

PİRAZOL KARBOKSİLİK ASİTLERİN, TİYADİAZOLLE AMİTLEŞME  
ÜRÜNLERİNİN SIĞIR CA 'SI (KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ)  
ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Haris AKBAŞ

Yüksek Lisans

Kimya Anabilim Dalı

Ocak – 2008

PİRAZOL KARBOKSİLİK ASİTLERİN, TİYADİAZOLLE AMİTLEŞME  
ÜRÜNLERİNİN SIĞIR CA 'SI (KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ)  
ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Haris AKBAŞ

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

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Ocak – 2008

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Haris AKBAŞ'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Pirazol Karboksilik Asitlerin, Tiyadiazolle Amitleşme Ürünlerinin Sığır CA'sı (Karbonik Anhidraz Enzimi) Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

/ / 2007

**İmza:**

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

ÜYE: Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2007 gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. M. Sabri ÖZYURT  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**PİRAZOL KARBOKSİLİK ASİTLERİN, TİYADİAZOLLE AMİTLEŞME  
ÜRÜNLERİNİN SIĞIR CA'SI (Karbonik Anhidraz Enzimi) ÜZERİNDEKİ  
İNİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Haris AKBAŞ

Kimya, Yüksek Lisans Tezi, 2008

Tez Danışmanı: Yrd. 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 gözünde CA-I, CA-II ve CA-IV izoenzimleri bulunur. Karbonik anhidraz inhibitörleri, aköz humorun salgılanmasıyla oluşan yüksek göz içi basıncın (IOP) düşürdükleri için, glaucoma hastalığı tedavisinde etkili olarak kullanılırlar.

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

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

Daha sonra sentezlenen yeni bileşiklerin **(1)**, **(2)**, **(3)** sığır eritrosit BCA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelendi. Çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesinin belirlenmesinde hidrataz ve esteraz aktivitesinden faydalanıldı. BCA'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); BCA için 0,32.10<sup>-6</sup> ile 0,7.10<sup>-6</sup> M arasında bulundu. p-Nitrofenil asetati hidroliz aktivitesi olan esteraz aktivitesine göre ise; BCA için 2,0.10<sup>-6</sup> ile 2,8.10<sup>-6</sup> M arasında I<sub>50</sub> değerleri bulundu.

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

**THE INVESTIGATION OF THE INHIBITION EFFECTS OF AMIDE DERIVES  
OF PYRAZOLE CARBOXYLIC ACIDS BOVINE  
ON CARBONIC ANHYDRASE ENZYME**

Haris AKBAŞ

Chemistry, M. S. Thesis, 2008

Thesis Supervisor: Asst. 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 bovine 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 bovine carbonic anhydrase enzymes (BCA) have been 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 **(1)**, **(2)**, **(3)** compounds show inhibition effect on BCA hydratase and esterase activity.  $I_{50}$  values were determined by drawing % activity-[I] graphs for drugs showing inhibition effects. For **(1)**, **(2)**, **(3)** compounds of CO<sub>2</sub>-hydratase activity, inhibition effect ranged from  $0,32 \cdot 10^{-6}$  to  $0,7 \cdot 10^{-6}$  M for BCA with  $I_{50}$  (molarity of inhibitor producing a %50 inhibition of CA activity). As for esterase activity of p-nitrophenyl acetate, **(1)**, **(2)**, **(3)** compounds have inhibition ranging from  $2,0 \cdot 10^{-6}$  to  $2,8 \cdot 10^{-6}$  M for BCA with  $I_{50}$ .

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

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana bu çalışma olanağını sağlayan Kimya Bۆlüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN'a, bu tez çalışmasının planlanması ve yürütölmesi süresince desteğini ve ilgisini esirgemeyen, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Metin BÜLBÜL'e, Kimya Bۆlümünün değerli öğretim elemanlarına ve yüksek lisans arkadaşlarıma teőekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca yanımda olup beni her zaman destekleyen aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

Haris AKBAŞ

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL VE ONAY SAYFASI .....	III
ÖZET .....	IV
SUMMARY .....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ .....	1
2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ (E.C. 4.2.1.1).....	9
2. 1. Karbonik Anhidraz I.....	9
2. 2. Karbonik Anhidraz II.....	10
2. 3. Karbonik Anhidraz III .....	11
2. 4. Karbonik Anhidraz IV .....	11
2. 5. Karbonik Anhidraz VA.....	12
2. 6. Karbonik Anhidraz VB.....	12
2. 7. Karbonik Anhidraz VI .....	12
2. 8. Karbonik Anhidraz VII.....	13
2. 9. Karbonik Anhidraz VIII.....	14
2. 10. Karbonik Anhidraz IX .....	14

## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

2. 11. Karbonik Anhidraz X.....	15
2. 12. Karbonik Anhidraz XI .....	15
2. 13. Karbonik Anhidraz XII.....	15
2. 14. Karbonik Anhidraz XIII.....	16
2. 15. Karbonik Anhidraz XIV .....	16
2. 16. Karbonik Anhidraz XV.....	17
2. 17. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Fizyolojik Fonksiyonları.....	18
2. 18. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar .....	20
2. 19. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları .....	21
2. 20. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması .....	23
2. 21. Karbonik Anhidraz Aktivitesi.....	24
2. 22. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri .....	25
2. 23. Glaucoma Tedavisinde Kullanılan Sülfonamidler.....	29
2. 24. Hastalıkların Tedavisinde ve Teşhisinde CA İnhibitörlerinin Önemi .....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	36
3. 1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler .....	36
3. 2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar .....	36
3. 3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	37
3. 4. Yöntemler .....	39
3. 4. 1. Protein Tayini.....	39
3. 4. 1. 1. Kalitatif Protein Tayini .....	39
3. 4. 1. 2. Coomassie Blue Yöntemiyle Protein Tayini.....	39



## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

3. 4. 2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini.....	39
3. 4. 2. 1. CO <sub>2</sub> – Hidrataz Aktivitesi Tayini.....	39
3. 4. 2. 2. Esteraz Aktivitesi Tayini.....	41
3. 4. 3. Sığır Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması.....	42
3. 4. 3. 1. Sepharose – 4B Matriksi Üzerinde Afinite Jelinin Hazırlanması .....	42
3. 4. 3. 2. Sepharose – 4B'nin Aktifleştirilmesi ve Tirozin Takılması.....	42
3. 4. 3. 3. Sülfanilamid Kenetlenmesi .....	42
3. 4. 3. 4. SDS – Poliakrilamid Jel Elektroforeziyle Enzimlerin Saflığının Kontrolü .....	44
3. 4. 4. Sığır Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin (BCA) Saflaştırılması.....	45
3. 4. 4. 1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizat Eldesi.....	45
3. 4. 4. 2. Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu .....	45
3. 5. Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi .....	46
3. 5. 1. Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit BCA Enziminin Hidrataz Aktiviteleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi .....	46
3. 5. 2. Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi .....	46
3. 5. 3. Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin K <sub>i</sub> Sabitleriyle Bulunması .....	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	48
4. 1. BCA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları.....	48
4. 2. Sığır Eritrositlerinden Elde Edilen BCA Enziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları.....	50

## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

4. 3. Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin in vitro Olarak İncelenmesi.....	50
4. 3. 1. Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enziminin Hidrataz Aktiviteleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin in vitro Olarak İncelenmesi.....	50
4. 3. 2. Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisinin in vitro Olarak İncelenmesi.....	54
4. 4. Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından $K_i$ Sabitlerinin Bulunması.....	59
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	65
KAYNAKLAR .....	68

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1 Dönüşümsüz inhibisyon mekanizması ve şematik şekli .....	3
1. 2 Yarışmalı inhibisyon mekanizması ve şematik şekli .....	3
1. 3 Yarı yarışmalı inhibisyon mekanizması ve şematik şekli .....	4
1. 4 Çözünmüş ve birbirinden ayrı enzimleri olan sistemde, substrat ve ara bileşikler difüzyonla enzimleri bulur .....	5
1. 5 Enzim komplekslerinde substrat enzimlerden ayrılmadan ürüne dönüşür	5
1. 6 Membrana bağlı bir enzim sistemi .....	6
1. 7 Enzimin Liganda bağlanması ve elue edilmesinin şematik gösterimi .....	8
2. 1 HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi .....	22
2. 2 Karbonik anhidrazın katalizlediği CO <sub>2</sub> -hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi .....	23
2. 3 İnsan CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri .....	27
2. 4 Anyonik İnhibitörler ve sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyonu mekanizması .....	28
3. 1 Afinite jelinin hazırlanması .....	43
4. 1 Sığır eritrositlerinden elde edilen BCA enziminin elüsyonunda; 280 nm'de elde edilen absorban değerleri .....	48
4. 2 Coomassie-Blue yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik	49
4. 3 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı .....	50
4. 4 BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğinin etkisi .....	51
4. 5 BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğinin etkisi .....	52
4. 6 BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğinin etkisi .....	53
4. 7 BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğinin etkisi .....	55

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4. 8 BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğinin etkisi .....	56
4. 9 BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğinin etkisi .....	57
4. 10 BCA enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği .....	63
4. 11 BCA enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği .....	63
4. 12 BCA enzimi üzerinde (3) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği .....	64

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1	Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri ..... 21
4. 1	BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar ..... 51
4. 2	BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar ..... 52
4. 3	BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar ..... 53
4. 4	BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar ..... 55
4. 5	BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar ..... 56
4. 6	BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar ..... 57
4. 7	Sentezlenen bileşiklerin BCA enziminin in vitro CO <sub>2</sub> -hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları ..... 58
4. 8	Sentezlenen bileşiklerin BCA enziminin in vitro esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları ..... 58
4. 9	BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve K <sub>i</sub> elde etmek için yapılan işlem sonuçları ..... 60
4. 10	BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve K <sub>i</sub> elde etmek için yapılan işlem sonuçları ..... 61
4. 11	BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve K <sub>i</sub> elde etmek için yapılan işlem sonuçları ..... 62
4. 12	Sentezlenen bileşiklerin eritrosit BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları ..... 64

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
L	Litre
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ M	Mikromolar
nM	Nanomolar
Rpm	Devir/Dakika
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BCA	Sığır eritrosit karbonik anhidraz
CA	Karbonik anhidraz enzimi
CARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
E.C	Enzim kod numarası
E.U	Enzim ünitesi
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EI	Enzim inhibitör kompleksi
ESI	Enzim inhibitör substrat kompleksi
I	İnhibitör
IOP	Yüksek göz içi basıncı
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetramet etilendiamin
Tris	Trihidroksimetilaminometan

## 1. GİRİŞ

Enzimler, günümüzde biyokimya alanında en çok çalışılan konulardan biridir. Enzimlerin, sağlıktan endüstriyel konulara kadar çok sayıda geniş uygulama alanı vardır <sup>[10]</sup>.

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir <sup>[1]</sup>. Vücuttaki tüm reaksiyonlar enzimler tarafından yürütülürler. Enerji açısından mümkün olan birçok biyolojik reaksiyonda; enzimler, substratları uygun yollara kanalize ederler. Böylece enzimler bütün metabolik olaylarda vazgeçilmez öğelerdir.

Enzimler hem katalizledikleri reaksiyon tiplerine, hem de ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifiktirler. Genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler. Substratlara karşı spesifiklikleri ise oldukça yüksek ve kesindir <sup>[1]</sup>.

Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna -az eki getirilerek (Lipaz, üreaz v.b) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin v.b) isimlendirilirken, günümüzde Uluslar Arası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile tanımlanmıştır (E.C. 4.2.1.1) <sup>[1,2]</sup>.

