulamaktadır. Her bir ünite, her dönüş başına üç kısa iplikçik bulunan sol el  $\beta$ -heliks yapısının yedi dönüşü ile olmaktadır.



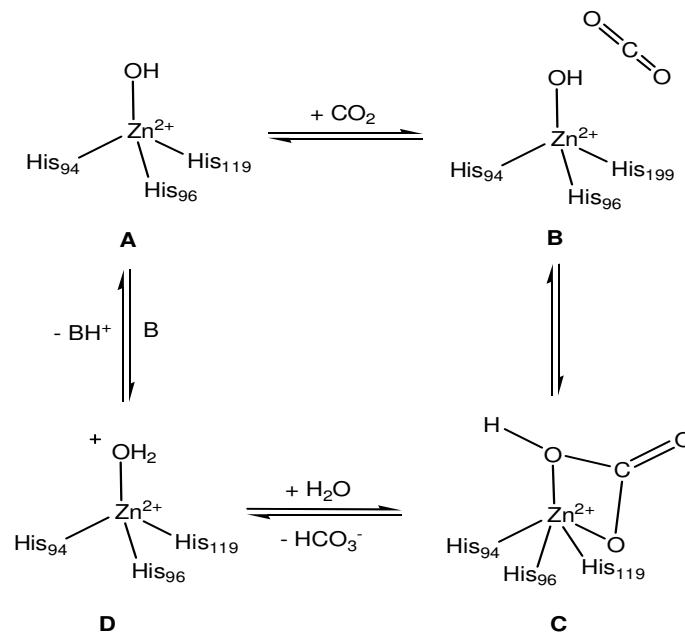
**Şekil 2. 1.** İnsan CA II'deki metal merkezin “doğrudan” ve “dolaylı” ligandları gösteren şematik görünümü.

## 2. 21. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması;

Son 60 yıldır yapılan çalışmaların neticesinde aydınlatılmaya çalışılmıştır. Buna göre CA enzimi, metabolizma için son derece önemli olmasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir [16].

Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesindeki Zn (II) iyonunun reaksiyonların katalizi için büyük önemi vardır. X-ray kristalografisi çalışmaları metal iyonun, aktif bölümün 15 Å<sup>0</sup> derinliğindeki tabanında yerleştiğini göstermiştir. 3 histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) ve su molekülü/ hidroksit iyonu tarafından koordine edilmektedir. Çinko bağlı su, Thr-199'un hidroksil grubu ile hidrojen bağı ile bağlıdır. Bu Glu-106'nın karboksilat grubu ile köprü halindedir. Bu bağlantılar çinko bağlı molekülün nükleofilisini artırır ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO<sub>2</sub>'e doğru hareket etmektedir [27].

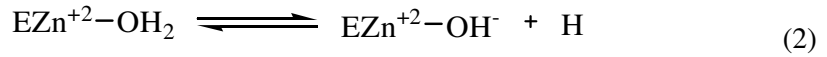
Enzimin aktif formu; hidroksitin çinkoya bağlı olduğu temel formdur. Bu güçlü nükleofil, CO<sub>2</sub> molekülü ile etkileşir. Bu da bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Bu bikarbonat iyonu daha sonra su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Böylece Zn<sup>+2</sup> iyonuna su molekülü bağlanır. Bu da enzimin asit formuna yol açar. Katalitik olarak bu form inaktiftir. Tekrar temel A formunu oluşturmak için aktif bölgeden çevresine proton transferi olur [39].



**Şekil 2. 2** Karbonik anhidrazın katalizlediği CO<sub>2</sub>-hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi.



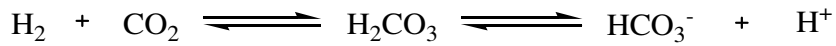
İşlem şematik olarak şöyle gösterilebilir:



Katalizdek hızı sınırlayan basamak ikinci reaksiyondur. CA II, CA IV, CA V, CA VII ve CA IX gibi katalitik olarak çok aktif olan izoenzimlerde, bu işlem aktif bölgede yerleşmiş histidin (His-64) rezidüsü yardımıyla çok etkili bir proton transfer işlemi gerçekleştirilir [40].

## 2. 22. Karbonik Anhidraz Aktivitesi;

Enzimin CO<sub>2</sub>'i hidratasyonu bikarbonatın dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir.



Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, ortama göre CO<sub>2</sub> gazı çıkmakta veya harcanmaktadır. Aynı zamanda H<sup>+</sup> konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya azalan CO<sub>2</sub> gazı, kantitatif olarak manometrik metodun reaksiyon pH'sının değişken olması, CO<sub>2</sub>'in suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır [41].

İkinci olarak, ortamdaki H<sup>+</sup> konsantrasyonu; pH'nın yükselmesi veya düşmesi için geçen süre potansiyometrik yolla inhibitörle belirlenebilir. Fakat bu metodun kısa zaman alması gibi bir avantajının yanı sıra, reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması CO<sub>2</sub>'in suda çözünmesi ve kullanılan indikatörünün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da vardır. Bu dezavantajları en az düzeye indirmek için sabit pH'da titrasyon veya 0,02-0,05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda, spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu gibi metotlar aktivite tayininde kullanılmaktadır [41, 42].

Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; CO<sub>2</sub> hidratasyonunda pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulunmaktadır. Enzim birimi ise, enzimsiz CO<sub>2</sub>-hidratasyon süre (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süresi (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın, t<sub>c</sub>'ye bölünmesi ile belirlenmektedir. Buna göre enzim ünitesi, enzimsiz reaksiyon süresini yarıya düşüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır [42].

Enzimin esteraz aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir [42, 43].

## 2. 23. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri iki sınıfta incelenmektedir. Bunlardan birincisi metallere kompleks yapmış anyonlardır. Diğer grup ise, ya proteinsiz çinko ligandı tarafından süstitüe edilmesiyle enzimin Zn (II) iyonuna bağlayan veya genellikle trigonal-bipramidal yapıda olan metal koordinasyon halkasına katılan inhibitörlerdir. Sülfonamidlerin, CA I izoenziminin Zn (II) iyonunun tetrahedral yapısına bağlanması çok önemlidir.

İnorganik anyon ve katyonlar bir de organik inhibitörler olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Çoğu tek değerli anyon CA enzimini inhibe eder. Fakat bu iyonların konsantrasyonları birkaç mikromolar seviyesinde inhibisyon gösteren CN<sup>-</sup> iyonu ve 1 M'lik iyon konsantrasyonunda inhibisyon gösteren F<sup>-</sup> iyonunda olduğu gibi büyük değişiklik gösterir [44].

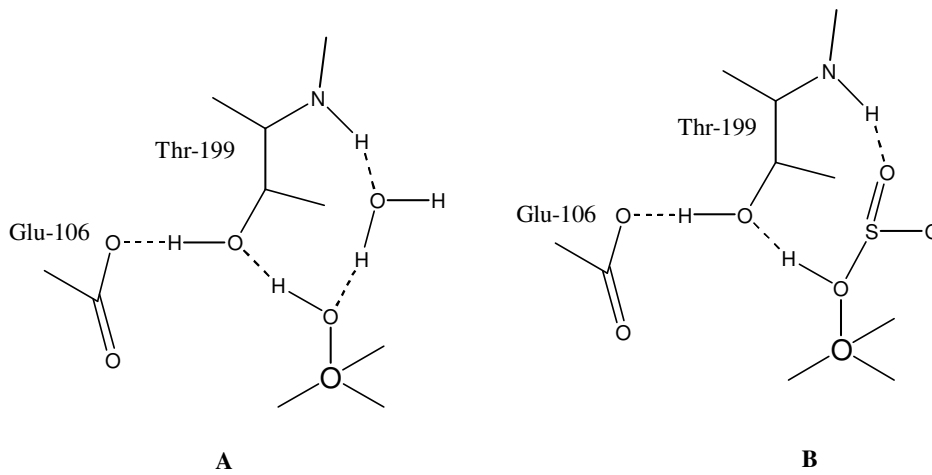
İnhibisyonun pH bağımlılığına ve Co<sup>+2</sup>'nin yer değiştirdiği enzimin optik spektrum üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar, anyonik inhibitörlerin metal iyonuna bağlandığı ve katalitik CO<sub>2</sub> hidrasyonunda önemli bir rolü olan OH<sup>-</sup> iyonunun oluşumunu önlediği sonucuna varılmıştır. Co<sup>+2</sup> ile ilgili spektrumlar bazı anyonların sadece çinko bağlı çözücü molekülü yerinden ederek tetrahedral koordinasyonu sağladığını, diğer anyonlarınsa pentahedral koordinasyon yapısı oluşturduğunu ileri sürmektedir [44].

İnsan CA-II'sı üzerinde yapılan son kristalografik çalışmalar, anyonik inhibitörlerin çeşitli bağ biçimlerine yeni bir ışık tutmuştur. Aktif bölgenin önemli bir özelliği çinkoya bağlı H<sub>2</sub>O veya OH<sup>-</sup> iyonu içeren Glu-106 ve Thr-199 bulunduran indirekt liganddaki bir H bağlanma sistemidir. Glu-106 büyük olasılıkla iyonlaşmıştır ve bu nedenle, hidrojen bağlı Thr-199 ile bir alıcı görevi görmelidir. Sonuç olarak, Thr-199'un hidroksil grubunun, metal bağlı çözücüyle bağlanmasında bir H atomu alıcısı olduğu kabul edilmelidir. Ayrıca, çinkoya bağlı

$H_2O$  veya  $OH^-$ , hidrofobik bir cepte bulunan bir başka su molekülü ile bir hidrojen bağı oluşturur. Hidrojen, Thr-199'un peptit NH'na bağlanır. Bu hidrojen bağı etkileşimlerinin, inhibitörlerin bağı üzerinde belirleyici etkisi olduğunu göstermektedir [45].

Protonlanmış bir ligand atomuna sahip olan inhibitörler, tetrahedral koordinasyon geometrisini bozmaksızın metale bağlı çözücü molekülün yerini alırlar ve Thr-199'un  $OH^-$  grubu ile hidrojen bağı kururlar.  $HSO_3^-$  ve  $HS^-$  iyonları buna örnek olarak verilebilir.

$HSO_3^-$  iyonu derinde olan su molekülü ile yer değiştirirken bir oksijen atomu Thr-199'un NH gurubu ile hidrojen bağı oluşturur. Üçüncü oksijen atomu 0,31 nm mesafeden çinkoya doğru yönelir [46].



**Şekil 2. 3** İnsan CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri.

(Hidrojen bağları ve tek ligandan metale bağ, kesik çizgilerle gösterilmiştir. Elektrik yükleri atılmıştır.)

A: İnhibe olmayan enzim      B: Bisülfür

$SO_4^{2-}$  gibi iki değerli anyonlar, CA'yı inhibe etmez veya çok zayıf inhibitörler gibi hareket ederler [47]. Esasen, pH=6,0'da 2,4 M  $(NH_4)_2 SO_4$ 'ın varlığında bile, insan CA-II izoenziminin kristal yapısında sülfat iyonunun bağlandığına dair hiçbir kanıt yoktur. Negatif yüklü iyon Glu-106'nın bağlanmasını önlemektedir [48].

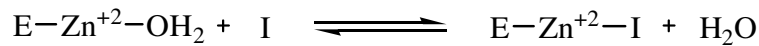
Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.



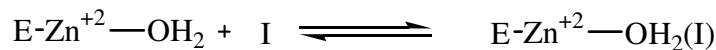
Sülfonamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfonamid ligand olarakta kullanılmaktadır [49, 50].

Sülfonamidler, süstitüe olmamış bir  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubu veya bir  $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{OH})$  grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun azot atomu aracılığıyla ilk olarak; enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde, ( $\text{R-SO}_2\text{NH}^-$  veya  $\text{R-SO}_2\text{N-OH}^-$ ) iyonik olarak bağlanırlar. İkinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması; bu iki etkinin toplamının bir sonucudur [51, 52].

Nitekim süstitüe yada alkil sülfonamidlerin enzime bağlanmasında; yalnızca hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heteroaromatik yan grup taşıyanlara göre daha zayıf inhibitörlerdir. İnorganik anyonlar ise; yalnızca hidrofobik bağlanmadan dolayı, CA için sülfonamidler kadar güçlü inhibitörler değildir [27].

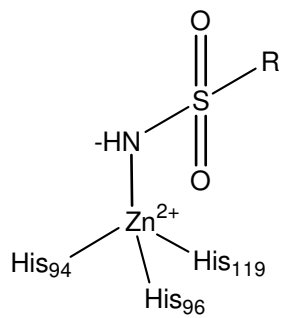


Tetrahedral yapı (süstitüsyon)



Trigonal-bipiramidal yapı (katılma)

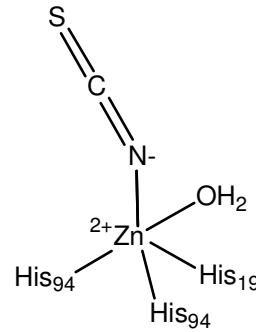
Zn (II) iyonuna koordine olmuş sülfonamid bileşiğinin N atomuyla, protonu ayrılmış Zn (II) iyonunun bir tetrahedral yapıda bağlanması sülfonamidler için çok önemlidir (Şekil 2.4. A) [40]. Anyonlar ise hem metal iyonunun tetrahedral geometresinde, hem de tiyosiyonat örneğinde görüldüğü gibi trigonal-bipiramidal yapıda bağlanabilirler.