Enzimlerin katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve substratlara karşı spesifik olmalarından dolayı; enzimler, hücre içinde reaksiyonların hatasız ve hiçbir yan ürün oluşturmadan yürümelerini sağlarlar. Aynı zamanda laboratuvar şartlarında gerçekleşmesi çok zaman alan ve birçok basamağa ihtiyaç duyan, bazen de yüksek sıcaklık, yüksek basınç, aşırı bazik ve asidik ortam gerektiren reaksiyonların, enzimler sayesinde hücre içi şartlarda birkaç saniye gibi çok kısa bir zamanda gerçekleşmesini sağlarlar <sup>[2]</sup>.

Enzimlerin katalizleme güçleri turnover sayısı adı verilen bir değerle ifade edilir. Turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzimlerden biri karbonik anhidraz enzimidir.

Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.U) cinsinden verilir. Geniş bir enzim ünitesi tanımı olmamasına rağmen genelde, 25 °C de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür. Katal ise saniyede 1 mol substratı ürüne

dönüştüren enzim miktarıdır. Katal çok büyük bir birimdir. Bu nedenle pratikte katal yerine mikrokatal veya nanokatal birimleri kullanılır [2].

Kofaktör ve enzim kompleksine haloenzim denir. Kofaktörsüz ve aktif olmayan apoprotein kısmına ise apoenzim denir. Gevşek bağlı koenzimler, enzimlere ligand bağlarıyla farklı kuvvetle tutunmuş olup diyaliz yoluyla çoğu kez enzimlerden uzaklaştırılabilirler. Fakat bazı koenzimler ise enzime sıkı bağlıdır ve bunlar diyalizle uzaklaştırılamazlar. Bunlara prostetik grup denir. Kofaktörü kendisinden uzaklaştırılan enzim aktivitesini kaybeder [1, 2, 4].

Enzimlerin reaksiyon hızları bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu etkenler sırasıyla

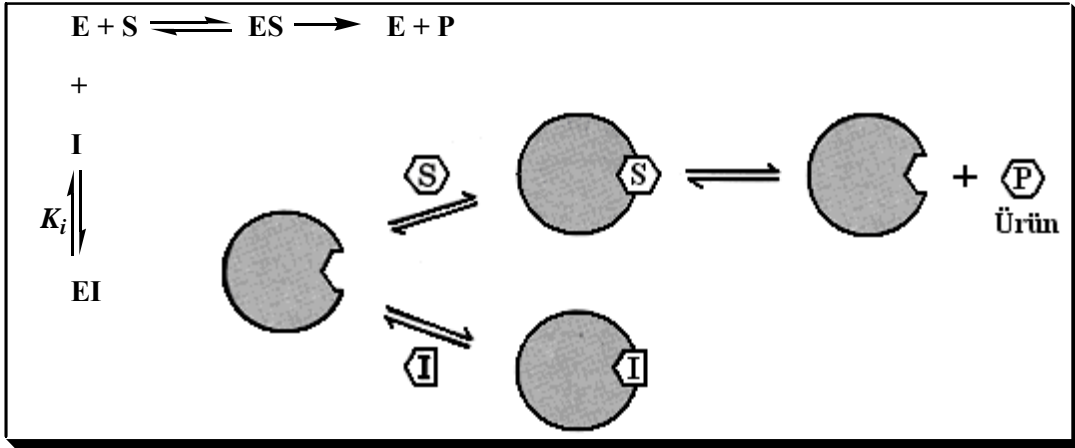
- Substrat konsantrasyonu
- Enzim konsantrasyonu
- pH
- Sıcaklık
- İyonik şiddet
- Kofaktör konsantrasyonu (varsa)
- İnhibitör ve aktivatör konsantrasyonu

Bu etkenler enzim üzerine değişik oranlarda etki etmektedirler.

Enzimler üzerinde en çok araştırma yapılan bir diğer önemli özellikte enzimlerin inhibisyonudur. Enzimlerin hem in vivo hem de in vitro olarak aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon ve bu olaya neden olan bileşiklere de inhibitör denir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler yada iyonlardır. Birçok ilaçlar ve toksik maddeler enzimler üzerinde inhibitör etkisi yapıp inhibisyona sebep olurlar. İnhibitörler hem enzim mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında çok önemli bir araç olmuştur [1].

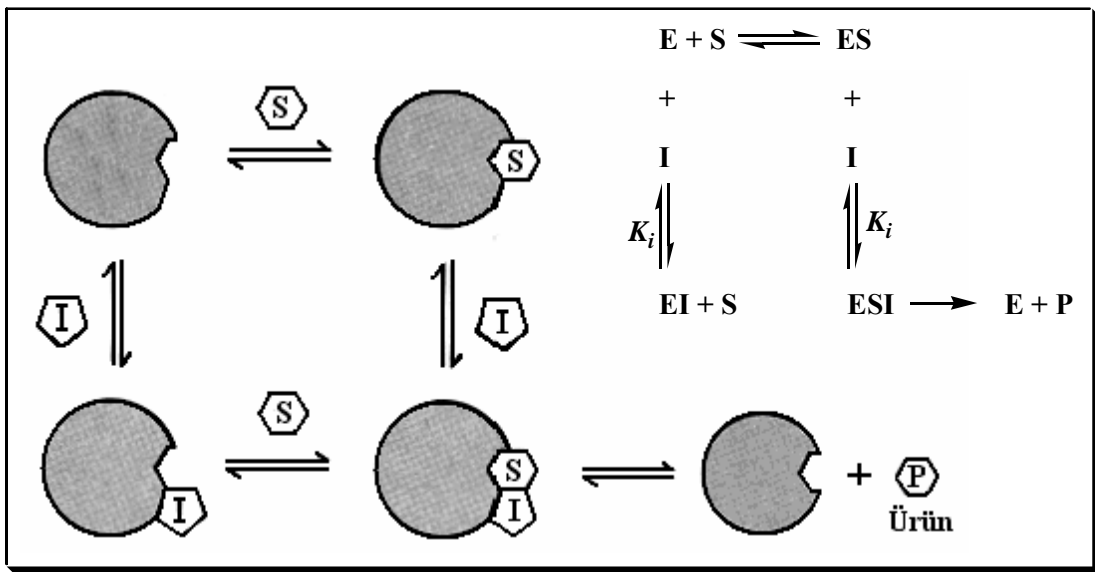
Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır. Dönüşümsüz inhibisyonda; inhibitörler, enzime ya kovalent olarak bağlanır yada zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda  $V_{max}$  (enzimatik reaksiyonlarda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır,  $K_m$  (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden sabit kalır. Bu inhibisyonun reaksiyon şeması aşağıdaki gibidir [1].





Şekil 1. 1. Dönüşümsüz inhibisyon mekanizması ve şematik şekli

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzimle inhibitör etkileşmesinde bir denge söz konusudur. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitör, yapı itibarı ile substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır ve substratın enzime bağlanması engellenmiş olur. Böylece substrat ile inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak için bir nevi yarışma haline girer. Fakat ortamdaki substrat konsantrasyonu artırılırsa inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmez ama  $K_m$  değeri artar. Yarışmalı inhibitörün reaksiyon şemasını aşağıdaki gibi gösterebiliriz<sup>[1]</sup>.

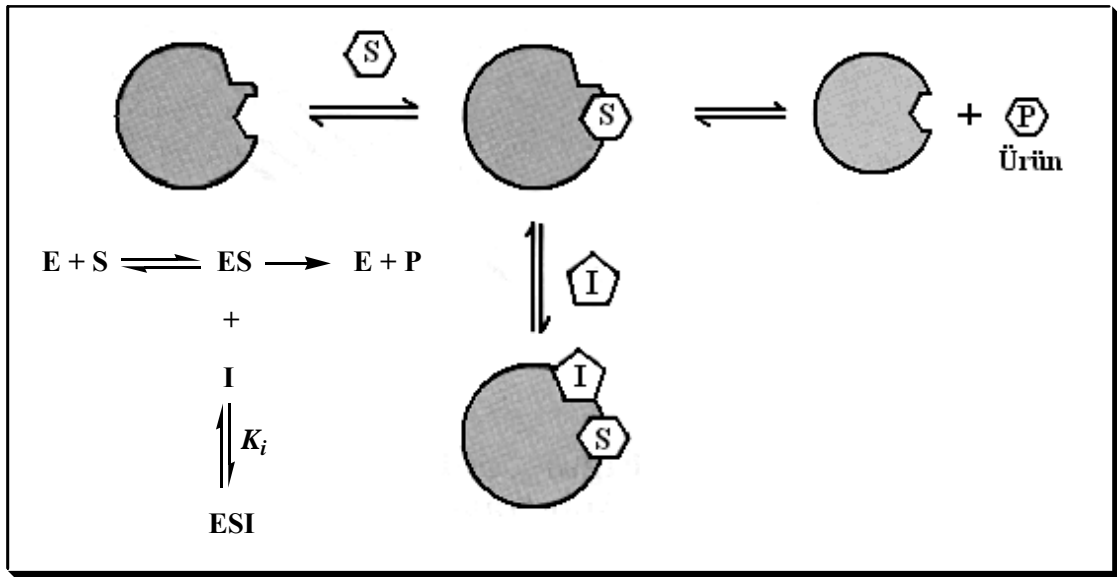


Şekil 1. 2. Yarışmalı inhibisyon mekanizması ve şematik şekli

Yine dönüşümlü inhibisyon tipi olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanma enzimin aynı bölgesinde değildir. Aynı yere bağlanma olmadığından substrat ile inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. İnhibitör etkisini enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Enzimin  $V_{max}$  değeri azalırken,  $K_m$  sabit kalır. Substrat konsantrasyonu artırıldığında inhibisyon etkisi kaldırılamaz. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlandığından enzimin EI ve ESI olmak üzere iki çeşit inaktif kompleksi oluşur.

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyonda, inhibitör serbest haldeki enzime değil sadece ES kompleksine bağlanır. Bu inhibisyon çeşidi birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir.

Bunun reaksiyon mekanizmasını şu şekilde gösterebiliriz.

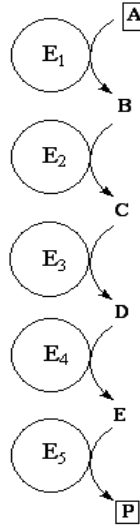


**Şekil 1. 3.** Yarı yarışmalı inhibisyon mekanizması ve şematik şekli

Yarı yarışmalı inhibisyonda ortamdan sürekli olarak ES kompleksi uzaklaştırıldığından  $K_m$  azalır ve aynı oranda ESI kompleksi ortamda sürekli var olacağından  $V_{max}$  da düşer<sup>[1]</sup>.

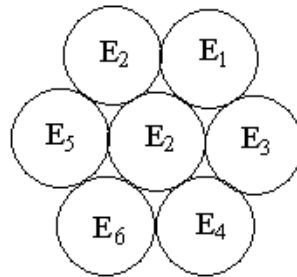
Sağlam bir hücrede bir arada çalışırlar ve seri halde bir çok reaksiyonu katalizlerler. Birinci enzimin ürünü daha sonrakinin substratı olur. İşte bu tip enzimlere de multienzim sistemleri denir. Bunlar üç tip moleküler organizasyona sahiptirler.

En basit tipteki multienzim sistemlerinde enzimler sitoplazma gibi bir sıvı içinde çözülmüş ve birbirlerinden ayrı halde bulunurlar. Küçük substrat molekülleri bir enzimden diğerine difüzyonla giderler. Örnek olarak glikoliz ve pentoz fosfat yolu enzimleri verilebilir. Bunu aşağıdaki şekilde şematik olarak gösterebiliriz (Şekil 1. 4.).



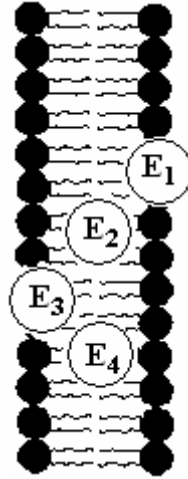
**Şekil 1. 4.** Çözülmüş ve birbirinden ayrı enzimleri olan sistemde, substrat ve ara bileşikler difüzyonla enzimleri bulur.