Tetrahedral yapı

(sülfonamid)

**A**



Trigonal-bipiramidal yapı

(tiyosiyonat)

**B**

**Şekil 2. 4** Anyonik inhibitörler ve Sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyon mekanizması

## 2. 24. Glokom Tedavisinde Kullanılan Sülfonamidler

2002 yılına kadar dünyada glokom hastası sayısı yetmiş milyona ulaşmıştır. Glokom, çok sayıda hastalığı içine alan bir terimdir. Bununla birlikte açık halka glokom hastalığı, şimdiye kadar en yaygın hastalık türü olarak bilinmektedir.

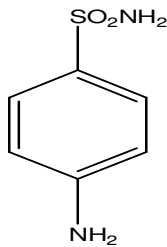
Göz hastalıkları içinde körlüğe en fazla glokom neden olur (% 15-20) [52]. ABD 'de körlerin % 10-11 bu hastalıktan dolayı gözlerini kaybetmişlerdir [53]. Yine aynı ülkede beyazlarda en fazla körlük nedeni olan üçüncü hastalık olarak belirtilmiştir[53, 54].

Glokom hastalığı, yüksek göz içi basıncıyla (intro ocular pressura, IOP) ortaya çıkarak, dönüşümsüz körlüğe sebep olmaktadır. Hastalığın en belirgin risk faktörü göz içi basıncının yükselmesidir. Diğer risk faktörleri miyopi, diabetes, yetersiz kan dolaşımı, yaş, yüksek göz tansiyonu, sistemik hipertansiyon ve kalıtım yolu ile aktarılması sıralanabilir. Fakat göz içi basıncı 22 mm Hg'dan daha düşük (yani normal) hastaların % 20'sinde de glokom hastalığı

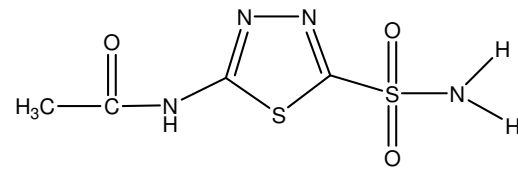
rastlanmaktadır. Glokom'u en iyi tanımlayanlar, görme belgesi ile ilgili baştaki sınırları karakterize eden optik nöropati uzmanlarıdır.

Göz içi basıncının kontrolünde çok önemli rolü olan karbonik anhidrazın inhibisyon yolu ile glokomlu hastaların göz içi basıncı düşürülmektedir. Karbonik anhidrazın güçlü inhibitörleri olan sülfonamidleri (I) 1940 yılında Mann ve Keilin sentezlemiştir.

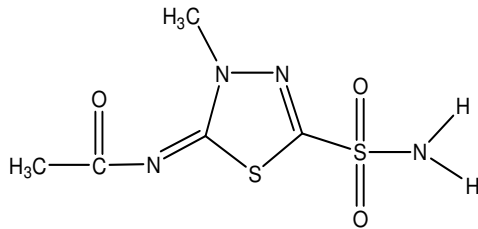
Glokom tedavisinde uzun zamandan beri 4 çeşit sistemik bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşikler asetozolamid (II), metazolamid (III), etokzolamid (IV) ve diklorfenamid (V) bileşiklerdir [56, 57].



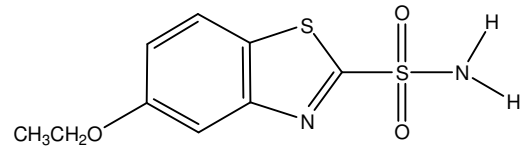
(I)



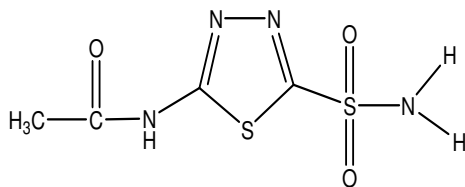
(II)



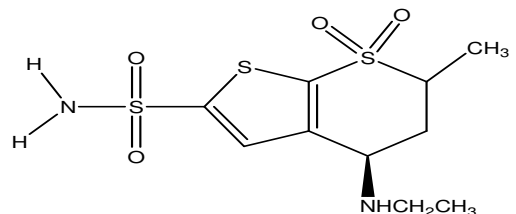
(III)



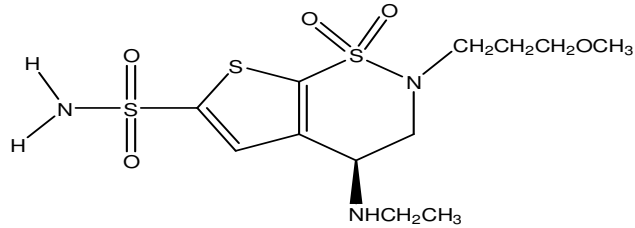
(IV)



(V)



(VI)



(VII)

**Şekil 3. 1.** Glukom tedavisinde kullanılan bileşiklerin şekilleri

Sistemik inhibitörler, yükselen göz içi basıncını (IOP) düşürmekte kullanılır. Bu inhibitörler, silyer epitel enzimlerini ( CA II ve CA IV) inhibe etmesiyle, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> oranında bir azalma sağlar. Bu yüzden humor aköz salgılanmasında % 25-30 azalma sağlandığından, bu inhibitörler glukom hastalığı tedavisinde kullanılırlar. Fakat bu inhibisyon, gözden daha çok diğer dokulardaki CA enzimlerini etkilediğinden, oldukça büyük yan etkilere sahip olmaktadır [56, 57].

(II) ve (V) bileşikleri; mide, akciğer, böbrekler ve kandaki CA izoenzimlerini ( CA I, CA II, CA IV, CA V ve CA VI ), gözdeki CA izoenzimlerinden daha çok inhibe etmektedir. Bu da (II) ve (IV) bileşiklerinin topikal olarak göze uygulanması gerektiğini ortaya koymaktadır. Fakat (II) ve (V) bileşikleri gibi klinikte kullanılan ilaçların hiçbiri, suda çözünürlük problemlerinden dolayı etkili konsantrasyonları sağlamadığından henüz damla haline getirilmemiş ve ağızdan alınmaktadır.

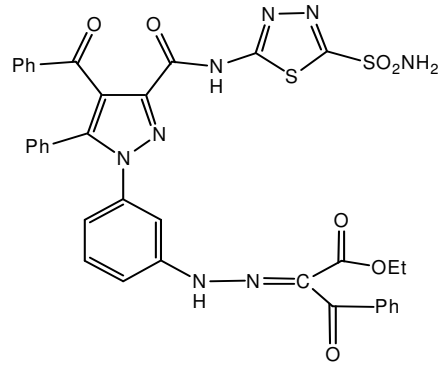
Yüksek IOP'yi düşürürken, CA izoenzimlerinin inhibe olmaması için, göze lokal uygulanabilecek ilaçlara ihtiyaç duyulmuştur [57]. Bu sebepten dolayı ilk kez ilaç olarak kullanılmak üzere dorzolamid (VI) bileşiği sentezlenmiş ve 1995'te kliniklerde kullanılmıştır [58]. İkinci olarak da, yapı olarak dorzolamide benzeyen brinzolamid (VII) bileşiği sentezlenmiş ve 1999'da kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır. Böylece glukom tedavisi için kullanılan 4-7 arası sistemik ilaçların arasına bu iki ilaç da katılmıştır. Bu iki ilaç (VI) ve (VII), daha önceden ilaç olarak kullanılan bileşiklerle karşılaştırıldığında; daha az yan etkisi olmakla birlikte, lokal olarak uygulanması sebebiyle gözde yalnızca istenilen CA izoenzimlerini inhibe etmektedir.

Son yıllardaki çalışmalarda ise (VI) ve (VII) bileşiklerinin de; göz yanmaları, tahriş, yara çalışması ve dönüşümsüz tümör oluşumlarına sebep oldukları bulunmuştur [56, 59].

## **2. 25. Hastalıkların Tedavisinde ve Teşhisinde CA İnhibitörlerinin Önemi**

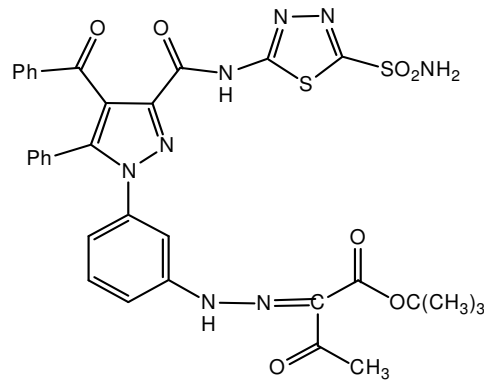
**Bu çalışmada;** karbonik anhidraz enziminin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve daha önce sentezlenen birleşiklerin; glokom tedavisinde rolü olan HCA-II' ve HCA II üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu bileşiklerden inhibisyon etkisi gösterenlerin % aktivite- [I] grafikleri yardımıyla I<sub>50</sub> değerlerinin (%50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu) bulunması ve inhibisyon gösterenlerin de grafikler yardımıyla belirlenmesi amaçlanmıştır. Sentezlenen bileşiklerin formülleri şöyledir:





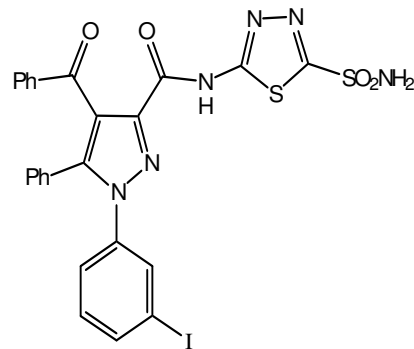
(1)

Etil 2-(2-(3-(4-benzoil-5-fenil-3-(5-sülfamoil-1,3,4-tiyadiazol-2-il karbamoil)-1H-pirazol-1-il)fenil)hidrazono)-3-okso-3-fenilpropanoat



(2)

tert-butil 2-(2-(3-(4-benzoil-5-fenil-3-(5-sülfamoil-1,3,4-tiyadiazol-2-il karbamoil)-1H-pirazol-1-il)fenil)hidrazono)-3-oksobutanoat



(3)

4-Benzoil-1-(3-iyodo-fenil)-5-fenil-N-(5-sülfamoil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-1H-pirazol-3-karboksamid

Şekil 3. 2. CA I ve CA II'nin inhibisyonunda kullanılan bileşiklerin şekilleri

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan Sepharose-4B, *p*-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), L-tirozin, trihidroksi metil aminometan (Tris), siyanojen bromür, sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum fosfat, hidroklorik asit, fosforik asit, aseton, etanol, sülfürik asit, akrilamid, tiyonil klorür, piridin, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250 ve R-250 E., sodyum hidroksit ve karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

#### 3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır. Kullanılan aletler ve cihazlar DPÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde bulunmaktadır.

Santrifüj: Nüve NF800

Soğutmalı santrifüj: Sigma K30

Spektrofotometre: UV-1700 Mod. Shimadzu Mar. + AKS

pH metre: Schott Instruments / Lab850

Peristaltik pompa: Ismater MS-4/8 Reglo digital 4 kanallı 8 tekerli

Karıştırıcı: Vortex-Genie, Heidolph

Hassas terazi: Ohaus – Adventurer

Kronometre: Hanhard, Electronische Digital-Stopuhr Germany

Otomatik Pipetler: Biohit Proline

Mağnetik karıştırıcı: Heidolph MR 3001

Çalkalayıcı: GFL

### 3. 3 Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

**1.** 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub>, pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon):

6,055 g (0,05 mol) Tris, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

**2.** 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, pH=8,8 (Sepharose - 4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon):

16,8 g (0,02 mol) NaHCO<sub>3</sub>, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

**3.** 0,0025 M Veronal tamponu;

5,15 g sodyum barbitalin 900 mL suda çözümlenip, pH=8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.

**4.** 25 mM Tris-HCl / 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon):

3,0275 g (25 mmol) Tris ve 14,2 g (0,1 mol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

**5.** 25 mM Tris – HCl / 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon):

3,0275 g (25 mmol) Tris ve 3,124 g ( 22 mmol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 mL destile suda çözümlenip, 1 N HCl ile pH= 8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

**6.** 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0,5 M NaClO<sub>4</sub>, pH=5,6 (kolona tutunmuş HCA-II izoenzimi ve BCA enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti):

9,187 g (0,075 mol) NaClO<sub>4</sub> ve 2,09 g (0,15 mol) NaCH<sub>3</sub>COO.H<sub>2</sub>O, 120 mL destile su ile çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5,6'ya getirildikten sonra, hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

**7.** SDS-Elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8) 3 mL %1'lik SDS ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacmin saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile

hazırlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce, 950 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkapto etanol ilave edildi.

**8. SDS- Elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:**

1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL %1'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

**9. CO<sub>2</sub> çözeltisi (CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti):**

0 °C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO<sub>2</sub> gazı geçirilerek hazırlandı.

**10. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti):**

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.

**11. Boyama çözeltisi (jelin boyanması için kullanılan çözelti):**

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

**12. Yıkama çözeltisi (jelin yıkanması için kullanılan çözelti):**

%10 asetik asit olacak şekilde metanol ve su karıştırılarak yeterli miktarda hazırlandı.

**13. Sabitleştirme çözeltisi (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti):**

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

**14. İnhibitör stok çözeltileri:**

CA inhibitörü olarak yeni sentezlenen 1, 2, 3 bileşiklerinin % 1'lik çözeltilerini hazırlamak için; her bir bileşikten 5'er mg alınıp 1 mL dimetil sülfoksitte (DMS) çözüldükten sonra, hacimleri 5'er mL'ye tamamlandı.

**15. % 0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi:**

0,1 g indikatörün 16 mL 0,01 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra, hacminin saf su ile 250 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

### 3. 4 Yöntemler

#### 3. 4. 1 Protein tayini

##### 3. 4. 1. 1 Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası; 280 mm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesine dayanmaktadır. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbandsları spektrofotometrede köre (ilgili tampon çözeltiye) karşı okundu.

##### 3. 4. 1. 2 Coomassie blue yöntemi ile protein tayini

Bu yöntemle, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisinde ve hemolizatta protein tayini yapıldı. Bu yöntem, coomassie brilliant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [60].

Tayin işlemlerinde; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı ve saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı. 5 mL coomassie reaktifi tüplere ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Köre olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri standart grafik halinde verildi.

#### 3. 4. 2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini

##### 3. 4. 2. 1 CO<sub>2</sub>-Hidrataz aktivitesi tayini

Aktivite tayini Wilbur Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO<sub>2</sub>'in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> sebebiyle pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulundu. Tampon olarak da, pH'sı 10 olan karbonat tamponundan (0,15 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) yararlanıldı [61, 62]. Enzim birimi ise; enzimsiz CO<sub>2</sub> hidratasyon süresi ( $t_0$ ) ile enzimli reaksiyon süresi ( $t_c$ ) arasındaki farkın,  $t_c$  'ye bölünmesi ile belirlendi.

Deneyde reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu, 0,6 mL su, 0,1 mL enzim ve 2,5 mL doymun CO<sub>2</sub> çözeltileri konuldu. pH'metreden pH'ın 6,3 civarına düşmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi ( $t_c$ ). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine saf su konularak yapıldı ( $t_0$ ). İnhibitörlü çalışmalarda ise; suyun hacmi, kullanılan inhibitör

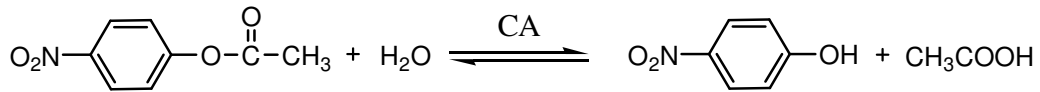
hacmi, kadar azaltılarak yerine inhibitör eklendi. Böylece aktivite ölçüm ortamının hacmi sabit tutulmuş oldu (4,2 mL). Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzim olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidrasyonu süresini, yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

$$\text{Yani; } \quad \text{EU} = (t_0 - t_c) / t_c$$

formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için, enzim ünitesi hesaplanmıştır.

### 3. 4. 2. 2 Esteraz aktivitesi tayini

İnhibitörlerin CA enzimi üzerindeki etkisini araştırmak için bu yöntem kullanıldı. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensipte olarak karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan *p*-nitro fenil asetatı, 348 nm'de absorbanı veren *p*-nitro fenol veya *p*-nitro fenolat'a hidroliz etmektedir.



348 nm'de *p*-nitro fenol ve *p*-nitro fenolat'ın her ikisi de aynı absorbanı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H<sup>+</sup> iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir [17, 63]. Bu dalga boylarındaki *p*-nitro fenil asetatın da çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. Tayin işlemlerinde kuvarz küvetlere 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim konulmasından 3 dakika sonra 25°C'de 348 nm'de absorbanı okundu. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak, karışımın 3 dakika sonraki absorbanı ile sifira ayarlandı. Bu suretle; 3 dakika içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve *p*-nitro fenil asetatın absorpsiyonu için düzeltme yapıldı. İnhibitörlü çalışmalarda ise suyun hacmi azaltılarak, yerine o miktarda inhibitör eklenerek aktivite tayinleri yapıldı.

Bu deneyde kullanılan *p*-nitro fenil asetat substrat çözeltisi, taze olarak hazırlandı. Bunun için 27,2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş yavaş eklendi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini hazırlamak ester sınırlı çözünürlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi [62]. Enzim çözeltisinin tamponlanması 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH=7,4) çözeltisiyle yapıldı [64].

### **3. 4. 3 İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması**

#### **3. 4. 3. 1 Sepharose - 4B matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanışı**

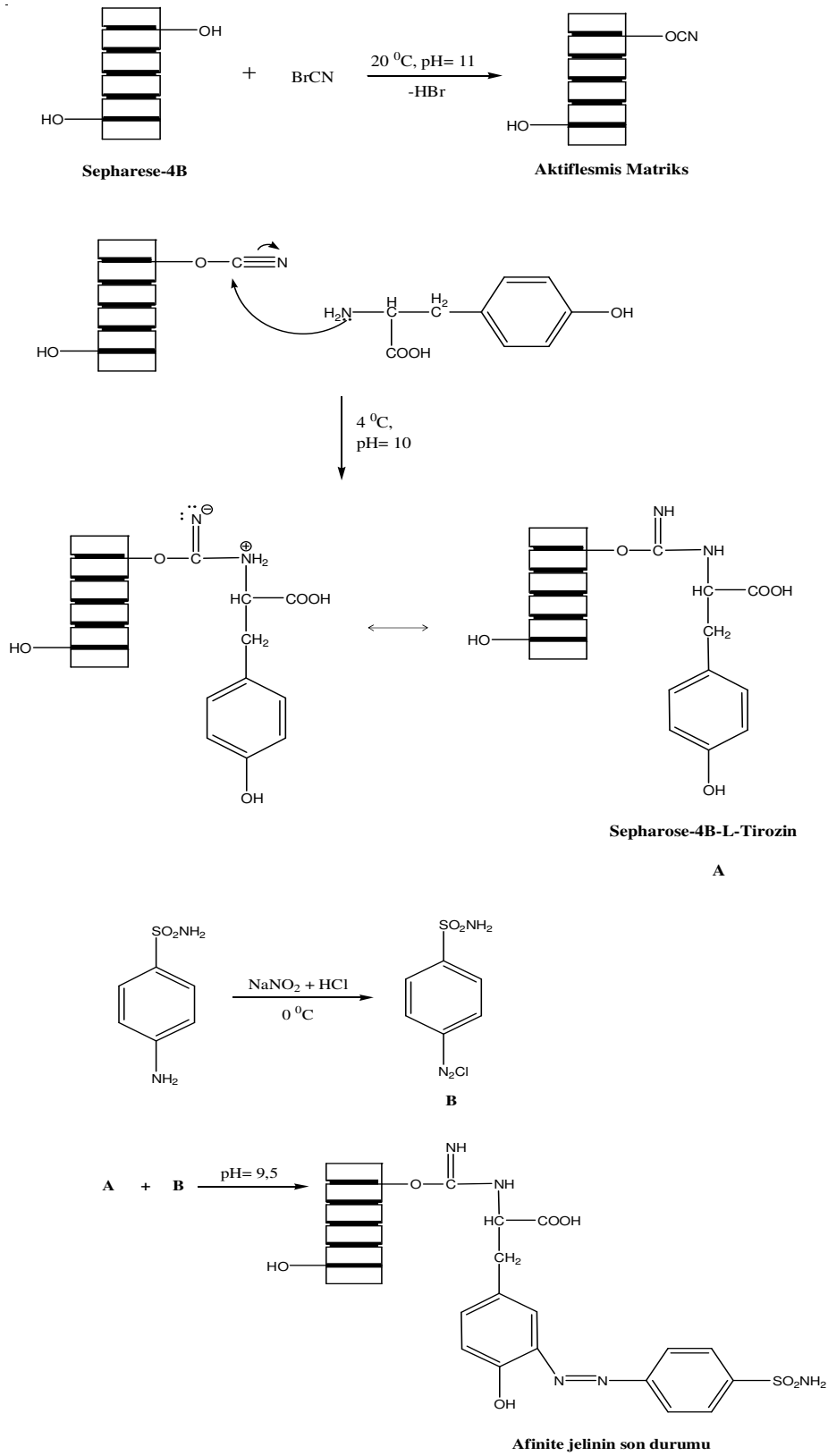
Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak, tirozine kenetlendi. Burada tirozin; afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmaktadır [64].

#### **3. 4. 3. 2. Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi ve tirozin takılması**

20 mL Sepharose-4B, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi ve eşit hacimde destile su ile birleştirildi. Buz banyosu içerisinde karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna, 4 g toz haline getirilmiş CNBr eklendi. pH-metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile 11'e çıkarıldı ve reaksiyon boyunca bu pH değişmeyinceye kadar devam edildi. Karışım buchner hunisine aktarılarak süzüldü. Daha sonra pH'sı 10 olan 250 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile yıkandı ve bir behere alındı. Aynı tamponun 20 mL'sinde, 80 mg tirozin çözüldü ve behere ilave edilerek karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 4°C'de 2 saat süreyle karıştırıldı ve 16 saat bu sıcaklıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda jel yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol suyla yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin, tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 100 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH=8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içerisinde alındı [65-67].

#### **3. 4. 3. 3. Sülfanilamid kenetlendirilmesi**

25 mg-sülfanilamid, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine 10 dakikada damla damla katıldı. Diazolanmış bulunan sülfanilamid, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. pH, 1 M NaOH ile 9,5'e çıkarılarak sabit tutuldu. 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M tris-SO<sub>4</sub> (pH=7,4) tamponuyla yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi [68, 69]. Reaksiyonun açık formülleri aşağıda gösterilmiştir:



**Şekil 4. 1** Afinite jelinin hazırlanması



### **3. 4. 3. 4 SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzimlerin saflığının kontrolü**

Enzimlerin saflaştırılmasından sonra %3-10 kesikli, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli tarafından açıklandığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi.

Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren aralık koyuculara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üzerine yerleştirildi ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Cam plakaların altı, kaynama sıcaklığına getirilerek çözülmüş daha sonra 40-50 °C'ye soğutulmuş agar dökülerek kapatıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektör yardımıyla ilave edildi. Hava almamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar yaklaşık yarım saat bekletildi. Daha sonra yağma jeli, üst düzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi. Tarağın üzerine nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak, plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan kuyular işaretlenerek; jelin üstü önce saf su, daha sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Numuneler kuyuların her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurken, jeldeki kuyulara bir enjektörle tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA + %40 saf su) 30-40 dakika bekletildi. Daha sonra fikse çözeltisinden çıkartılan jel, özel kabına konularak boyama çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra boyama çözeltisinden çıkarılarak, yıkama çözeltisine alındı. Belirli zaman periyotlarında değiştirilme suretiyle jelin zemin rengi açıldı ve protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Mavi renge boyanan renksizleştirme çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar kullanıldı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 mL 1 M Tris-HCl (pH=8,8), 10,66 mL %30'luk akrilamid- %0,8'lik bisakrilamid, 0,61 mL %1'lik-SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilen diamin) ve 11,94 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0.8 mL %1,5'lik amonyum persülfat [(NH<sub>4</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (PER))] ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığıma jeli hazırlaması sırasında; 1 M'lık Tris-HCl pH=6,8'den 1,24 mL %30'luk akril amid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve saf sudan 7,36 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine taze hazırlanmış, %1,5'lik PER'den 0,2 mL ilave edildi.

### **3. 5. Sentezlenen Bileşiklerin CA I Ve CA II Enzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi**

#### **3. 5. 1. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA I Ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi**

İnsan eritrositlerinde elde edilen CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen **1, 2, 3** no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glökom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin % aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4,2 mL).

#### **3. 5. 2. Sentezlenen bileşiklerin CA I Ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi**

İnsan eritrositlerinde saflaştırılan CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen **1, 2, 3** no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glökom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik-çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde beş farklı inhibitör konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 3 mL).

Bütün esteraz aktivitesi deneylerinde kullanılan ana substrat çözeltisi 3 mM, aktivite ölçüm ortamının toplam hacmi 3 mL olduğundan ve 1 mL substrat çözeltisi kullanıldığından; ortamdaki substrat konsantrasyonu 1 mM'dır. Aktivite birimi şöyle hesaplandı: 348 nm'de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat iyonunun molar absorpsiyon sabiti ( $\epsilon$ )  $5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. *p*-Nitrofenil asetatın ise  $0,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  olduğundan; 348 nm'de ölçülen absorbans değerinin 5'e bölümü ile ortamdaki *p*-nitrofenol (*p*-nitrofenolat) iyon konsantrasyonunu mM cinsinden verir [50].

$$p\text{-Nitrofenol konsantrasyonu} = A (O. D)/5 \times 10^3 \text{ M}$$

$$p\text{-Nitrofenol konsantrasyonu} = A (O. D)/5 \text{ mM}$$

Bulunan bu değer 3 dakika için olduğuna göre; 1 dakikada oluşan *p*-nitrofenol miktarını bulmak için 3'e bölünür. Toplam hacim 3 mL olduğundan

$$\text{p-Nitrofenol miktar} = \frac{A(OD)/5}{3} \times 3 = A(OD)/5 \text{ (}\mu\text{mol/dakika)}$$

bulunur.