İkinci tip multienzim sistemlerinde enzimler, son derece organize olmuş ve birbirleriyle fiziksel anlamda birleşmiş enzim kompleksleri halinde, fonksiyonlarını beraberce yerine getirirler (Şekil 1. 5.). Kompleksten uzaklaşan enzim molekülleri aktivitelerini kaybederler. Substrat, kompleksten hiç ayrılmadan bir çok kademedен sonra ürüne dönüşür. Bu şekildeki bir multienzim sistemi biyolojik yönden çok avantajlıdır. Çünkü substrat difüzyon yolunda vakit geçirmeden daha kısa zamanda ürüne çevrilir <sup>[1]</sup>.



**Şekil 1. 5.** Enzim komplekslerinde substrat enzimlerden ayrılmadan ürüne dönüşür.

Üçüncü tip multienzim sistemlerinde enzimler, membranlar veya ribozomlar gibi yapılar üzerinde dizilmiş haldedir. Örnek olarak solunum zinciri ve protein sentezi enzimleri verilebilir. Birincisinde enzimler mitokondri iç membranında sıralanırken ikincisinde ribozomlar üzerinde yapışmış durumdadır.



**Şekil 1. 6.** Membrana bağlı bir enzim sistemi

Birçok multienzim sistemini reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler denir. Bu olaya ise feed-back inhibisyonu adı verilir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere “modülatör” denir.

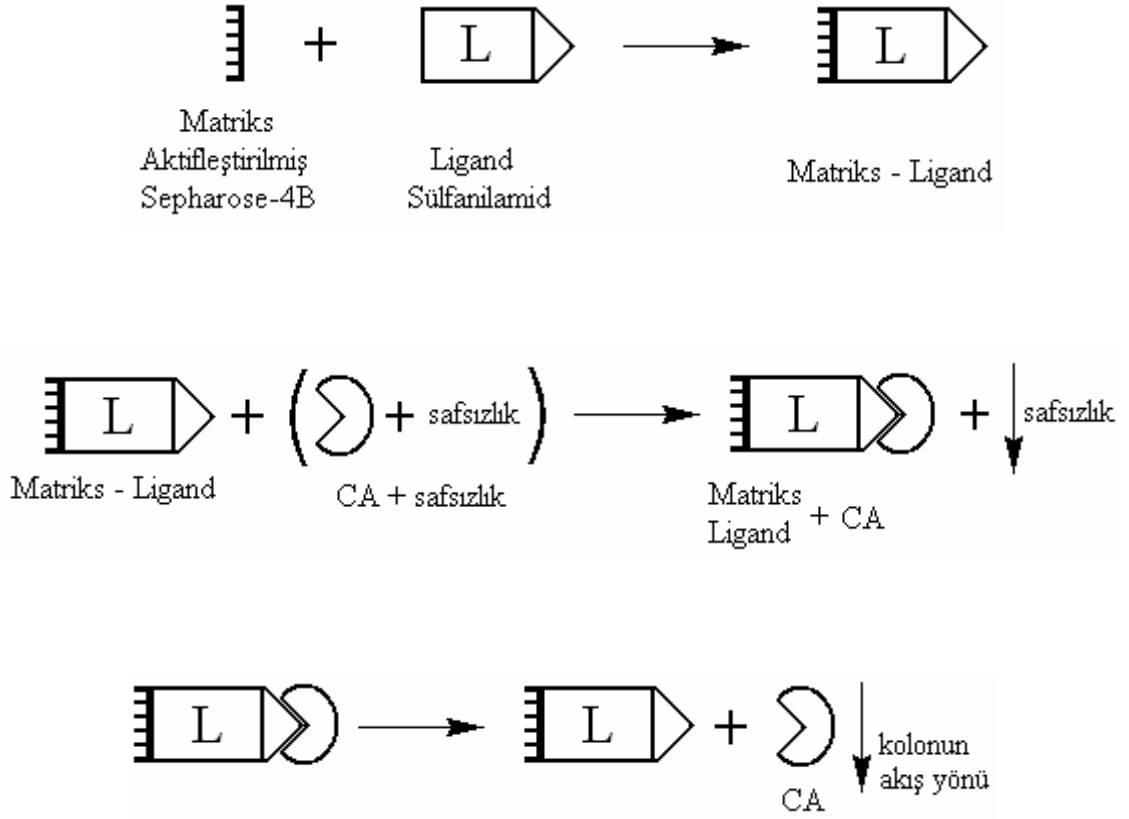
Daha öncede belirttiğimiz gibi enzimler protein yapısında olduklarından dolayı protein saflaştırma yöntemleri enzimler içinde uygulanabilir. Bir enzimin saf bir şekilde hücreden veya dokudan izolasyonu oldukça zordur. Buna rağmen birçok enzim saf olarak elde edilmiştir. 1000’in üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve 200’den fazlası ise kristal olarak elde edilmiştir. Globuler proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanılarak, saflaştırma işlemleri yapılmaktadır.

Globuler proteinlerin bu özelliklerini şöyle sıralayabiliriz:

- Molekül büyüklüğü
- Çözünürlük farkı esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Elektriksel yük esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Seçimli adsorbsiyon esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (Afinite kromatografisi).

Enzimlerin, bu saflaştırma yöntemlerinden en uygun, güvenilir ve doğru sonuç vereni; spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılma yöntemi olan afinite kromatografisi yöntemidir ve bu yöntemde göre karbonik anhidraz enzimini saflaştırıp karakterizasyon incelenmesi yapılabilmektedir. Bu yöntemde; ligand, enzime son derece spesifik olduğundan enzime kolayca bağlanır. Diğer enzim ve moleküller ortama tutunamadıklarından kolonun akış yönünde ilerleyerek uzaklaşırlar ve enzim kolonda kalır. Kolonda kalan enzim, uygun tamponlarla elue edilir.

Afinite kromatografisinin mekanizması aşağıdaki gibidir.

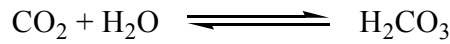


Şekil 1. 7. Enzimin Liganda bağlanması ve elue edilmesinin şematik gösterimi

## 2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ (E.C. 4.2.1.1)

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolizaz, karbonat dehidrataz E.C 4.2.1.1.) CO<sub>2</sub>'nin dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen ve Zn<sup>+2</sup> iyonu içeren bir enzimdir. Omurgalılarda, omurgasızlarda, yüksek bitkilerde, alglerde ve bazı bakterilerde bulunur [5].

Karbonik anhidraz enzimi, hücrede CO<sub>2</sub>'in hidrasyonu ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dehidrasyon reaksiyonunu katalizler.



Fakat H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> kendiliğinden



Bu enzim CO<sub>2</sub> taşınmasını sağlamanın yanında bazı dokulardaki H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in birikiminde rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza, tükrük bezleri, beyin, göz merceği, pankreas, prostat, sinir miyelin kılıfı, uterus ve endometrium dokularında bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca balıkların solungaçlarında, bazı böcek ve bakterilerde, bazı dokuların mitokondrilerinde, alglerde ve fotosentetik canlıların kloroplastlarında da bu enzimin varlığı ve rolleri tespit edilmiştir. Bu canlı hücrelerinde ve dokularında karbonik anhidraz enzimi, genellikle sitoplazmada çözülmüş halde, bazen de hücre zarına zayıfça bağlanmış olarak bulunur [6, 7, 8, 9, 11, 12, 13].

### 2. 1. Karbonik Anhidraz I

CA-I 30 kDa molekül ağırlıklı düşük aktiviteli sitoplazmik bir enzimdir [71]. Kapiler endotelyum, korneal endotelyum, göz lensi, plasenta ve memeli fetal membranlarında bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir [72]. CA-I geni insan genomik cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır [73].

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 eksprese olmuştur [74].

## 2. 2. Karbonik Anhidraz II

Fizyolojik koşullarda  $1,3-1,9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$  turnover sayısına sahip CA-II izoenzimi bilinen en verimli enzimlerden biridir [75]. İnsan CA-II geni, CA-I ve CA-III genleri gibi kromozom 8 üzerindedir [76][73]. 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 hidrasyonunda yer aldığı eritrositlerde bulunmuştur [77].

CA-II birçok sindirim sistemi organında eksprese olmuştur. Paratoid ve Mandibula altı bezleri seröz acinar hücrelerinde bulunur ve bikarbonat iyonlarını saliva içerisine serbest bıraktığı düşünülür. Özofagusun skuanöz (pullu) epitelinin CA-II ihtiva ettiği görülmekte ve özofagusta endojen bikarbonat üretimine katıldığı düşünülmektedir. Mide'de mide öz suyunun asiditesini düzenlediği gastrik mukozanın çepere ait ve yüzey epitel hücrelerinde eksprese olmuştur.

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

Karaciğer'de hepatositlerde ve safra kanallarının epitel hücrelerinde CA-II bulunduğu ispatlanmıştır. Bilinen en önemli fizyolojik fonksiyonu safra'nın alkalizasyonu için HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> üretmektir. Ayrıca safra konsantrasyonunda asidifikasyonunda görev aldığı safra kesesinin epitel hücrelerinde de eksprese olmuştur. Pankreas'ta CA-II, bikarbonatın pankreas öz suyuna salgılanmasındaki rolünün iyice yerleştiği epitel kanal hücrelerinde yer alır.

Karbonik anhidraz II eksikliği osteopetroz olarak bilinen büyüme bozukluğu, çiğneme sırasında dişlerin kapanmaması ve zihinsel gecikme ile birlikte böbrek tübül asidosiz ve beyinsel kireçlenmeyi de içeren birincil bir kusurudur. Şimdiye kadar bu tehlikeli fakat nispeten az rastlanan 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 semptom 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 idrarı asidikleştirme yeteneğinin geliştirilmesine sebep olan başarılı bir gen terapi deneyini belirtmiştir.

### **2. 3. Karbonik Anhidraz III**

CA-III iskelet kası tip 1 fiberlerinin sitoplazmasında bol miktardadır. Bunun yanında insan ve fare karaciğerinde de 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 aktivitelerine sahip olduğu gösterilmiştir.

Karaciğerde CA-III ekspresyonu androjenler tarafından düzenlenmektedir, ek olarak aşırı etanol tüketimi perivenöz hepatositlerde ekspresyona neden olmaktadır, CA-III'ün reaktif aldehit ürünlerinin eş zamanlı olarak indüklendiği yer olan hepatositleri 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 eksprese olmuştur. Ayrıca CA-III cDNA'sıyla transfekte edilen hücrelerin kontrol hücrelerine nazaran proliferasyon (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 sağladığını önermektedir.

### **2. 4. Karbonik Anhidraz IV**

CA-IV, tanımlanan ilk membrana bağlı izoenzimdir. 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 ilk olarak, immunohistokimyasal blotlama ve Northern blot teknikleri kullanılarak, Fleming tarafından incelenmiştir. Gastrik epitelyumda hiçbir sinyal gözlemlenmemiştir oysa kolonik epitelyumun apikal plazma membranında güçlü blotlanma tespit edilmiştir. Küçük bağırsağın epitel hücrelerinde çok zayıf bir pozitif reaksiyon gözlemlenmiştir. Gastrointestinal kanalın bütün segmentlerinde alt epitel kapiler endotelyum güçlü sinyal göstermiştir. Safra kesesi lümenal

plazma membranı ve safra kanalı epitelyumu CA-IV'e şiddetli bir immuno reaksiyon ifade etmiştir. Karaciğerde sadece biliyer epitel 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 epitel hücrelerinde bulunmuştur ve hepatositlerde eksprese olmamıştır.

### **2. 5. 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 siklüsünün ilk enzimi olan karbamoil fosfat sentaza ve piruvat karboksilazın piruvatı okzalasetata dönüştürdüğü glukoneogenezin ilk basamağı için bir bikarbonat iyonu sağlar. CA inhibitörlerinin ekvator domuzları ve fare karaciğerinde bu prosesleri yavaşlattığı gözlemlenmiştir. CA-VA'nın pankreas langerhan adacıklarında eksprese olduğu gösterilmiştir. CA inhibitörü asetazolamid glukoz uyarımlı insülin salgılanmasını inhibe etmiştir ve CA-VA'nın insülin salgılanmasında önemli rol oynadığı konusunda öneri sunmuştur.

### **2. 6. 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 eksprese olduğunu açığa vurmuştur. Ayrıca pankreas, böbrek ve salgı bezlerinde hassas RT-PCR tekniğiyle pozitif sinyal belirlenmiştir, karaciğerde gözlenmemiştir. Deneysel yaklaşımlarla kanıtlanmamasına rağmen mitokondriyal CA-VA ve CA-VB izoenzimlerinin farklı dağılımları, değişik fizyolojik roller oynadıklarını önermektedir.

### **2. 7. Karbonik Anhidraz VI**

CA-VI'e ilk olarak memelilerde tükrük bezleri ve tükrükte rastlanmıştır. Biyokimyasal ve immunokimyasal özellikleriyle sitozolik izoenzimlerden önemli derecede farklılık gösterir, 34-36 kDa molekül ağırlığında bir glikoproteindir. Polipeptid zinciri diğer birçok ekstraselüler

proteinler gibi disülfid bağlarıyla stabilize olur. İmmunohistokimyasal çalışmalar CA-VI'nın memeli kulak altı bezi ve mandibula altı bezlerinin seröz acinar ve demülin hücrelerinde eksprese olduğunu göstermiştir. CA-VI'nın başlangıçta tükürkte bikarbonat seviyelerinin sürekliliğinde uzmanlaşmış bir rol oynadığı düşünülüyordu. İlginç olarak Kivela, bu enzimin tükürkte 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 tükürkle mideye yutulduğunu göstermiştir. CA-VI'nın yüzey epitel hücrelerde eksprese olmamasına rağmen mide yüzey epitel hücrelerindeki mukus tabakası CA-VI içerir. Bu da tükürük orjininde gastrik CA-VI bulunmadığını gösterir. Tükürük CA-VI, karbondioksit ve su üreten nötralizasyon reaksiyonunu hızlandırarak pH gradientinin sürekliliğine katkıda bulunabilir. Bu manzara gözlemler tarafından desteklenmiştir ki CA-VI muhtemelen gastrik lümende sert ortamda aktivitesini sürdürmektedir. Özofajit, gastrik veya duodonal ülseri olan hastaların normal insanlara nazaran düşük tükürük CA-VI konsantrasyonlarına sahip oldukları belirlenmiştir.

Son yıllardaki bir çalışmada Fujikawa-Adachi, insan pankreasında CA-VI mRNA'sının ekspresyonunu Northern Blot ve immunohistokimyasal yöntemlerle pozitif bir sinyal alınamadığı halde RT-PCR ve RT-PCR-Southern Blot tekniklerini kullanarak ispatlamıştır. Pozitif sonuçlar; eğer pankreasta ekspresyon olmuşsa, sekretuar CA-VI'nın pankreas kanal sisteminde lüminal pH düzenlemede görev alabileceğini önermektedir.

## **2. 8. Karbonik Anhidraz VII**

İlk kez Montgomery tarafından aydınlatılmıştır, CA-VII izoenziminin CA-I, CA-II ve CA-III gibi sitoplazmik bir enzim olduğu aydınlatılmıştır. Rekombinant 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 tükürük bezlerinde, fare akciğerlerinde ve fare beyininde bu enzimin mRNA'sı belirlenmiştir.

## 2. 9. 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. CA-RP VIII, ilk olarak fare beyni cDNA kütüphanesinden tanımlanmıştır, karbondioksit hidrasyon aktivitesi yoktur. mRNA'sının ekspresyonu fare beyinde tespit edilmiştir. CA-VII'ninkine benzer amino asit sekansı (%98) ve ekspresyon modeline sahiptir. 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 pleksusta ekspresyonu gözlemlenmiştir.

## 2. 10. Karbonik Anhidraz 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 proteinin kodlayan cDNA ilk defa Pastorek tarafından klonlandı, translasyon olan protein 459 amino asit 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: Bir CA domaini ve proteoglikan benzeri domain. CA domaini aktif CA'larla yüksek amino asit kimliği gösterdiğinden MN proteini CA-IX olarak adlandırıldı.

Filogenetik 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 proteininin ekspresyonunu tanımladı. 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 ekspresyonu için servikal sitolojide umut verici bir biyomarker olarak düşünüldü. Bütün çalışmalar MN proteininin servikal neoplazi'de potansiyel bir biyomarker olduğu ve displastik ve kötü huylu hücreleri aydınlatmada kullanılabileceği sonucuna yönlendirdi.

### 2. 11. 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 eksprese olduğu belirlenmiştir.

### 2. 12. Karbonik Anhidraz XI

İlk olarak 36 kDa molekül ağırlıklı CA-RP XI'i koyun beyin cDNA kütüphanesinde açıklamıştır. 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, tükürük bezi ve spinal kort'da gözlenmiştir. İlginç olarak normal pankreasa göre pankreatik kanser hücresinde daha güçlü sinyal görülmüştür.

### 2. 13. 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 tip 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 aminoasitlik 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. Normal insan dokularındaki Northern Blot analizleri başlangıçta 4,5 kb'lık transkriptin sadece böbrek ve bağırsakta tespit edilmesini sağlamıştır, fakat sonra Ivanov insan kolon, böbrek ve prostatında CA-XII'nin yüksek mRNA ekspresyonunu ve pankreas, yumurtalık ve testislerde daha az ekspresyonunu ispatlamıştır. Ek olarak A 549 (akciğer adenokarsinoma) hücreleri bol ekspresyon gösterdiği halde beyin ve akciğer dokularında düşük ekspresyon bulmuşlardır. Türeci renal hücre kanseri (RCC) olan hastaların % 10'u tümörlü dokularının etrafındaki normal böbrek dokularına nazaran yüksek CA-XII ekspresyonu gösterdiğini belirtmiştir.

Son zamanlardaki bir çalışmada Kivela duedonum, boşbağırsak ve kıvrım bağırsak'ta negatif olduğu halde; kolon ve rektum yüzey epitel hücrelerinin basolateral plazma membranlarında şiddetli CA-XII immunoreaksiyonu gözlemlenmiştir. Karsinomaların %95'i dağınık immünoablota gösterdiği halde kolorektal adenomalardaki blotlama şiddeti displazi derecesiyle artmaktadır. Önemlidir ki: renal, akciğer ve kolorektal kanserlerde overekspresyon olan CA-XII, ikinci katalitik aktif membrana bağlı CA izoenzimidir. Asidik çevre kötü huylu hücrelerin yayılım potansiyelini artırdığından, Ivanov MN/CA-IX ve CA-XII'nin kanser hücrelerinin etrafındaki alanı asidikleştirerek tümör büyümesine ve yayılmasına katkıda bulunabileceğini önermişlerdir. Halmi RT-PCR metoduyla fare ve 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 ekspresyon olduğu görülmüştür. Kainik asit muamelesi CA-XII ekspresyonunu kortikal tabaka boyunca uyarmıştır. Bu membrana bitişik enzimin koroid pleksusta yüksek ekspresyonu, analog bir rolünün olduğunu önermiştir.

## **2. 14. Karbonik Anhidraz XIII**

CA-XIII tükrük bezleri, böbrek, ince bağırsak, kolon, uterus ve testisi içeren çeşitli dokularda ekspresyon 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 kümelendiği. Yapılan gen ekspresyon çalışmalarında insan dokularında; timus, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kolon ve testiste; farede: dalak, akciğer, böbrek, kalp, beyin, iskelet kası ve testislerde pozitif sinyal elde edilmiştir.

## **2. 15. Karbonik Anhidraz XIV**

İlk olarak fare böbreğinde; en çok ekspresyon 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 Northern Blot analizleri CA-XIV mRNA ekspresyonunun en bol böbrek ve kalpte, daha sonra iskelet kası, beyin ve karaciğer'de 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. Northern 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. 16. 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-IV ile çok benzer olduğu filogenetik çalışmalarla belirlenmiştir. Her iki enzimde COS-7 hücrelerinde eksprese olmuştur ve paralel deneylerde çalışılmıştır. Sonuçlar CA-XV'in CA-IV ile çeşitli özellikleri paylaştığını göstermiştir. CA-XV'in katalitik aktivitesi düşüktür. Sonuçlar CA-XV'in  $\alpha$ -CA gen familyasının bir üyesi olduğunu önermiştir.

Purkerson and Schwartz tavşan dokularında CA-IV, IX, XII ve XIV izoenzimlerinin ekspresyonunu incelemiştir. Sonuçlar: CA-IV mRNA'sı başlıca böbrek, kalp, akciğer, kolon ve safra kesesinde, CA-IX mRNA'sı mide, safra kesesi, duodenum ve boşbağırsakda, 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 olmamıştır. Maturasyon çalışmaları sonucunda; CA-IX mRNA ve proteininin ekspresyonu, sütten kesme ile önemli oranda arttığı ve gastrik  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPaz'ın alfa alt ünitesinin maturasyonuyla doğru orantılı olduğu görülmüştür. Bu da CA-IX ve gastrik  $H^+$  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  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  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 hücrelerde 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. 17. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Fizyolojik Fonksiyonları

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere izoenzim veya izozim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik pH değerinin farklı olması, her bir alt ünitenin ayrı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler<sup>[14]</sup>.

Hayvanlar aleminde karbonik anhidraz'ın 16 izoenzimi vardır. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI)<sup>[15]</sup>. CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izozimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir<sup>[17]</sup>.

İnsanda farklı izoenzimlerin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu dokular arasında; akciğer, böbrek, gastrik mukoza, göz lensi, tükrük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokular başta gelmektedir ve bunların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır<sup>[17]</sup>.

Genelde insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu izoenzimler ortaya çıkarılmıştır. HCA-I, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır. Eritrositlerde HCA-I izoenzimi yanında HCA-II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları ise, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan  $CO_2$ 'i,  $HCO_3^-$ 'a, akciğer pulmoner kapilerde ise  $HCO_3^-$ 'in  $CO_2$ 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum



olayında yer almasıdır. HCA-I izoenziminin turnover sayısı  $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu HCA-II kadar açık değildir. HCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır [18, 19, 20].

HCA-II izoenzimi karbonik anhidrazın en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  de  $10^6 \text{ s}^{-1}$  olarak bulunmuştur. İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan HCA-II izoenzimi miktarı  $2 \text{ mg/g}$  hemoglobun olarak hesaplanmıştır ve bu değer HCA-I'e kıyasla daha azdır.

Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, HCA-II ve HCA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan HCA-II izoenziminin önemi, glaucoma hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır [21]. Böbrek korteksinde ise membrana yapışık halde olan HCA-II izoenzimi ile  $\text{Na}^+$  ve  $\text{H}_2\text{O}$ 'nun geri emilimi sağlanmaktadır. HCA-II izoenzimi ile ilgili olarak CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da; kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da HCA-II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır [22].

İskelet kasında CA enzimi olarak HCA-III izoenzimi bulunmuş ve laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kırmızı kas dokusuna CA-III enzimi zayıf bağlı olup, doku kapilerine  $\text{CO}_2$ 'nin difuzyonunu kolaylaştırıcı bir görev yapmaktadır [23]. Düşük aktiviteli bir izoenzimdir ve bu enzimin turnover sayısı  $8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Kırmızı kas dokusuna zayıf bağlı olduğundan dolayı, büyük oranda çözünebilir bir proteindir. Aynı zamanda bu izoenzimden yağ dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. HCA-I ve HCA-II izoenzimleri gibi HCA-III de p-nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Diğer yandan HCA-III izoenziminin fosfataz aktivitesi de vardır [24].