### 3. 5. 3. Sentezlenen bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin $K_i$ sabitleriyle bulunması

$K_i$  değerlerini bulmak için; insan eritrositlerinden afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılan CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen **1, 2, 3** no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde, inhibitörlü ve inhibitörsüz olarak beş farklı substrat konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümleri yapıldı. Esteraz aktivitesi için yukarda belirtildiği gibi;

$$\text{p-Nitrofenol miktar} = \frac{A(OD)/5}{3} \times 3 = A(OD)/5 \text{ (}\mu\text{mol/dakika)}$$

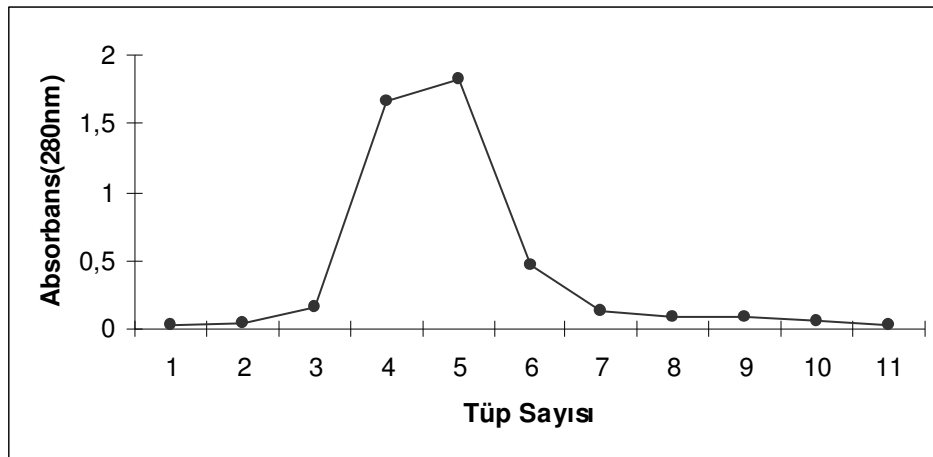
değeri,  $V$  (hız) değeri olarak alındı. Lineweaver Burk grafiklerini çizmek için bu değerler  $1/V$  değerlerine çevrildi. Aynı zamanda beş farklı substrat-konsantrasyonları  $[S]$ , grafikte kullanmak için  $1/[S]$  değerlerine dönüştürüldü. Bu-değerlerden faydalanılarak her bir inhibitörün CA I ve CA II enzimleri için ayrı ayrı Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu. Bu değerler yarışmasız inhibitörler için kullanılan eşitlikte yerine konularak  $K_i$  değerleri hesaplandı.

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

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4. 1 CA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

Jelin kolona yerleştirilmesi, tamponla dengelenmesi sonra insan kanından elde edilen hemolizat katı trisle pH'sı 8,7'ye getirildi. Hemolizat kolona direk olarak tatbik edildi. Tatbik etme işlemi bittikten sonra kolon yıkama tamponundan geçirildi. Yıkama işlemi kanın rengi gidinceye ve köre (yıkama tamponuna) karşı 280 nm'de 0,08 A veya 0,05 A değerine kadar devam etti. Bu değere ulaşıldığında CA I için hazırlanan tampon (pH=6,3) ile elüe edildi. Elüatlar 5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, her tüpteki numune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Elüsyon değerlerinin absorbansı belli bir yükselme ve düşme gerçekleştikten sonra kesildi. Absorbans gösteren tüplerde CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesine bakıldı (şekil 5.1).



**Şekil 5. 1** İnsan eritrositlerinden elde edilen CA I enziminin elüsyonunda; (•) 280 nm'de elde edilen absorbans değerleri

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan CA I ve CA II enzimleri için coomassie blue yöntemiyle protein tayini ve hidrataz aktivitesi tayini yapıldı. Enzimlerin aktivite ölçümü 1 mM substrat konsantrasyonunda ve 100 µL enzim çözeltisi ile yapılmıştır. Protein tayinleri ise, 100 µL enzim çözeltisi için ölçülmüştür. Hemolizatlarda ise aktivite ve protein miktarı ölçümünde; her bir hemolizattan 1 mL alınıp, 10 mL'ye seyreltilmiş ve bundan 100 µL alınarak ölçümler yapılmıştır.

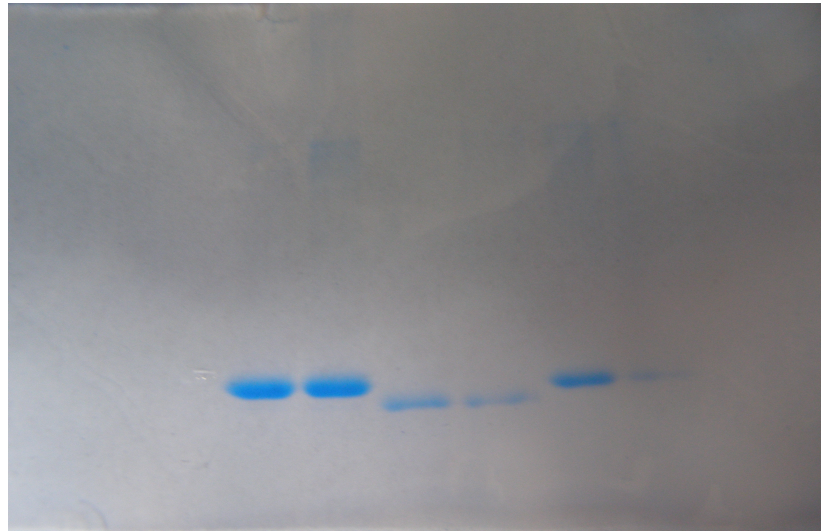
İnsan kanından hazırlanan hemolizat için protein miktarı 95 mg/mL ve hidrataz aktivitesi 1437 EU/mL bulundu ve buradan spesifik aktivite,

$$(SA) = 1437/95 = 15,12 \text{ olarak bulundu.}$$



#### 4. 2 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen CA I ve CA II Enzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezine Sonuçları

Afinite kolonundan saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofrezine yapıldı. Bunun için 3. 4. 3. 2’de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektrofrezine, insan kanından saflaştırılan enzim tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (şekil 4. 3).



**Şekil 5. 3** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerini SDS-poliakrilamid jel elektrofrezine fotoğrafı (1.kanal: HCA-I, 2.kanal: BCA, 3.kanal: HCA-II)

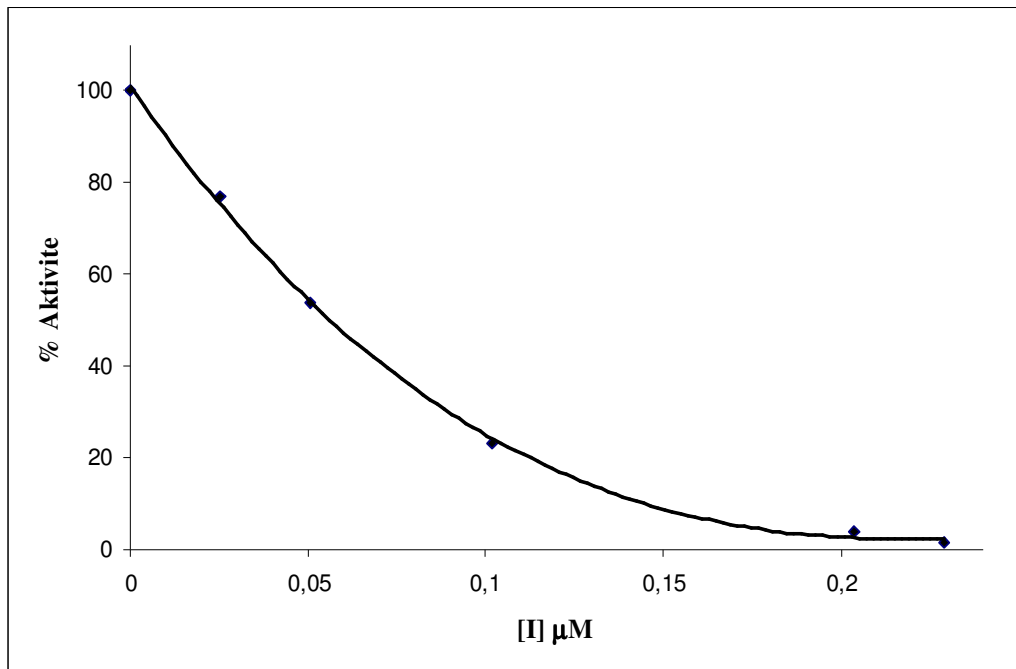
#### 4. 3 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin in vitro Olarak İncelenmesi

##### 4. 3. 1 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen 1, 2, 3 no’lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glökom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1’lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek.  $I_{50}$  değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4.2 mL).

**Çizelge 1. 1** CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **1** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

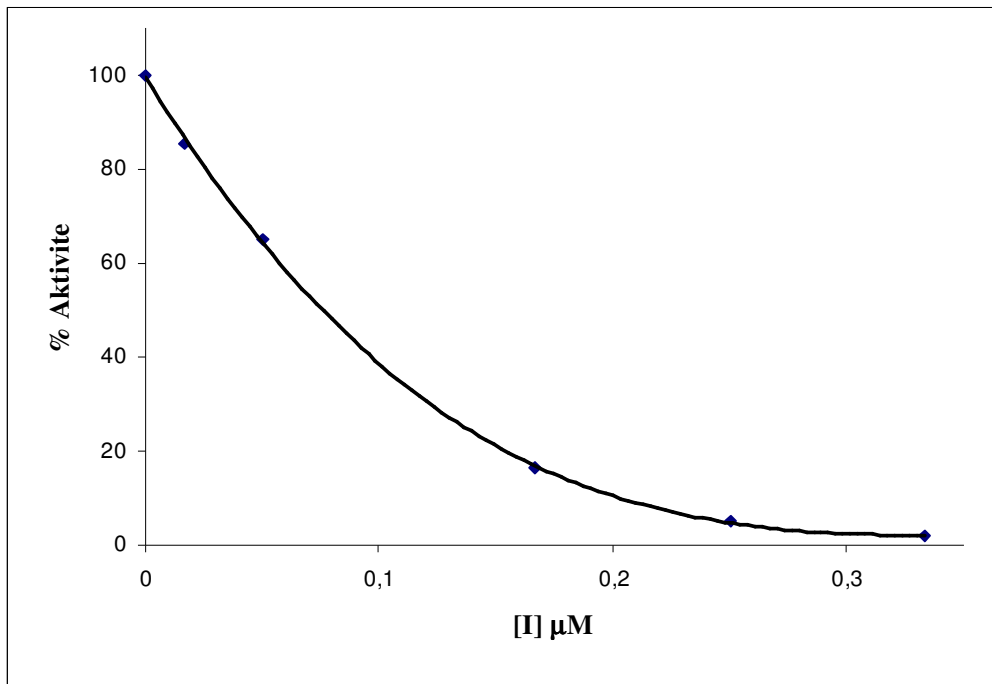
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisi (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µl)	Doygun CO <sub>2</sub> Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] (µM)
1	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	10	490	2,5	77,12	0,02546
	1	100	100	20	480	2,5	53,846	0,05092
	1	100	100	40	460	2,5	23,07	0,10185
	1	100	100	80	420	2,5	3,84	0,20371
	1	100	100	90	410	2,5	1,50	0,22918



**Şekil 5. 4.** CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi

**Çizelge 1. 2** CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **2** bileşğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisi (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µl)	Doygun CO <sub>2</sub> Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] (µM)
2	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	5	495	2,5	85,4651	0,01667
	1	100	100	15	470	2,5	65,1162	0,0501
	1	100	100	50	450	2,5	16,2790	0,1667
	1	100	100	75	430	2,5	5,1407	0,2501
	1	100	100	100	400	2,5	1,8087	0,3334

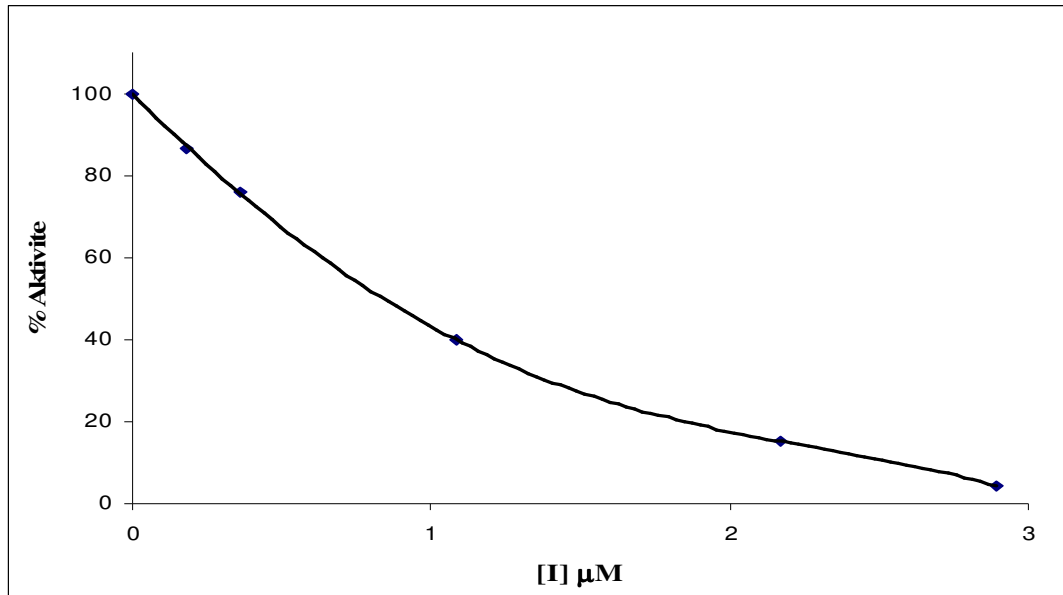


**Şekil 5. 5.** CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (**2**) bileşğinin etkisi



**Çizelge 1. 3** CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **3** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