HCA-IV ve HCA-VI ise, iki sinyal sekans izoenzimleri olup, sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasını sağlarlar. HCA-IV izoenzimi membrana bağlı bir enzimdir ve böbreklerin membranına bağlı olarak bulunduğu gibi, bazı epitel hücrelerin membranlarına bağlı olarak ve akciğerde kapiler hücrelerinin plazma yüzeylerine yerleşmiş olarak bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığını göstermiştir. Bu durum mitokondriyal CA enzimi olan HCA-IV'ün, 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 açıklanmaktadır [25].

HCA-V izoenzimi de, bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunur. Karbamoil fosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlamasından dolayı, üre devri ve glukoneogenez'de rol oynadığı öngörülmektedir. Bu izoenzimin ayrıca lipogenez olayında da etkili olduğu bildirilmiştir <sup>[26]</sup>. Tükrük bezinde CA enzimi olarak HCA-VI ve HCA-VII izoenzimi vardır. HCA-VI izoenzimi, tükrük bezlerinden salgılanan bir enzimdir. İnsan tükrüğünden izole edilmiş olup, tükrüğün pH dengesini sağladığına inanılmaktadır. HCA-VII izoenzimi ise, tükrükte bikarbonat salgılanması için katkıda bulunmaktadır <sup>[27]</sup>.

Yapılan çalışmalar sonucunda; insan CA-I, CA-IV ve CA-VII izoenzimlerinin gen ve amino asit dizilişlerinin oldukça birbirine benzer olduğu gözlenmiştir. Bu CA izoenzimlerinin fonksiyonlarına ilaveten, homolog proteinlerin amino asit dizilişlerinin pek çoğu tespit edilmiştir. Bunlardan ilki Vaccinia virüsünden elde edilen 32 kdal'luk bir membran proteininin N-terminal bölgesiyle ilgili olduğu belirlenmiştir. Bu, proteine bağlı bir enzimdir (CARP) <sup>[28]</sup>. CA-VIII enzimi de sıçan beyninden elde edilen bir cDNA kütüphanesinde keşfedilmiştir. İnsan cDNA homologlarının amino asit dizilişleri de tespit edilmiştir <sup>[29]</sup>.

CA enzimi balıkların solungaçlarında bulunmakta ve solunumun gerçekleşmesini sağlamak ve aynı zamanda salgı organlarında da büyük görev yapmaktadır. Bazı hayvanların böbreklerinde ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde bu enzimin değişik rolleri olduğu belirlenmiştir <sup>[30]</sup>.

## 2. 18. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO<sub>2</sub>'in hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diole hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir (Çizelge 2.1) <sup>[20]</sup>.

(1)	$\text{O}=\text{C}=\text{O}$	+	$\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{HCO}_3^-$	+	$\text{H}^+$
(2)	$\text{HN}=\text{C}=\text{NH}$	+	$\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{H}_2\text{NCONH}_2$		
(3)	$\text{RCHO}$	+	$\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{RCH(OH)}_2$		
(4)	$\text{RCOOAr}$	+	$\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{RCOOH}$	+	$\text{ArOH}$
(5)	$\text{RSO}_3\text{Ar}$	+	$\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{RSO}_3\text{H}$	+	$\text{ArOH}$
(6)	$\text{ArOPO}_3^{-2}$	+	$\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{HPO}_3^{-2}$	+	$\text{ArOH}$
(7)	$\text{ArF}$	+	$\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{HF}$	+	$\text{ArOH}$
(8)	$\text{PhCH}_2\text{OCOCl}$	+	$\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{PhCH}_2\text{OH}$	+	$\text{CO}_2 + \text{HCl}$
(9)	$\text{RSO}_2\text{Cl}$	+	$\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{RSO}_3\text{H}$	+	$\text{HCl}$

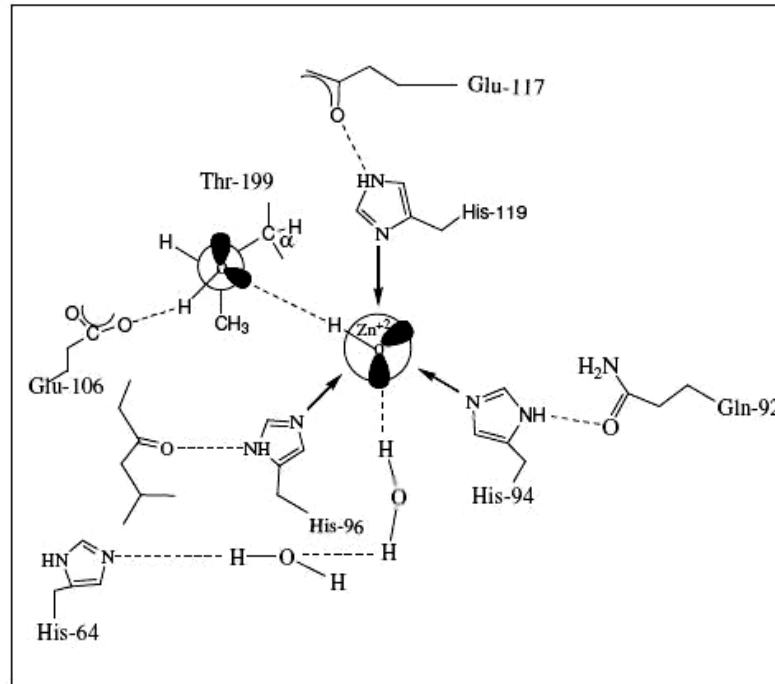
**Çizelge 2. 1.** Karbonik Anhidrazın enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

## 2. 19. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları

Karbonik anhidrazlar,  $\alpha$ -CA,  $\beta$ -CA ve  $\gamma$ -CA olmak üzere üç farklı familyada incelenmiştir. Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimler arasında önemli bir fark yoktur, aksine bunların hepsinde çinko iyonu vardır. Bundan dolayı bu familyaların hepsi, katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapıdadır [17].

Üç boyutlu yapılardan ilki  $\alpha$ -CA olup, insan CA-I ve CA-II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA-III, yassı formlu bir sıçan CA-V'i ve *E. coli* de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir. Bir yapı da Hindistan bufalosunun CA-II'sinde bulunmuştur. Aktif bölge oyuk şeklindedir ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk hemen hemen molekülün merkezine kadar uzanır. Çinko iyonu bu oyuğun alt kısmına bitişik durumdadır. Dört ligand gibi  $\text{H}_2\text{O}$  veya  $\text{OH}^-$  ile bir tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119'daki üç azot atomuyla koordine edilmiştir. Ligandlar protein formundaki bir indirekt ligandın hidrojen bağı ile diğer gruplara bağlanmasıyla oluşurlar (Şekil 2.1) [31].

Metal iyonlu ligandlar ve indirekt ligandların  $\alpha$ -CA amino asit dizilişleri sabittir. Bunun yanı sıra 17 amino asitli direkt ve çinko ligandlı indirekt ligandların bütün amino asit dizilişleri çok sıkı şekilde korunmaktadır. Bu rezidülerin bazıları protein yapısını stabilize ederken, bazıları da katalitik aktivite için önemlidir.



**Şekil 2. 1.** HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi

$\beta$ -CA'nın yapısı ise şimdiye kadar henüz açıklanamamıştır. Bilinmeyen yapının çapraz bağlanmaları ve bezelye yapraklarındaki mutantların incelenmesi sonucu, bu yapının belirlenen bir alt ünitesinin oktamer yapısında olduğunu ortaya çıkarmıştır. Mutasyonlar ve X-ray spektroskopisi absorpsiyon sonuçları; ıspanaktaki Zn (II) iyonu  $\alpha$ -CA'dakinin aksine bir Cys-His-Cys-H<sub>2</sub>O grubuyla koordine olmuş bir küre şeklinde olduğunu göstermektedir [32].

$\gamma$ -CA ise, son araştırmalarda *M. thermophila*'dan elde edilen bir yapı olarak ortaya çıkarılmıştır. Bu trimetrik molekül,  $\alpha$ -CA'daki katlanmalardan tamamen farklı katlanmalara sahip olup ve bu bölge kalıtsal bölgeyi ifade etmektedir. Her bir ünite, her dönüşteki üç kısa iplikçiğin sol el  $\beta$ -heliks yapısının 7 dönüşüyle oluşmaktadır. Bunun sonucunda birbirinin yanında üç tane yassı  $\beta$ -şeridi meydana gelir. Heliksin karşılıklı bölmeleri de üçgen yapısındadır.

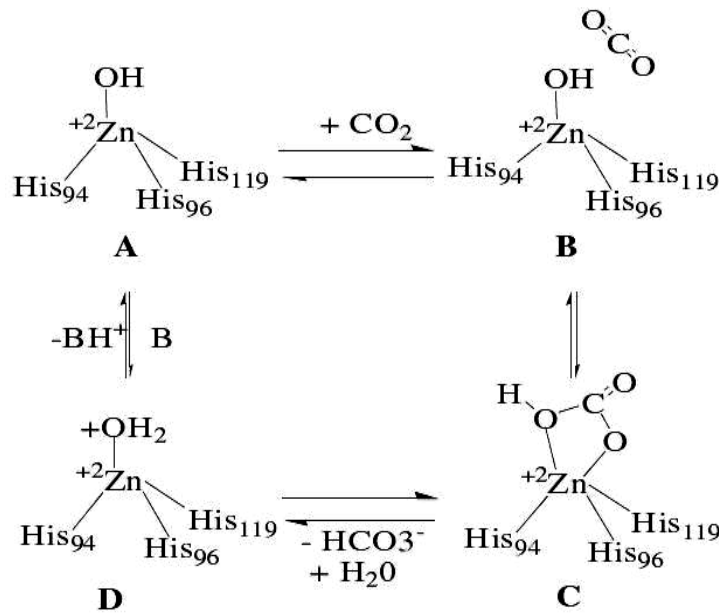
Çinko iyonları ise alt üniteler arasında bulunur ve bir alt üniteden His-81 ve His-122'ye ve bitişik bir alt birimden His-117 ile ligand oluşturmuştur. Varsayılan bir su molekülü bükülmeyi sağlayarak, tetrahedral yapının oluşumunu tamamlar [33].

## 2. 20. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son altmış 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<sup>[34]</sup>.

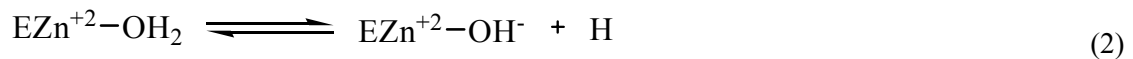
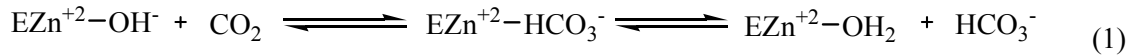
Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesindeki Zn (II) iyonunun reaksiyonların katalizi için büyük önemi vardır. X-ray kristalografisi çalışmaları metal iyonun, aktif bölümün 15 Å<sup>0</sup> derinliğindeki tabanında yerleştiğini göstermiştir. 3 histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) ve su molekülü/hidroksit 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<sup>[35]</sup>.

Enzimin aktif formu; hidroksitin çinkoya bağlı olduğu temel formdur (Şekil 2.2-A). Bu güçlü nükleofil, CO<sub>2</sub> molekülü ile etkileşir (Şekil 2.2-B). Bu da bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 2.2-C). 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 (Şekil 2.2-D). Katalitik olarak bu form inaktiftir. Tekrar temel A formunu oluşturmak için aktif bölgeden çevresine proton transferi olur<sup>[36]</sup>.



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

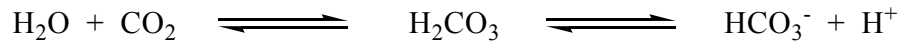
Tekrar bazik formu olan A formuna geçmek için, aktif bölgeden çevresine bir proton transferi gerçekleşir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesine His-64 gibi proton yakalayan aktif bölgeler ve ortadaki tampon bölgeler yardımcı olur. Bu proses aşağıdaki (1) ve (2) eşitliğinde şematik olarak gösterilmiştir.



Katalizdeki 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 <sup>[37]</sup>.

## 2. 21. 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 yolla tespit edilebilir. Fakat manometrik metodun reaksiyon pH'sının değişken olması, CO<sub>2</sub>'in suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır <sup>[38]</sup>.

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 sınırlı çözünmesi ve kullanılan indikatörün 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 <sup>[38, 39]</sup>.

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, enzimless CO<sub>2</sub>-hidratasyon süresi (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, enzimless reaksiyon süresini yarıya düşüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır [39].

Enzimin esteraz aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir [39, 40].

## 2. 22. 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 – bipiramidal yapıda olan metal koordinasyon halkasına katılan inhibitörlerdir. Sülfonamidlerin, CA-I izoenziminin Zn (II) iyonunun tetrahedral yapısına bağlanması çok önemlidir.

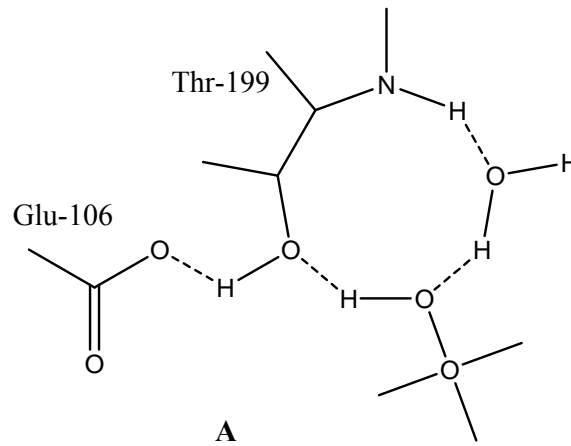
İnorganik anyon ve katyonlar bir de organik inhibitörler olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Çoğu tek değerli anyon CA enzimini inhibe eder. Fakat bu iyonların konsantrasyonları; (sığır CA-II, pH 7,55'de) birkaç mikromolar seviyesinde inhibisyon gösteren CN<sup>-</sup> iyonu ve 1 M'lik iyon konsantrasyonunda inhibisyon gösteren F<sup>-</sup> iyonunda olduğu gibi büyük değişiklik gösterir [41].

Sığır CA'sı ile yapılan esteraz aktivitesi deneylerinde; artan etkinliğe göre F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, CNO<sup>-</sup>, HS<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup> anyonlarının, p-nitro fenil asetatın hidrolizini inhibe ettikleri görülmüştür. Bu inhibitörlerinin karbonik anhidraz üzerindeki inhibisyon etkileri, düşük pH'larda artmakta ve aynı pH'da ise CA-II izoenzimine karşı daha fazla inhibisyon etkisi göstermektedir. Tek değerlikli anyonların bu özelliğinden yararlanılarak, afinite kromatografisi ile izoenzimleri ayırmak için elüsyon çözeltileri olarak kullanılmaktadır.

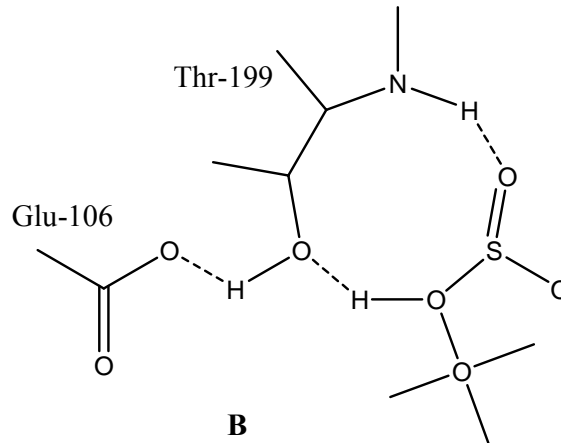
İnhibisyonun pH bağımlılığına ve CO<sub>2</sub>'nin yer değiştirdiği enzimin optik spektrum üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar, anyonik inhibitörlerin metal iyonuna bağlandığı ve katalitik CO<sub>2</sub> hidrasyonunda önemli bir rolü olan OH<sup>-</sup> iyonunun oluşumunu önlediği sonucuna varılmıştır. CO<sup>+2</sup> ile ilgili spektrumlar bazı anyonların sadece çinko bağı çözücü molekülü yerinden ederek tetrahedral koordinasyonu sağladığını, diğer anyonlarınsa pentahedral koordinasyon yapısı oluşturduğunu ileri sürmektedir [41].

Lund Üniversitesinde Profesör Anders Liljas'ın labarotuarında yapılan insan CA-II çalışmaları başta olmak üzere, son kristalografik çalışmalar, anyonik inhibitörlerin çeşitli bağ biçimlerine yeni bir ışık tutmuştur. Aktif bölgenin önemli bir özelliği çinkoya bağlı  $H_2O$  veya  $OH^-$  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 peptid  $NH$ 'na bağlanır. Bu hidrojen bağı etkileşimlerinin, inhibitörlerin bağı üzerinde belirleyici etkisi olduğunu göstermektedir <sup>[42]</sup>.

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 korurlar.  $HSO_3^-$  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 <sup>[43]</sup>.







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

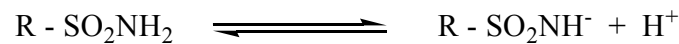
(Hidrojen bağları ve tek ligandan metale bağ, kesik çizgilerle gösterilmiştir. Elektrik yükleri atılmıştır.)

A: İnhibe olmayan enzim

B: Bisülfür

SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> gibi iki değerli anyonlar, CA'yı inhibe etmez veya çok zayıf inhibitörler gibi hareket ederler<sup>[44]</sup>. Esasen, pH = 6,0'da 2,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>'ın varlığında bile, insan CA-II izoenziminin kristal yapısında sülfat iyonunun bağlandığına dair hiçbir kanıt yoktur. Negatif yüklü iyon Glu-106'nın bağlanmasını önlemektedir.<sup>[45]</sup>

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.

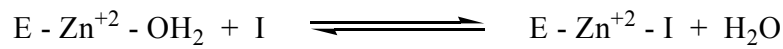


Sülfonamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfonamid ligand olarakta kullanılmaktadır<sup>[46, 47]</sup>.

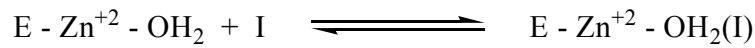
Sülfonamidler, süstitüe olmamış bir -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubu veya bir -SO<sub>2</sub>NH(OH) grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun azot atomu aracılığıyla ilk olarak; enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde, (R-SO<sub>2</sub>NH<sup>-</sup> veya R-SO<sub>2</sub>N-OH<sup>-</sup>) 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 [47, 48].

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 [35].

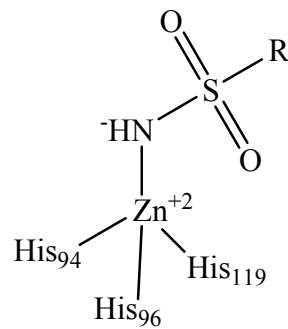


Tetrahedral yapı (süstitüsyon)



Trigonal – bipiramidal yapı (katılma)

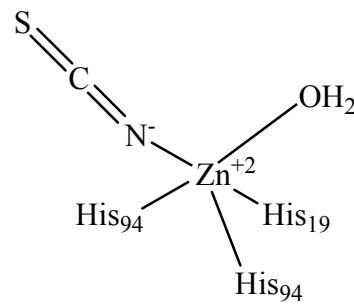
Zn (II) iyonuna koordine olmuş sülfonamid bileşiğinin N atomuyla, protonu ayrılmış Zn (II) iyonunun bir tetrahedral yapıda bağlanması sülfonamidler için çok önemlidir (Şekil 2.4.A). Anyonlar ise hem metal iyonunun tetrahedral geometrisinde, hem de tiyosiyanat örneğinde görüldüğü gibi trigonal – bipiramidal yapıda bağlanabilirler (Şekil 2.4. B) [37].



Tetrahedral yapı

(sülfonamid)

**A**



Trigonal-bipiramidal yapı

(tiyosiyanat)

**B**

**Şekil 2. 4.** Anyonik İnhibitörler ve sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyonu mekanizması

CA-I, CA-II ve CA-IV izoenzimlerine sülfonamid inhibitörlerinin bağlanması ile ilgili çok sayıda X-ray kristaloğrafi yapıları vardır <sup>[20]</sup>. Bu yapıların içinde protonu ayrılmış sülfonamidler; enzimin Zn (II) iyonuna koordine olmuştur ve onun NH grubu Glu-106'nın karboksil grubuna sırasıyla bir hidrojen bağı veren Thr-199'un  $\gamma$ -O atomu ile bir hidrojen bağı verir <sup>[49]</sup>.

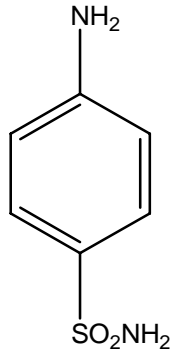
### 2. 23. Glaucoma Tedavisinde Kullanılan Sülfonamidler

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

Göz hastalıkları içinde körlüğe en fazla glaucoma neden olur (% 15-20) <sup>[50]</sup>. ABD' de körlerin %10-11 bu hastalıktan dolayı gözlerini kaybetmişlerdir <sup>[51]</sup>. Yine aynı ülkede beyazlarda en fazla körlük nedeni olan üçüncü hastalık olarak belirtilmiştir <sup>[52, 53]</sup>.

Glaucoma 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, diabet, yetersiz kan dolaşımı, yaş, yüksek göz tansiyonu, sistemik hipertansiyon ve kalıtım yolu ile aktarılması sıralanabilir. Fakat göz içi basıncın 22 mm Hg'dan daha düşük (yani normal) hastaların % 20'sinde de glaucoma hastalığına rastlanmaktadır. Glaucoma'yı en iyi tanımlayanlar, görme bölgesi ile ilgili baştaki sınırları karakterize eden optik nöropati uzmanlarıdır. Bu hastalığın tedavisi için sülfonamid bileşikleri kullanılmaktadır.

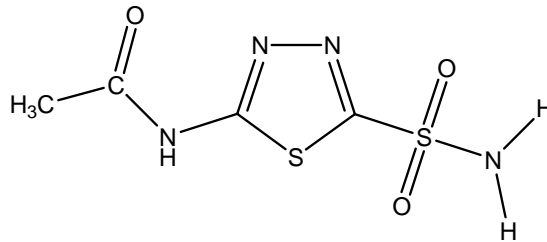
Göz içi basıncının kontrolünde çok önemli rolü olan karbonik anhidrazın inhibisyonu yolu ile glaucomalı hastaların göz içi basıncı düşürülmektedir. Karbonik anhidrazın güçlü inhibitörleri olan sülfonamidleri (**I**) 1940 yılında Mann ve Keilin sentezlemiştir.



(I)

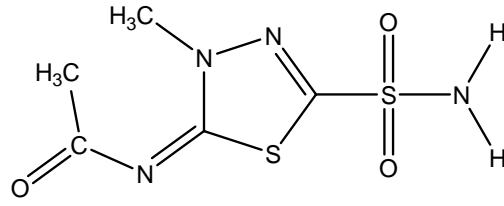
sülfanilamid

Glaucoma tedavisinde uzun zamandan beri 4 çeşit sistemik bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşikler asetazolamid (II), metazolamid (III), etokzolamid (IV) ve diklorfenamid (V) bileşikleridir <sup>[54][55]</sup>. Sistemik inhibitörler, yükselen göz içi basıncını (IOP) düşürmekte kullanılır. Bu inhibitörler, silyer epitel enzimlerini (CA-II ve CA-IV) inhibe etmesiyle,  $\text{HCO}_3^-$  oranında bir azalma sağlar. Bu yüzden humor aköz salgılanmasında % 25-30 azalma sağladığından, bu inhibitörler glaucoma hastalığı tedavisinde kullanılırlar. Fakat bu inhibisyon, gözden daha çok diğer dokulardaki CA enzimlerini etkilediğinden, oldukça büyük yan etkilere sahip olmaktadır <sup>[54, 55]</sup>.