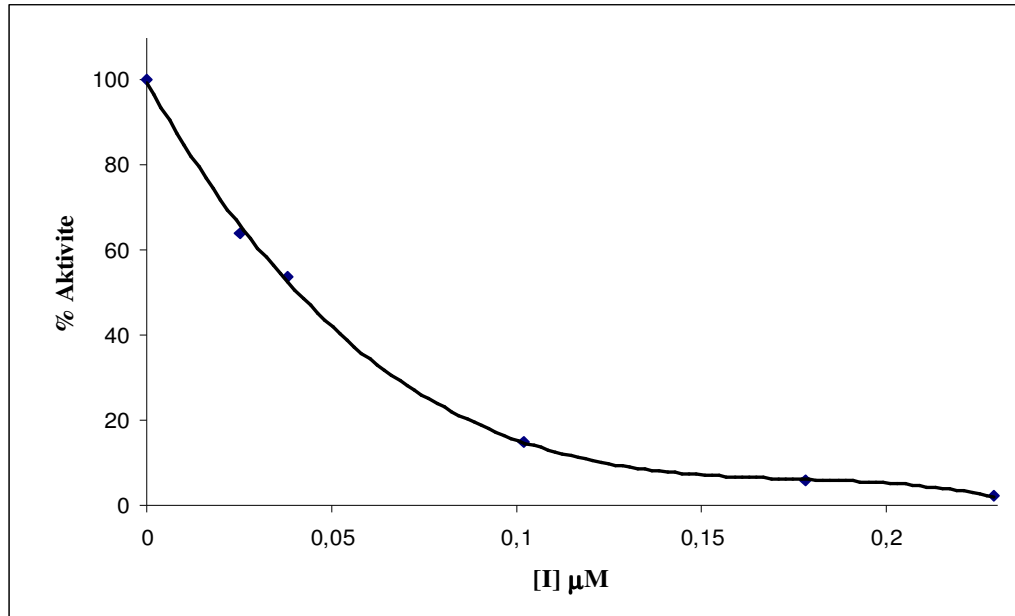
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisı (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µl)	Doygun CO <sub>2</sub> Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] µM
2	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	5	495	2,5	85,4651	0,01667
	1	100	100	15	470	2,5	65,1162	0,0500
	1	100	100	50	450	2,5	16,2790	0,1667
	1	100	100	75	430	2,5	5,1407	0,2501
	1	100	100	100	400	2,5	1,8088	0,3335



**Şekil 5. 6.** CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **(3)** bileşiğinin etkisi

**Çizelge 1. 4** CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **1** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

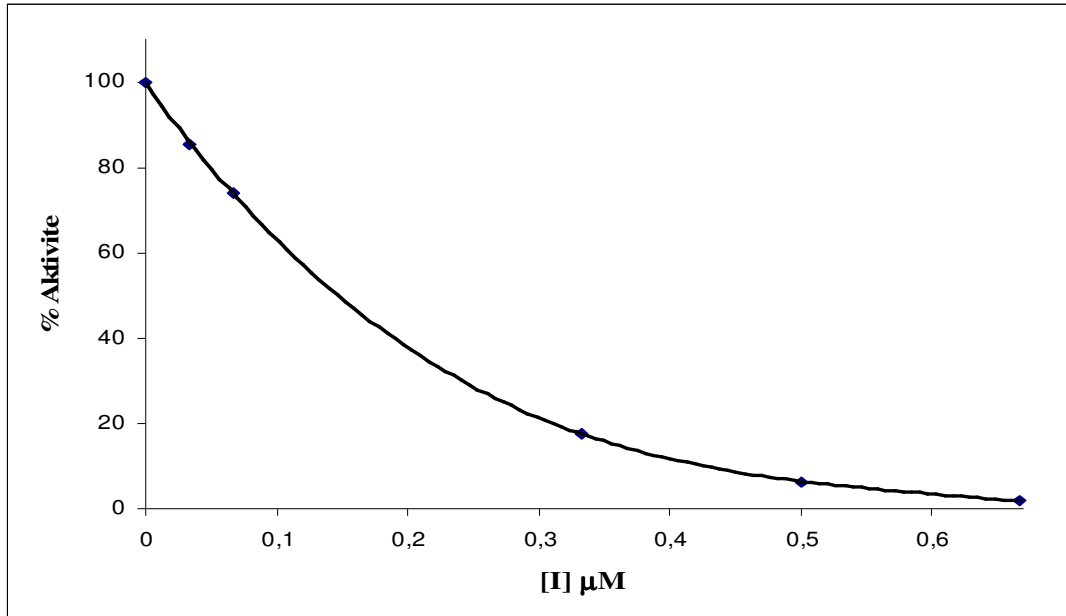
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisi (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µl)	Doygun CO <sub>2</sub> Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] (µM)
2	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	5	495	2,5	85,4651	0,01667
	1	100	100	15	470	2,5	65,1162	0,0500
	1	100	100	50	450	2,5	16,2790	0,1667
	1	100	100	75	430	2,5	5,1407	0,2501
	1	100	100	100	400	2,5	1,8087	0,3334



**Şekil 5. 7.** CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **(1)** bileşiğinin etkisi

**Çizelge 1. 5** CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **2** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

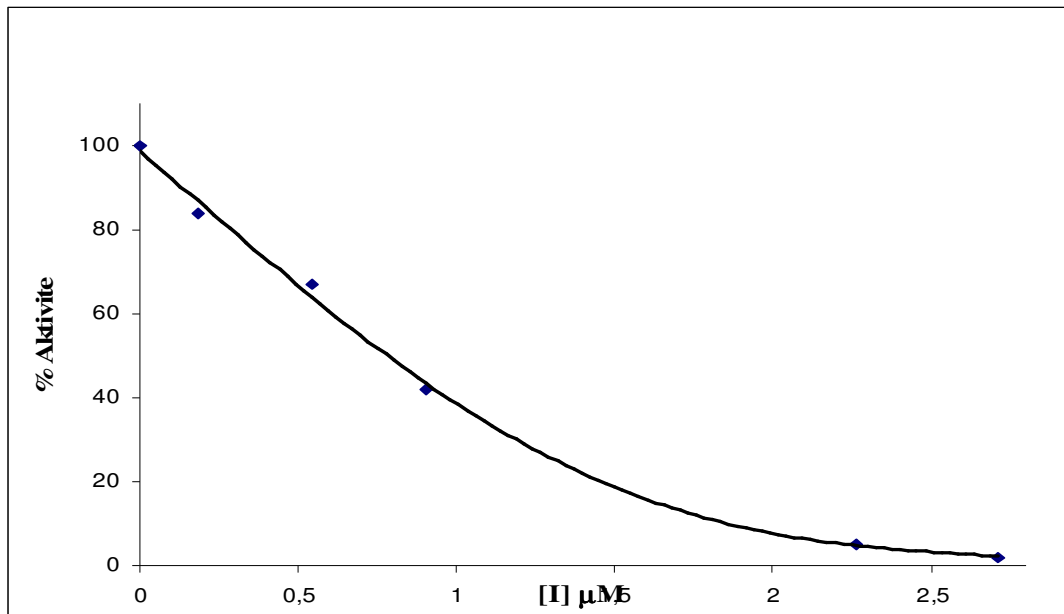
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisi (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µl)	Doygun CO <sub>2</sub> Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] M
2	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	5	495	2,5	85,4651	0,0166
	1	100	100	15	470	2,5	65,1162	0,0501
	1	100	100	50	450	2,5	16,2790	0,1667
	1	100	100	75	430	2,5	5,1407	0,2501
	1	100	100	100	400	2,5	1,8087	0,3335



**Şekil 5. 8.** CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi

**Çizelge 1. 6** CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **3** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisı (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µl)	Doygun CO <sub>2</sub> Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] (µM)
2	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	5	495	2,5	85,4651	0,0167
	1	100	100	15	470	2,5	65,1162	0,0500
	1	100	100	50	450	2,5	16,2790	0,1667
	1	100	100	75	430	2,5	5,1407	0,2501
	1	100	100	100	400	2,5	1,8088	0,3335



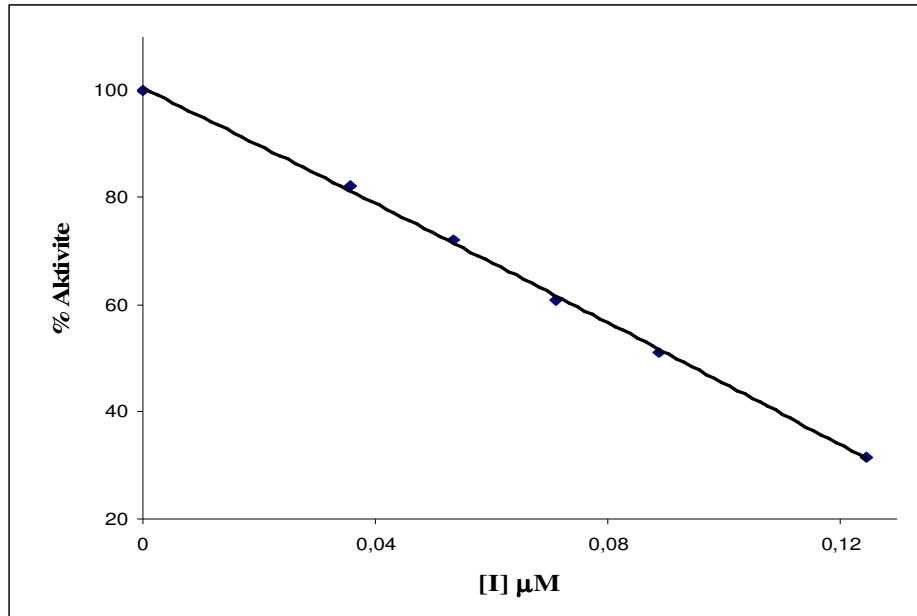
**Şekil 5. 9.** CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **(3)** bileşiğinin etkisi

#### **4. 3. 2 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin İn Vitro olarak incelenmesi**

CA I ve CA II'nin esteraz aktivitesi üzerinde 1, 2, 3 bileşiklerinin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmiştir. Bu amaçla insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapılmıştır. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplanmıştır. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir.

**Çizelge 1. 7** CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **1** bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

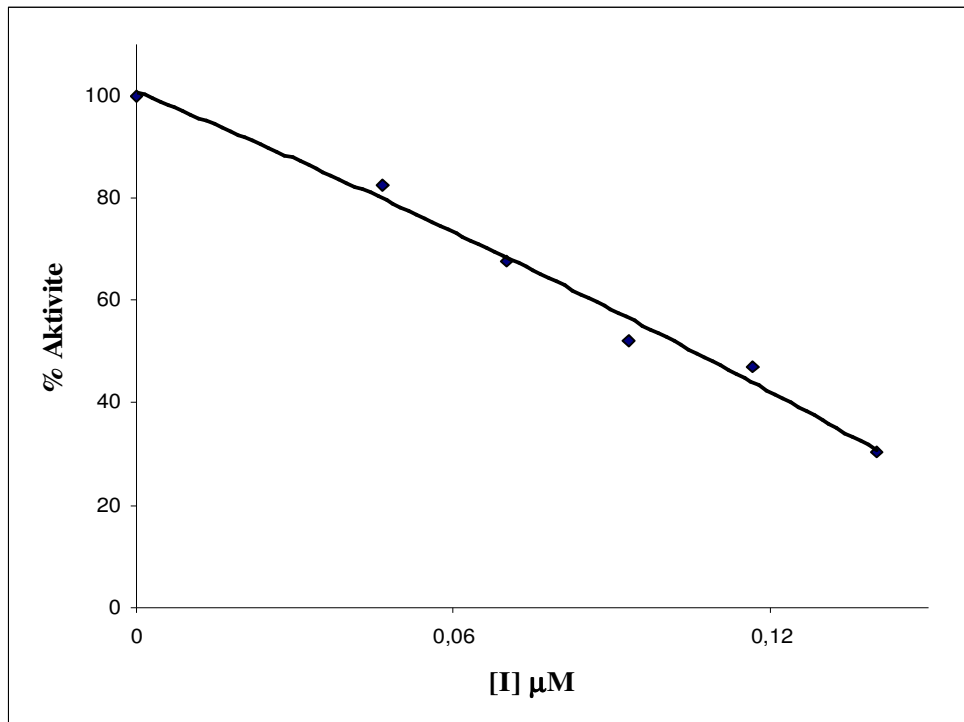
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO <sub>4</sub> Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µL)	% Aktivite	[I] (µM)
1	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	10	590	82,09	0,0356
	1	1,3	0,1	15	585	72	0,0535
	1	1,3	0,1	20	580	61	0,0713
	1	1,3	0,1	25	575	51	0,0891
	1	1,3	0,1	35	465	31,63	0,1248



**Şekil 5. 10.** CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **(1)** bileşiğinin etkisi

**Çizelge 1. 8** CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **2** bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

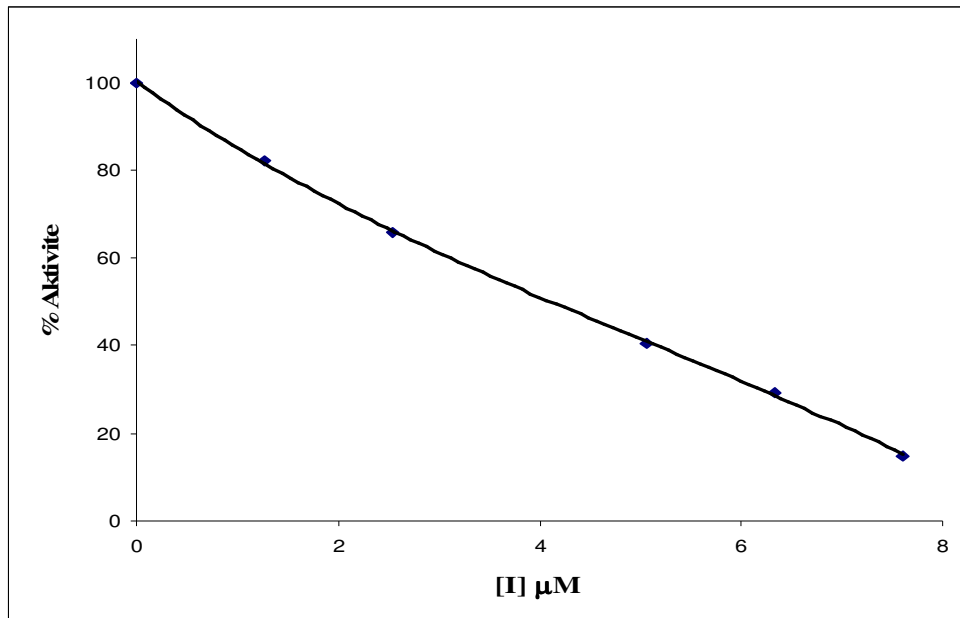
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO <sub>4</sub> Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µL)	% Aktivite	[I] (µM)
2	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	100	500	0,05	$0,35 \cdot 10^{-7}$
	1	1,3	0,1	150	550	0,07	$1,45 \cdot 10^{-7}$
	1	1,3	0,1	200	300	0,09	$3,48 \cdot 10^{-7}$
	1	1,3	0,1	250	250	0,12	$5,8 \cdot 10^{-7}$
	1	1,3	0,1	300	200	0,14	$8,12 \cdot 10^{-7}$