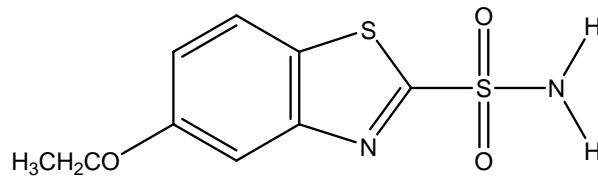
(II)

asetazolamid



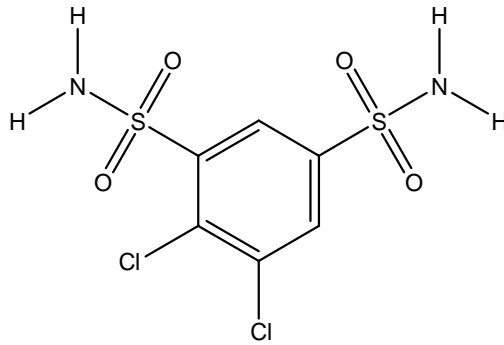
(III)

metazolamid



(IV)

etokzolamid

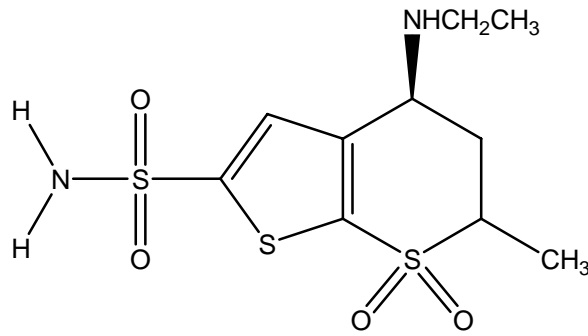


(V)

diklorfenamid

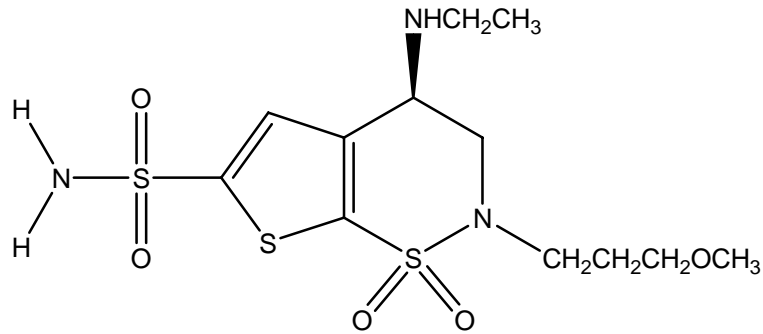
(II) ve (V) bileşikleri; mide, akciğer, böbrekler ve kandaki CA izoenzimlerini (CA-I, CA-II, CA-IV, CA-V ve CA-VII), gözdeki CA izoenzimlerinden daha çok inhibe etmektedir [54][55]. Bu da (II) ve (V) bileşiklerinin topikal olarak göze uygulanması gerektiğini ortaya koymaktadır. Fakat (II) ve (V) bileşikleri gibi klinikte kullanılan ilaçların hiçbiri, suda çözünürlük problemlerinden dolayı etkili konsantrasyonları sağlayamadığından henüz damla haline getirilememiş ve ağızdan alınmaktadır.

Yüksek IOP'yi düşürürken, CA izoenzimlerinin inhibe olmaması için, göze lokal olarak uygulanabilecek ilaçlara ihtiyaç duyulmuştur <sup>[56]</sup>. Bu sebepten dolayı ilk kez ilaç olarak kullanılmak üzere dorzolamid (VI) bileşiği sentezlenmiş ve 1995'te kliniklerde kullanılmıştır <sup>[57]</sup>. İkinci olarak da, yapı olarak dorzolamide benzeyen brinzolamid (VII) bileşiği sentezlenmiş ve 1999'da kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır. Böylece glaucoma 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 <sup>[55]</sup>.



(VI)

dorzolamid



(VII)

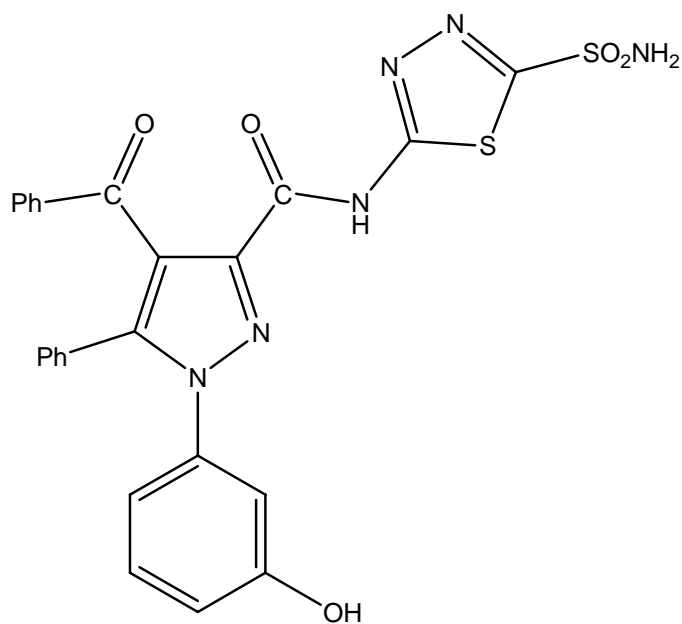
brinzolamid

Son yıllardaki çalışmalarda ise (VI) ve (VII) bileşiklerinin de; göz yanmaları, tahriş, yara oluşması ve dönüşümsüz tümör oluşumlarına sebep oldukları bulunmuştur <sup>[35, 58]</sup>.

## 2. 24. Hastalıkların Tedavisinde ve Teşhisinde CA İnhibitörlerinin Önemi

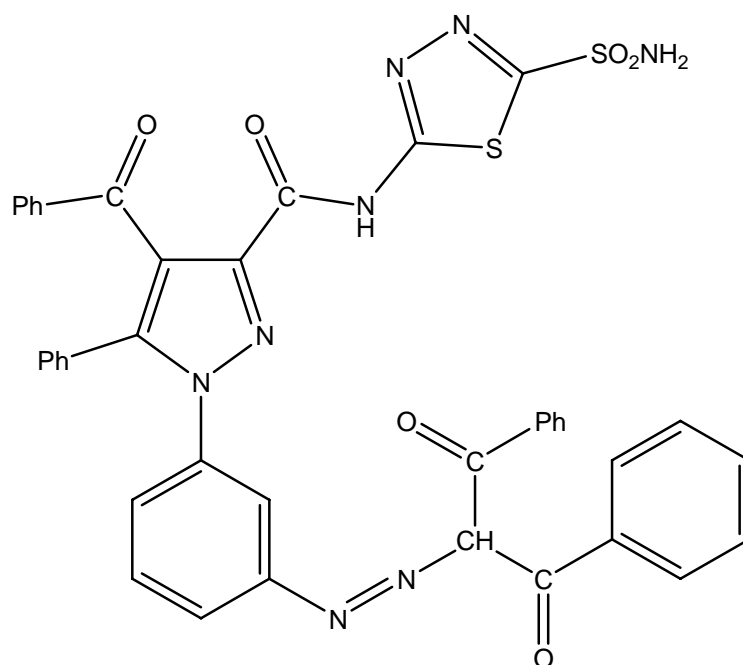
Glaucoma hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda; CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış ve bunun sonucunda CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glaucoma tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans belirlenmesinde (MRI) diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici ve antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır. Bu sebeple CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi çok büyük önem kazanmıştır <sup>[20]</sup>.

**Bu çalışmada;** karbonik anhidraz enziminin sığır eritrositlerinden saflaştırılması ve yeni sentezlenen bileşiklerin; glaucoma tedavisinde rolü olan HCA-II'ye özellikleri çok benzeyen sığır CA'sı 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)

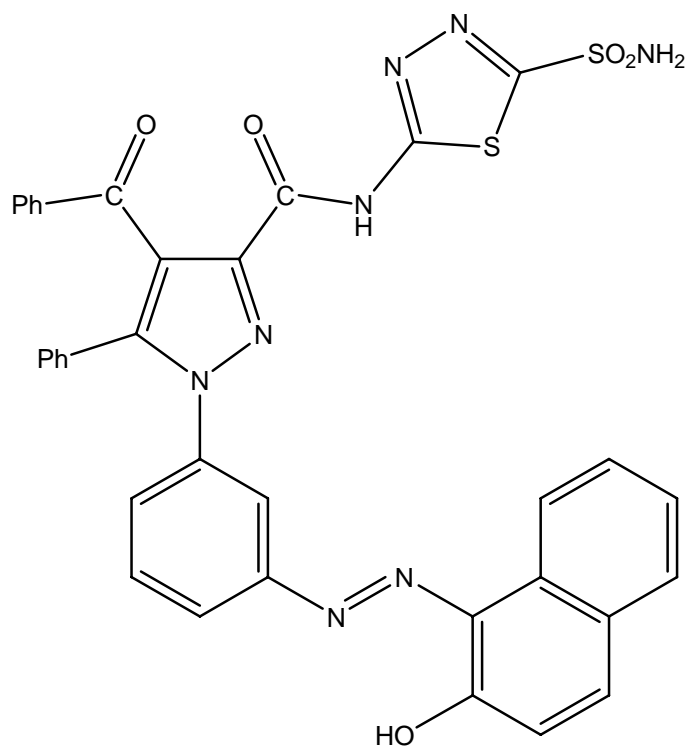
4-benzoyl-1-(3-hydroxyphenyl)-5-phenyl-N-(5-sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide



(2)

4-benzoyl-1-(3-((1,3-dioxo-1,3-diphenylpropan-2-yl)diazenyl)phenyl)-5-phenyl-N-(5-sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide





(3)

(E)-4-benzoyl-1-(3-((2-hydroxynaphthalen-1-yl)diazenyl)phenyl)-5-phenyl-N-(5-sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3. 1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan Sepharose-4B, *p*-nitrofenil asetat, N,N,N',N'tetra metil etilendiamin (TEMED), L-tirozin, dimetilsülfoksit (DMS), sodyum hidroksit, 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 brilliant blue G-250, coomassie brilliant blue R-250, ve karbondioksit gazı (CO<sub>2</sub>) piyasadan sağlanmıştır.

#### 3. 2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır. Kullanılan bu alet ve cihazlar Dumlupınar Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Laboratuvarında bulunmaktadır.

Spektrofotometre:	UV – 1700 Model Shimadzu Marka + AKS
Soğutmalı santrifüj:	Sigma K30
Santrifüj:	Nüve NF800
pH metre:	Schott Instruments / Lab 850
Perilstaltik Pompa:	Ismatec MS – 4/8 Reglo Digital, 4 Kanallı, 8 Tekerli
Magnetik Karıştırıcı:	Heidolph MR 3001
Karıştırıcı:	Vortex – Genie, Heidolph
Hassas Terazî:	Ohaus – Adventurer
Otomatik Pipetler:	Biohit Proline
Çalkalayıcı:	GFL
Kronometre:	Hanhard, Electronische Digital – Stoppuhr Germany
Güç Kaynağı:	Tunçmatik Newtech DSP 10 kVA

### 3.3. 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 çözülüp, 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 çözüldü. 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 2,04 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 izoproponal, % 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 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesine dayanmaktadır. Fraksiyonlar kuvartz küvetlere alınarak, absorbandsları spektrofotometrede köre (ilgili tampon çözeltiye) karşı okundu.

##### 3. 4. 1. 2. Coomassie Blue Yöntemiyle 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 <sup>[59]</sup>.

Tayin işlemlerinde; 1 mL’inde 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. Kör 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 (Şekil 4.1).