**Şekil 5. 11.** CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **(2)** bileşiğinin etkisi

**Çizelge 1. 9** CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **3** bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

İnhibitör No	Substrat (mL)	SO <sub>4</sub> Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µL)	% Aktivite	[I] (µM)
3	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	5	595	70,57	1,2664
	1	1,3	0,1	10	590	63,59	2,5329
	1	1,3	0,1	20	580	40,39	5,0658
	1	1,3	0,1	25	525	29,43	6,3323
	1	1,3	0,1	30	570	14,96	7,5988

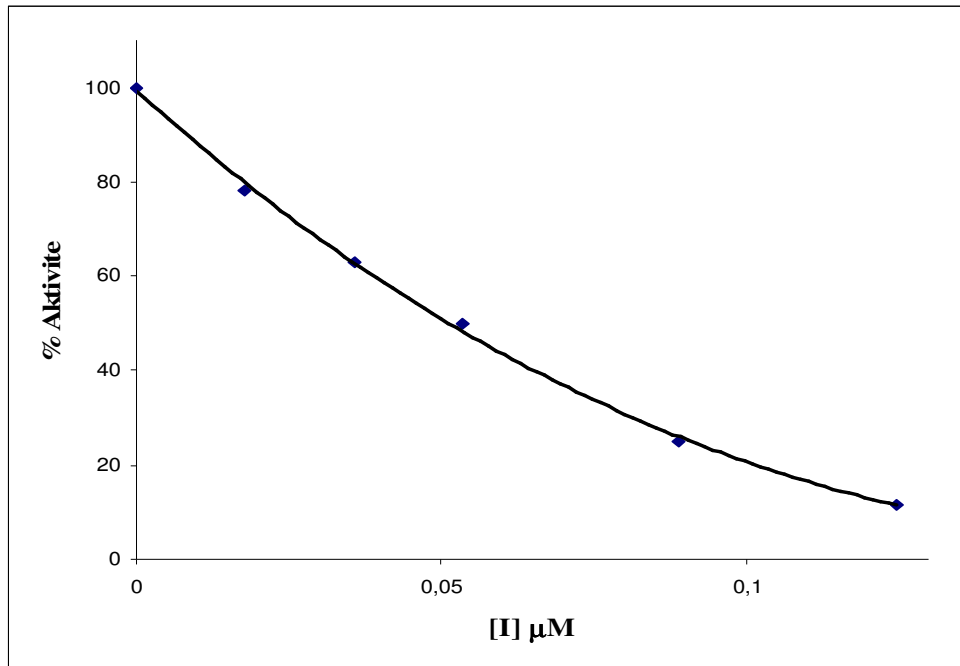


**Şekil 5. 12.** CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **(3)** bileşiğinin etkisi



**Çizelge 1. 10** CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **1** bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

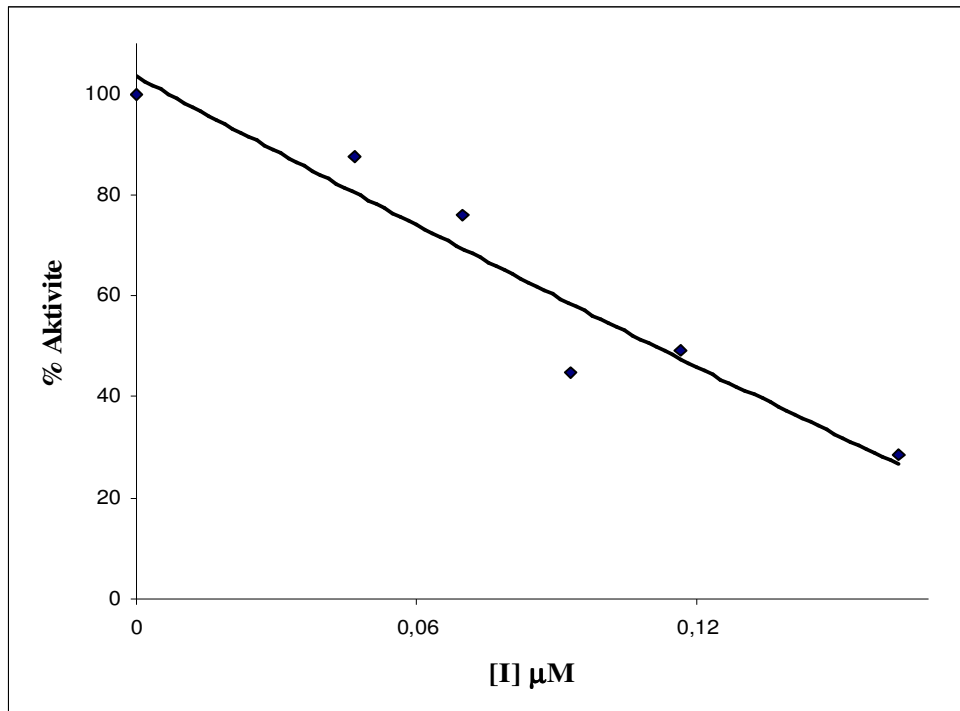
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO <sub>4</sub> Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µL)	% Aktivite	[I] (µM)
1	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	5	595	74,16	0,0178
	1	1,3	0,1	10	590	57,5	0,0356
	1	1,3	0,1	15	585	48,33	0,0535
	1	1,3	0,1	25	575	25	0,0891
	1	1,3	0,1	35	565	11,67	0,1248



**Şekil 5. 13.** CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **(1)** bileşiğinin etkisi

**Çizelge 1. 11** CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **2** bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

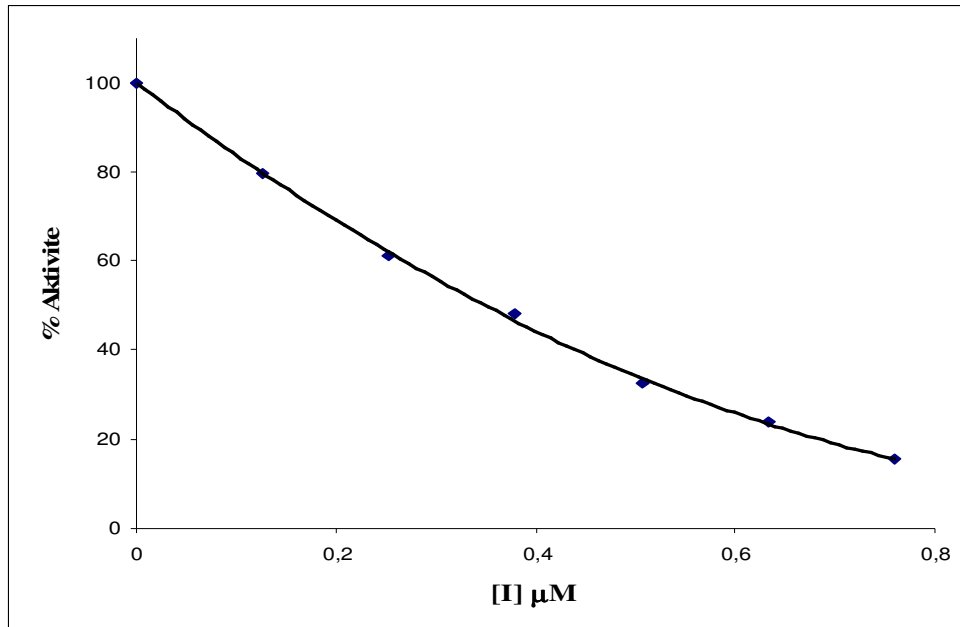
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO <sub>4</sub> Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µL)	% Aktivite	[I] (µM)
2	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	10	590	87,58	0,0467
	1	1,3	0,1	15	585	75,86	0,0701
	1	1,3	0,1	20	580	49,09	0,0934
	1	1,3	0,1	25	575	44,83	0,1168
	1	1,3	0,1	35	465	28,54	0,1634



**Şekil 5.14.** CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **(2)** bileşiğinin etkisi

**Çizelge 1. 12** CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **3** bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

İnhibitör No	Substrat (mL)	SO <sub>4</sub> Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µL)	% Aktivite	[I] (µM)
3	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	5	595	79,54	0,1266
	1	1,3	0,1	10	590	60,97	0,2533
	1	1,3	0,1	20	580	32,52	0,5066
	1	1,3	0,1	25	575	26,02	0,6333
	1	1,3	0,1	30	470	15,45	0,7599



**Şekil 5. 15.** CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **(3)** bileşiğinin etkisi

Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin CO<sub>2</sub> hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan Şekil 5. 4, 5. 5, 5. 6, 5.7, 5.8, 5.9 'teki grafiklerden hesaplanan I<sub>50</sub> değerleri toplu olarak çizelge 1. 13 verilmiştir.

**Çizelge 1. 13** Sentezlenen bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin in vitro CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

I <sub>50</sub> (µM)		
İnhibitör	CA I	CA II
1	0,080	0,056
2	0,082	0,053
3	0,800	0,480

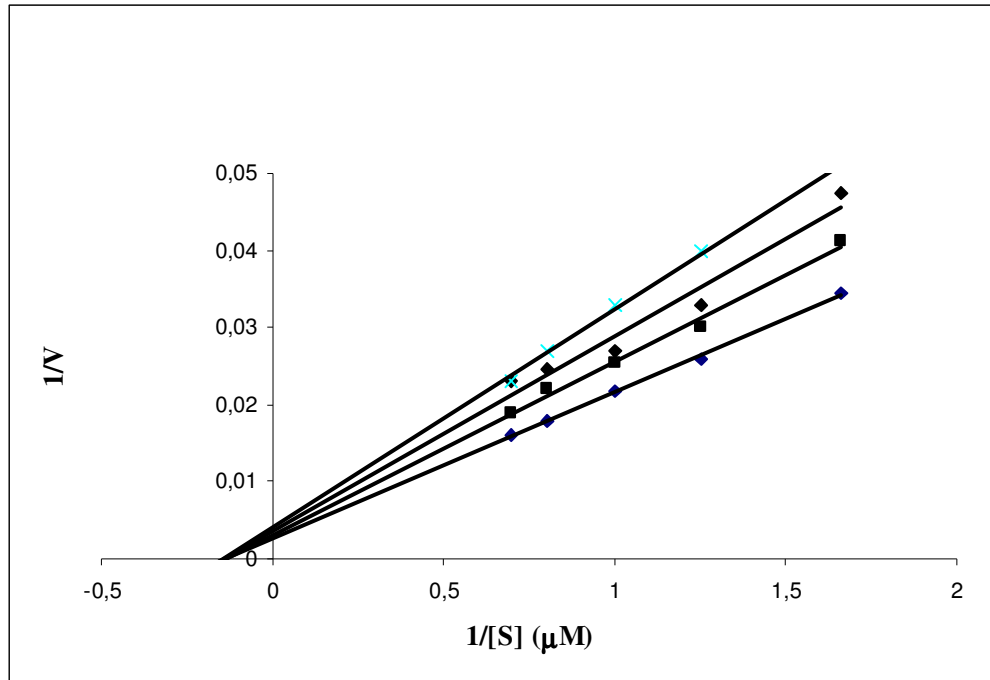
Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan Şekil 5. 10, 5. 11, 5. 12, 5. 13, 5. 14, 5. 15'teki grafiklerden hesaplanan I<sub>50</sub> değerleri toplu olarak çizelge 1. 4 verilmiştir.

**Çizelge 1. 14** Sentezlenen bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin in vitro esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

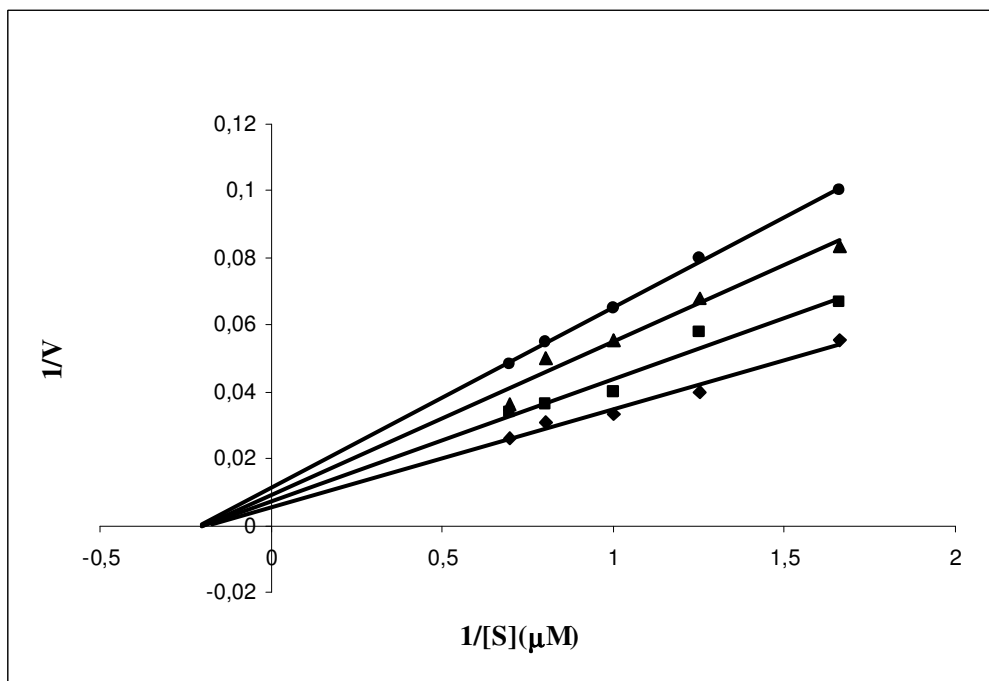
I <sub>50</sub> (µM)		
İnhibitör	CA I	CA II
1	0,097	0,046
2	0,140	0,060
3	3,798	0,361

#### **4. 4 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından $K_i$ Sabitlerinin Bulunması**

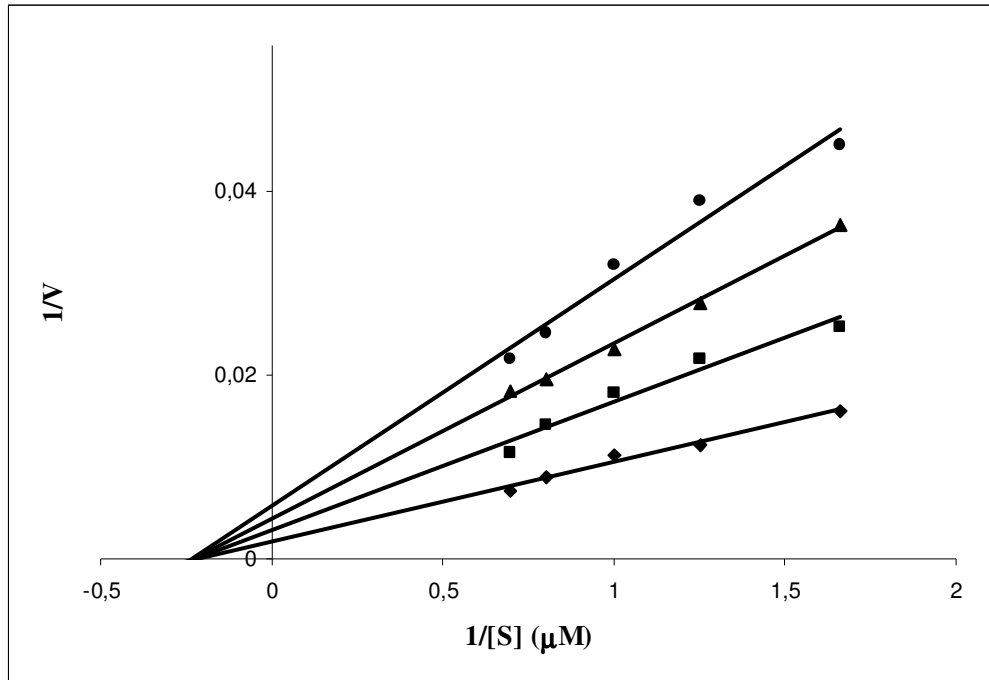
İnhibitör çalışmaları için sentezlenen sülfonamid bileşikleri olan 1, 2, 3 bileşikleri kullanıldı. Bunun için inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktiviteler belirlendi. Bu amaçla 3. 5. 2 ve 3. 5. 3 bölümlerinde anlatıldığı şekilde hazırlanan 3 mM'lık p-nitrofenilasetat çözeltisinden istenilen konsantrasyonu sağlayacak şekilde tüplere 5 farklı miktarda ilave edildi. Bütün tüplerin toplam hacmi 1,9 mL olacak şekilde saf su veya inhibitör çözeltisi eklendi. Daha sonra her tüpe 1 mL 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH=7,4) ve 0.1 mL enzim ilave edilip, 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 348 nm'de köre karşı absorbans değeri ölçüldü. Kullanılan çözelti miktarları ve buna karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları çizelgede verilmektedir. İnhibitörlü ve inhibitörsüz ortamlarda değişik substrat konsantrasyonlarında 348 nm'de ölçülen absorbans değerleri, kullanılan aktivite birimi (reaksiyon hızı)  $\mu\text{mol/dakika}$  cinsinden bölüm 3. 5. 2'de belirtildiği şekilde bulundu. Bütün inhibitörler için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak;  $1/V-1/S$  değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek  $K_i$  değerleri hesaplandı.



Şekil 5. 16 CA I enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.



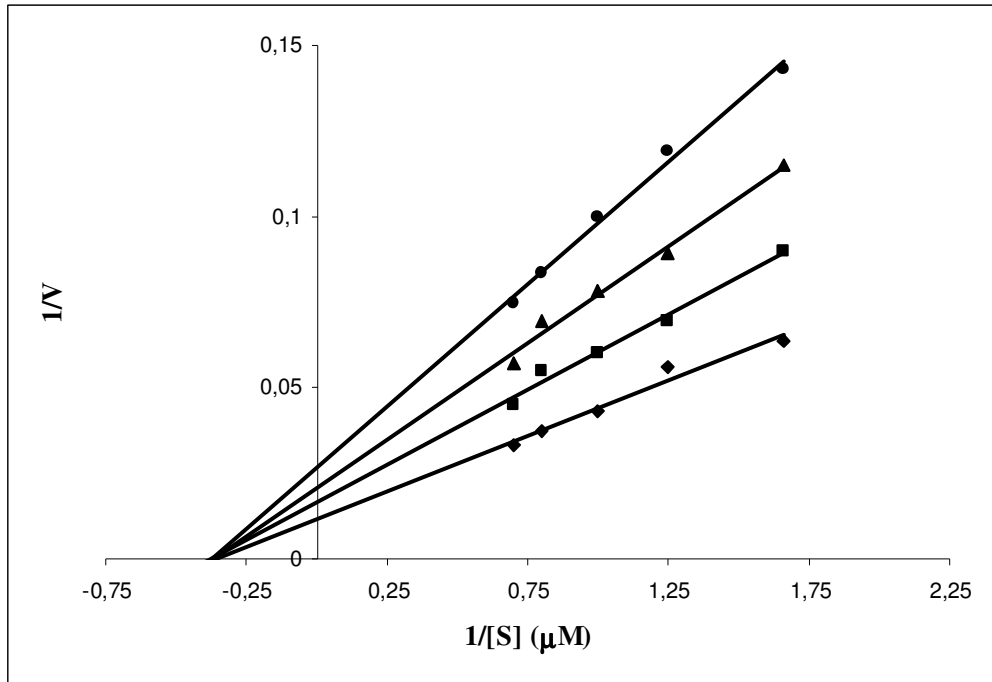
Şekil 5. 17 CA I enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



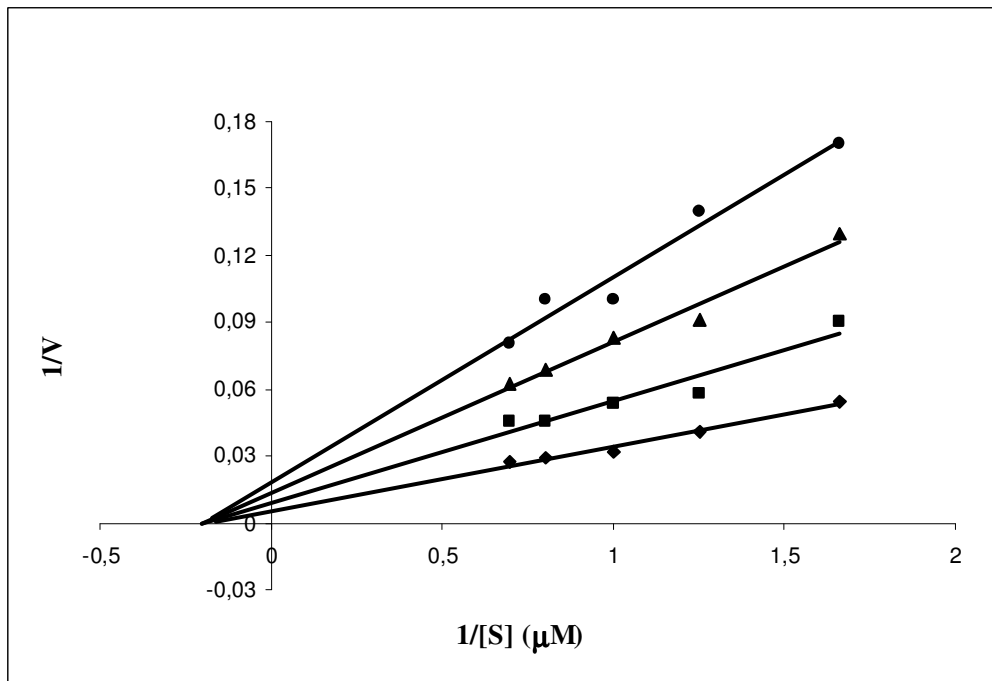
Şekil 5. 18 CA I enzimi üzerinde (3) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 1. 15 Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları

İnhibitör	[I] (μM)	K <sub>i</sub> (μM)	Ortalama K <sub>i</sub> (μM)	İnhibisyon Türü
1	0,107	0,382	0,610	Yarışmasız
	0,356	0,743		
	0,535	0,704		
2	0,117	0,233	0,171	Yarışmasız
	0,141	0,156		
	0,163	0,123		
3	1,266	1,851	2,534	Yarışmasız
	3,799	2,887		
	6,332	2,865		

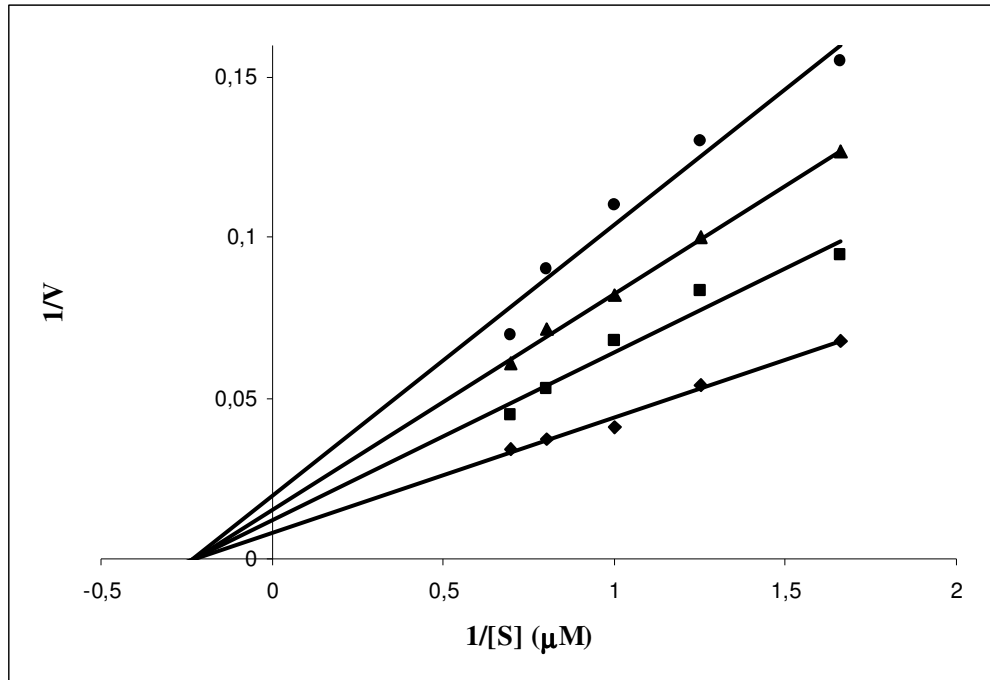


Şekil 5. 19 CA II enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 15. 20. CA II enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği





Şekil 15. 21. CA II enzimi üzerinde (3) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 1. 16 Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları

İnhibitör	[I] (μM)	K <sub>i</sub> (μM)	Ortalama K <sub>i</sub> (μM)	İnhibisyon Türü
1	0,018	0,045	0,061	Yarışmasız
	0,054	0,071		
	0,089	0,069		
2	0,047	0,076	0,058	Yarışmasız
	0,071	0,047		
	0,117	0,049		
3	0,127	0,269	0,380	Yarışmasız
	0,380	0,421		
	0,633	0,450		

## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidroliz E. C. 4. 2. 1. 1) eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilen  $Zn^{+2}$  iyonlu bir metaloenzimidir [44]. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz (CA); canlılarda  $CO_2$ 'in hidrasyon ve  $HCO_3^{-}$ 'in dehidrasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir.

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri ise, aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler,  $R-SO_2NH_2$  kimyasal yapısına sahiptir. Bu amaçla birçok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan HCA-II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmada glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni sentezlenen (1), (2), (3) no'lu karbonik anhidraz inhibitörlerinin insan karbonik anhidraz enzimi (CA I ve CA II) üzerinde inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Çalışmalarda kullanılan karbonik anhidraz enzimi, afinite jeli hazırlanarak, eritrositlerden saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisi ile karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması sırasında eluatların protein muhtevaları 280 nm de absorpsanları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif tayin, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorpsan vermesi esasına dayanır. Kantitatif protein tayinleri Coomassie-blue yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemin diğer protein tayinlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100  $\mu g$  arasındadır [60]. Enzim aktivitesi tayini için hidrataz ve esteraz aktiviteleri ölçüldü.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede  $I_{50}$  değerleri kullanılmaktadır. CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen (1), (2), (3) no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı.