#### 3. 4. 2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

##### 3. 4. 2. 1. CO<sub>2</sub> – Hidrataz Aktivitesi Tayini

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması sırasında, aktivite ölçümleri Wilbur Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO<sub>2</sub>’in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> sebebiyle pH’nın 8,2’den 6,3’e düşmesi için geçen süre 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 <sup>[60, 61]</sup>.

Enzim birimi ise; enzimsiz CO<sub>2</sub> hidratasyon süresi (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süresi (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın, (t<sub>c</sub>)'ye bölünmesi ile belirlendi.

Deneyde reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu (pH =8,2), 0,1 mL brom timol mavisi çözeltisi 0,5 mL saf su, 0,1 mL enzim çözeltisinden ilave edildi. Ve daha sonra da 2,5 mL doymun CO<sub>2</sub> çözeltileri konuldu. Aşağıdaki tabloda uygulanan prosedür açıkça gösterilmiştir.

<b>Kullanılan Maddeler</b>	<b>Kontrol Tüpü (Kör)</b> <b>(µL)</b>	<b>Numune Tüpü</b> <b>(µL)</b>
0,025 M Veronal Tamponu (pH = 8,2)	1000	1000
% 0,04'lük Brom – Timol Mavisi	100	100
Saf Su	600	500
Enzim Çözeltisi	-	100
Substrat (Doymun CO <sub>2</sub> Çözeltisi)	2500	2500
Toplam Hacim	4200	4200

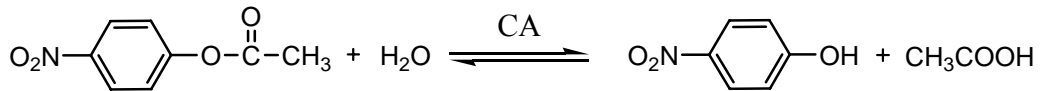
Daha sonra bir kronometre ile CO<sub>2</sub> çözeltisi konulduğu andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH= 6,3) için geçen süre belirlendi (t<sub>c</sub>). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine saf su konularak yapıldı (t<sub>0</sub>). İnhibitörlü çalışmalarda ise; suyun hacmi, kullanılan inhibitör hacmi, kadar azaltılarak yerine inhibitör eklendi. Böylece aktivite ölçüm ortamının hacmi sabit tutulmuş oldu (4,0 mL). Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidrasyonu süresini, yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Yani;

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

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

### 3. 4. 2. 2. Esteraz Aktivitesi Tayini

İnhibitörlerin BCA 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 absorpsiyon 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 absorpsiyon göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H<sup>+</sup> iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir <sup>[62][63]</sup>. Bu dalga boyundaki *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 absorpsiyon okundu. Kısaca aşağıdaki prosedür uygulandı.

<b>Kullanılan Maddeler</b>	<b>Kontrol Tüpü (Kör)</b> <b>(µL)</b>	<b>Numune Tüpü</b> <b>(µL)</b>
1 M Tris – SO <sub>4</sub> Tamponu (pH = 7,4)	1300	1300
<i>p</i> -nitrofenilasetat	1000	1000
Saf Su	700	600
Enzim Çözeltisi	-	100
Toplam Hacim	3000	3000

Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak, karışımın 3 dakika sonraki absorpsiyon ile sifıra 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. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi <sup>[62]</sup>. Enzim çözeltisinin tamponlanması 0,05 M Tris – SO<sub>4</sub> (pH= 7,4) çözeltisiyle yapıldı <sup>[64]</sup>.

### **3. 4. 3. Sığır Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması**

#### **3. 4. 3. 1. Sepharose – 4B Matriksi Üzerinde Afinite Jelinin Hazırlanması**

Afinite jeli, Sepharose – 4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose – 4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak, tirozine kenetlendi (Şekil 4.1). 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 <sup>[64]</sup>.

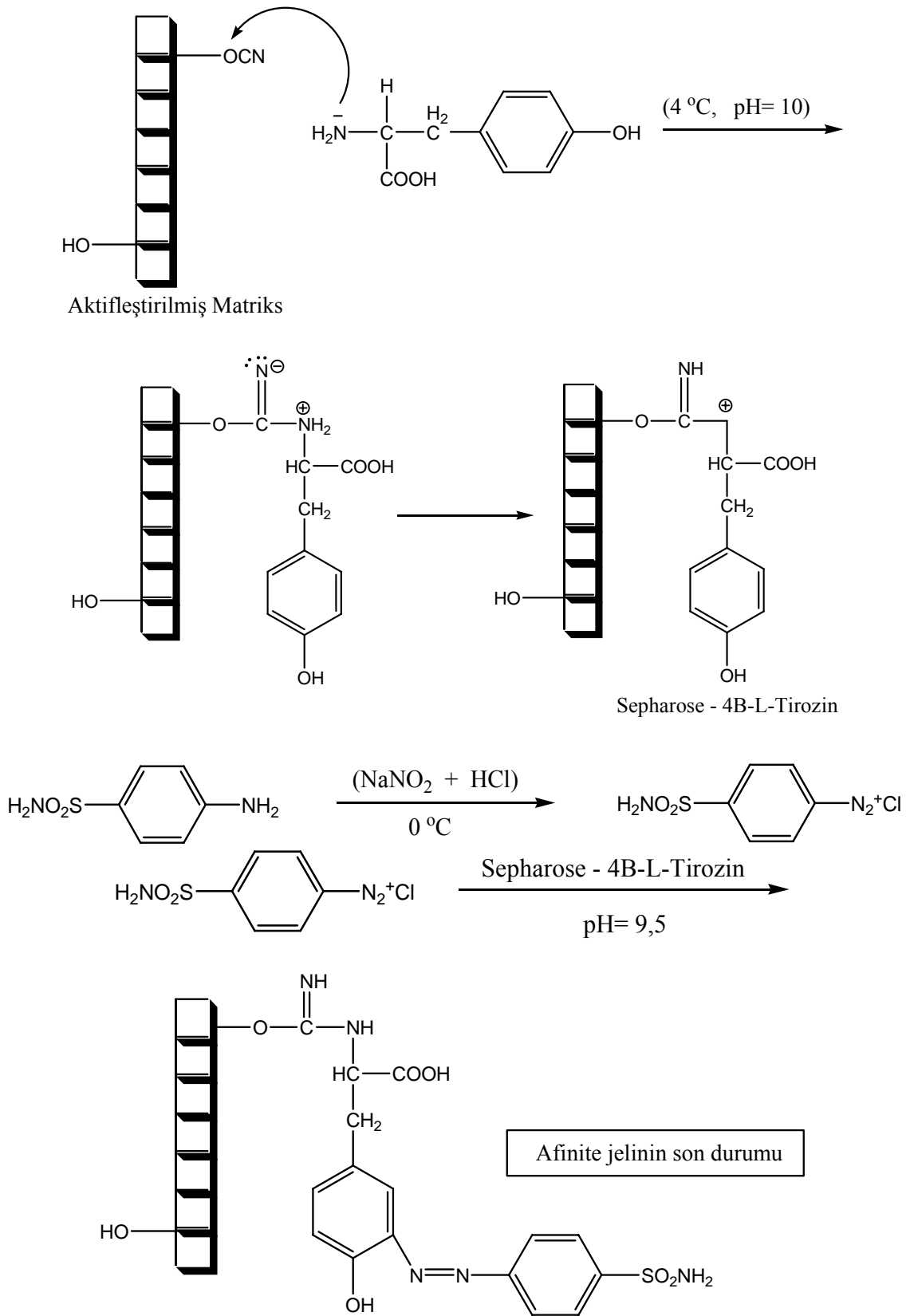
#### **3. 4. 3. 2. Sepharose – 4B'nin Aktifleştirilmesi ve Tirozin Takılması**

7,5 gr CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, saf su ile iyice şişirildi ve saf su dekante edildi. Daha sonra pH'sı 10 olan 250 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponuna 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 içerisine alındı <sup>[65][66]</sup>. Reaksiyon basamakları aşağıda gösterilecektir.

#### **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 dakika içerisinde damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra 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 <sup>[67][68]</sup>. Reaksiyonun açık formülleri aşağıda gösterilmiştir:





Şekil 3. 1. Afinite jelinin hazırlanması

### **3. 4. 3. 4. SDS – Poliakrilamid Jel Elektrofrezile Enzimlerin Saflıgının Kontrolü**

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

Bunun için elektrofrez 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 çözünmüş daha sonra 40-50 °C'ye kadar 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 elektrofrez tankına yerleştirildi. Oluşan kuyular işaretlenerek; jelin üstü önce saf su, daha sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektrofrez 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 akrilamid % 0,8'lik bisakrilamid'ten 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. 4. 4. Sığır Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin (BCA) Saflaştırılması**

#### **3. 4. 4. 1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizat Eldesi**

Deneyle için sığır kanı Kütahya Belediyesi mezbahasından kesim esnasında alındı. Antikoagülant olarak kullanılan asit – sitrat dekstrozu (ACD) çözeltisi 22 g sodyum sitrat dihidrat, 8 g sitrik asit, 24 g dekstrozun bir miktar destile suda çözülüp bir litreye tamamlanmasıyla elde edildi. 100 mL kana bu çözeltiden 15 mL ilave edilerek hem pıhtılaşma önlenmiş hem de eritrositler için iyi bir beslenme ortamı sağlanmış oldu. Kanlar alındıktan sonra 4 °C'de muhafaza edildi ve en çok iki gün içerisinde kullanıldı [69].

Eritrositleri ayırmak için kan 10 mL'lik tüplere konuldu ve 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde ayrıldı. Sonra altta kalan eritrositler % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile berrak çözelti elde edilinceye kadar yıkandı ve üst kısımlar atıldı. Bu işlemler sonucunda 500 mL kandan 150 – 200 mL eritrosit elde edildi. Eritrositler, hacimlerinin 1,5 katı 0 °C'deki saf su ile hemoliz edildi [70]. Hemoliz edilen tüpler bir araya getirilip hücre zarlarından ayırmak için hemolizat, 4 °C'de 20.000 rpm'de 45 dakika süreyle santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin dibine çöken hücre zarları atılıp üstteki hemolizat dikkatli bir şekilde alındı. Hücre zarlarından ayrılan hemolizatın pH'sı katı Tris ile 8,5'e getirildi. Böylece hemolizat kolona tatbik edilecek duruma geldi.

#### **3. 4. 4. 2. Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu**

Hazırlanan afinite jeli 1,5 cm<sup>2</sup>x50 cm boyutunda bir kolona paketlenerek 25 mM Tris – HCl / 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH= 8,7) çözeltisi ile dengelendi. Yukarıda hazırlanan hemolizat kolona tatbik edilerek, yine 25 mM Tris – HCl / 25 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH= 8,7) tamponu ile yıkandı. Böylece karbonik anhidrazın büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Daha sonra 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH= 5,6) elüsyon

çözeltisi ile 5'er mL halinde tüplere alındı. Peristaltik pompa yardımıyla kolonun akış hızı 50 mL / saat olarak ayarlandı. Eluatlarda 280 nm'de protein tayini ve CO<sub>2</sub> – hidrataz aktivitesi tayini yapıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek dondurulmak suretiyle derin dondurucuda saklandı.

### **3. 5. Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi**

#### **3. 5. 1. Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit BCA Enziminin Hidrataz Aktiviteleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak İncelenmesi**

Sığır eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen (1), (2), (3) no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glaucoma hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için sığır kanından elde edilen BCA enzimi 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 Eritrosit BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisinin *in vitro* Olarak İncelenmesi**

Sığır eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen (1), (2), (3) no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glaucoma 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<sup>[62]</sup>.

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

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

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

$$p\text{-nitrofenol miktarı} = \frac{A(OD)/5}{3} \times 3 = A(OD) / 5 \text{ (}\mu\text{mol/dakika) bulunur.}$$

### 3. 5. 3. Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin $K_i$ Sabitleriyle Bulunması

$K_i$  değerlerini bulmak için; sıgır eritrosit CA enziminin 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;

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