Sentezlenen (1), (2), (3) no'lu bileşiklerin CA I ve CA II enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi hidrataz aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda çizilen % Aktivite-[I] M grafiklerinden bulunan  $I_{50}$  değerleri tekrar aşağıda özetlenmiştir.

$I_{50}$ ( $\mu$ M)		
<b>İnhibitör</b>	<b>CA I</b>	<b>CA II</b>
<b>Tiyadiazol</b>	<b>4,200</b>	<b>4,800</b>
<b>Asetazolamid</b>	<b>0,830</b>	<b>0,570</b>
1	0,080	0,056
2	0,082	0,053
3	0,800	0,480

CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde (1), (2), (3) no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildi. Daha sonra inhibisyon gösteren bileşikler için; insan kanından saflaştırılan eritrosit CA I ve CA II enzimleri için, beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı.

Sentezlenen (1), (2), (3) no'lu bileşiklerinin CA I ve CA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi in vitro esteraz aktivite ölçümleri sonucu çizilen %Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen  $I_{50}$  değerleri tekrar aşağıda özetlenmiştir.

<b>I<sub>50</sub> (μM)</b>		
<b>İnhibitör</b>	<b>CA I</b>	<b>CA II</b>
<b>Tiyadiazol</b>	<b>0,850</b>	<b>0,525</b>
<b>Asetazolamid</b>	<b>0,876</b>	<b>0,472</b>
1	0,097	0,046
2	0,140	0,060
3	3,798	0,361

Bunun sonucunda (1), (2), (3) no'lu bileşiklerinin HCA I ve HCA II hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini veren I<sub>50</sub> değerleri (sırasıyla 0,080, 0,082, 0,800 ve 0,080, 0,053, 0,480 μM) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II enzimi üzerinde (1), (2), (3) no'lu bileşiklerinin iyi inhibisyon etkilerinin bulunması bu bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilir aday inhibitörler olduğunu teyid etmektedir

Bunun sonucunda (1), (2), (3) no'lu bileşiklerin HCA I ve HCA II esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini veren I<sub>50</sub> değerleri (sırasıyla 0,097, 0,140, 3,798 ve 0,046, 0,060, 0,361 μM) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II enzimi üzerinde (1), (2), (3) no'lu bileşiklerinin iyi inhibisyon etkisi göstermesi, bu bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilir aday inhibitörler olduğunu teyid etmektedir.

Sentezlenen bileşiklerin çizelge 4. 6'deki sonuçlara göre HCA I üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde, (1) bileşiği için, (K<sub>i</sub>= 0,610), (2) bileşiği için, (K<sub>i</sub>= 0,171) ve (3) bileşiği için, (K<sub>i</sub>=2,534 ) mM ve HCA II için. (1) bileşiği için, (K<sub>i</sub>= 0,061), (2) bileşiği için, (K<sub>i</sub>= 0,058 ve (3) bileşiği için, (K<sub>i</sub>=0,380 ) mM Bu K<sub>i</sub> sabitlerine sahip olmalarından dolayı iyi inhibitör özelliği gösteren bileşiklerdir. Bu sonuçlar I<sub>50</sub> değerleri sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Yukarı da elde edilen değerlerden bölümümüzde gerçekleştirilen proje kapsamında sentezlenen **1, 2, 3** bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilirliği öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Harper, H. 1975. enzymes. Review of physiological chemistry. Californiyalos Altos 15<sup>th</sup> Edition. P 126-172.
- [2] Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004, Biyokimya, Aktif Yayınevi, 642 s.
- [3] Champe, P.C. ve Harvey, R.A., 1997, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 438 s.
- [4] İnan, Y. ve Gül, M., 2001, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 447 s.
- [5] Arslan, O., 2003, Biyomoleküller Teori ve Uygulamaları, 117-s
- [6] Maren, T. H., 1967, Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 p.
- [7] Pocker, Y. and Sarkanen, S., 1979, Carbonic anhydrase; Structure, catalytic versatility and inhibition. *Advances in Enzymology*, 49, 149.
- [8] Carter, M. J., 1972, carbonic anhydrase; isoenzymes, properties, distribution, and functional significance. *Biol. Rev.* 42, 465.
- [9] Polya, J. B. and Wirtz, A. J., 1965, studies on carbonic anhydrase II. Occurrence of the enzyme in some invertebrates. *Enzymologia*, 30, 27.
- [10] Pocker, Y., Joan, S. Y., 1974, Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition *Biochem.*, 13, 5116.
- [11] Carter, N. D, Jefrey, S. and Shiels, A., 1982, İmmunoassay carbonic anhydrase III in rat tissues. *FEBS lett.*, 139,265.
- [12] Dogson, S. J., Foster, R.E., Schwed, D. A. and Storey, B. T., 1983, Contribution of matrix carbonic anhydrase to citrulline synthesis in isolated puinea pig liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 248, 7696
- [13] Pocker, Y., Joan, S. Y., 1973, Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition *Biochem.*, 12, 5127.
- [14] Tobin, A. J., 1970, Carbonic anhydrase from parsley leaves. *J, Biol. Chem.*, 245, 2656
- [15] Botre, f., Gros, G. and Storey, B. T., 1991, Carbonic anhydrase. Properties and carbo dioxide hydration kinetics. *Biochem.*, 12, 5127.
- [16] Pocker, Y. and Janjic, N., 1989, Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 731 p.
- [17] Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., 1966, Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 214, 5137 p.
- [18] Wistrand, P. J., Schenholm, M. and Loennerholm, G., 1986, Carbonic anhydrase isozymes CA I and CA II in the human eye. *İnvst. Ophtalmol. Vis. Sci.*, 27, 419.
- [19] Lindskop, S., Henderson, L. E., 1971, carbonic anhydrase. *The Enzymes*, 5, 3rd. New York, Acedemic Press, s587.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [20] Scher, A. and Dietsch, P., 1984, A 54 000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. In *Biology and Chemistry of the carbonic anhydrase*. Annals New York Acad. Sci., 429,241.
- [21] Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., Goodman, m., 1983, On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and III. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, volume 7: Molecular Structure and Regulation, 79, 100, Alan R. Liss Inc. New York.
- [22] Andersson, B., Hymen, P. O., Strid, L., 1972, Amino acid sequence of human erythrocyte CA B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48,670.
- [23] Rickli, E. E., Ghazanfar, S. A. S., Gibbons, B. H. and Edsall, J. T., 1964, Carbonic anhydrase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 239,1065.
- [24] Nyman, P. O. and Lindskog, S., 1964, Amino acid compositions of the various forms of bovine and human erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 85, 1411.
- [25] Kaiser, E. T. and Lo, K. W., 1969, The carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluene sulfonic sultone. *J. Am. Chem. Soc.*, 91,4912.
- [26] Wistrand, P. J., 1980, Solubilization and preliminary characterization of membrane-bound carbonic anhydrase. *Uppsala J. Med. Sci.*, 85, 75.
- [27] Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, Italy, 1, 61-97 p.
- [28] Ren, X. and Lindskog, S., 1992, Buffer dependence of CO<sub>2</sub> hydration catalyzed by human carbonic anhydrase. I. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1120, 81-86 p.
- [29] Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995, Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 375-401 p.
- [30] Lindskog, S., 1997, Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharma col. Ther.* 74, 1-20 p.
- [31] Renzi, G., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 2000. Carbonic anhydrase Inhibitors: Topical Sulfonamide Antiglaucoma Agents Incorporating Secondary Amine Moieties. *Bioorg. Med. Chem.*, Italy, 10, 673-676 p.
- [32] Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995, Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 375-401 p.
- [33] Hazen, S. A., Waheed, A., Sly, W. S., LaNoue, K.F. and Lynch, C.J., 1996, Differentiation – dependent expression of CA and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEBJ*, 10, 481-490 p.
- [34] Lakkis, M. M., Bergenheim, N. C. H. and Tashian, R. E., 1996, Expression of carbonic anhydrase of mouse VII. in *E. Coli*. And demonstration of its CO<sub>2</sub> hydrase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 268-272 p.
- [35] Kisker, C., Schindelin, H., Albert, B. E., Ferry, J. G. and Rees, D. C. 1996, A left handed  $\beta$  - helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanasarcina thermophila*. *EMBO J* 15; 2323-2330 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [36] Hewett- Emett, D. and Tashian, R. E. (1996) Functional diversity, conversation, and convergence in the evolution of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogener. Evol.* 5: 50-77.
- [37] Lesburg, C. A. and Christianson, D. W., 1995, X – ray crystallographic studies of engineered hydrogen bond Networks in a protein – zinc binding site. *J. Am. Soc.*, 117 6368-6844 p.
- [38] Björkbacka, H., Johansson, I. M. , Skarfstad, E. and Formsan, C., 1997, The sulfhydryl groups of Cys269 and Cys272 are critical for oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*. *Biochem.*, in press.
- [39] Stams, T., Chen, Y., Boriack – Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis. P. and Christianson, D. W., 1998, *Protein Sci.*, 7, 556 p.
- [40] Briganti, F., Pierattelli, A, Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 1996 *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 1001 p.
- [41] Maren, T. H. and Conroy, C. W., 1993, A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239 p.
- [42] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity *J. Pharm. And. Toxicol. Meth.*, 38, 169-172p.
- [43] Verpoorte, J. A., Mehta, S. And Edsall, J. T., 1967, Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 242, 4221 p.
- [44] Lindskog, S., 1982, Carbonic anhydrase. In *Advances in horganik Biochem.*, 4, 115-170. Liljas. A., Hakansson, K., Jonsson, B. H. and Xue. Y., 1994, Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 219, 1-10 p.
- [45] Liljas, A., Hakansson, K., Jonsson, B. H. and Xue, Y. 1994, Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 219, 1-10 p.
- [46] Mangani, S. and Hakansson, K 1992, Crystallographic studies of the binding of protonated and unprotonated inhibitors to carbonic anhydrase using hydrogen sulphide and nitrate anions. *Eur. J. Biochem.* 210: 867-871 p.
- [47] Simonsson, I. and Lindskog, S. 1982, The interaction of sulfate with carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.* 123 : 29-36 p.
- [48] Hakansson, K., Carlsson, M., Svensson, L. A. and Liljas, A. 1992, Structure of native and apo carbonic anhydrase II. *J. Mol. Biol.* 227 : 1192-1204 p.
- [49] Roughton, F. J. W. and Booth, V. H. 1946, The Effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J.* (40) : 319 p.
- [50] Tozlu, İ., 1997, Eritrositlerden Afinitive Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Van
- [51] Lindskog, S. and Wistrand, P. J. 1988, Inhibitors of carbonic anhydrase. In: *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*, pp. 698-723 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [52] Liesegang, T. J., 1996, Glaucoma: Changing Concepts and Future Directions, Mayo Clin. Proc., 71, 689 p.
- [53] Chiou, C. Y., 1981, Biochem. Pharm., 30, 103 p
- [54] Wilson MR and Martane JF. 1996, Epidemiology of chronic open – angle glaucoma in : The Glcomas. Ritch R, Shields MB, Krupin, (eds), StLouis Masby,; 735-68 p..
- [55] Wiggs J. L., 1995, Genetics of Glaucoma Ophthalmol Clin. Nort. Am.: 203-14 p.
- [56] Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2000, Carbonic Anhydrase inhibitors – Part 94. 1, 3, 4 – thiadiazole – 2 sulfonamide derivatives as antitumor agents. Eur. J. Med. Chem., 35, 867 – 874 p.
- [57] Maren, T. H. and Janskowska, L., 1985, Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot. Cur. Eye. Res., 4, 399 p.
- [58] Sugrue, M. F., 1996, The preclinical pharmacology of dorzolamide hydrochloride, a topical carbonic anhydrase inhibitor. J. Ocular Pharmacol. Ther., 12, 363-376 p.
- [59] Conroy, C. W., 1997, Sulfonamides do not reach the retina in therapeutic amounts after topical application to the cornea. J. Ocular Pharmacol. Ther., 13, 465 – 472 p.
- [60] Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method fort he quantitation of microgramquantities of protein utilizing the priciples of protein – dye binding. Anal. Biochem., 72, 248 p.
- [61] Maren, C. H., 1960, A simplified micromethod fort he determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. J. Pharmac. Exp. Ther., 130, 26 p.
- [62] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characteriazion of carbonic anhydrase activity. J. Pharm. And Toxicol. Meth., 38, 169 – 172 p.
- [63] Kandel, M., Gonall, A. G., Wong, S. and Kondel, S. I., 1970, Some characteristics of human, bovine and horse carbonic anhydrase as revealed by inactivation studies. J. Biol. Chem., 245, 2444 p.
- [64] Kohn, J. and Wilchek, M. A., 1978, Colormetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. Biochem. Biophy. Res. Com., 7, 14 p.
- [65] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö. İ., 1997, A new method fort he purification of carbonic anhydrase izozymes by affinity choramatography. Tr. J. of Med. Sci., 27, 559 p.
- [66] Arslan, O., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Nalbantoğlu, B., 1997, Synthesis and Investigation of Inhibition Effects of New Carbonic Anhydrase Inhibitors. Bioorg. Med. Chem., 5, 515 – 518 p.
- [67] Laemmli, D. K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., 227, 680 p.
- [68] Cuatrecasas, P., 1970, Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads. J. Biol. Chem., 245, 3059 p.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)**

- [69] Keha, E. E., 1981, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu. Doçentlik tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi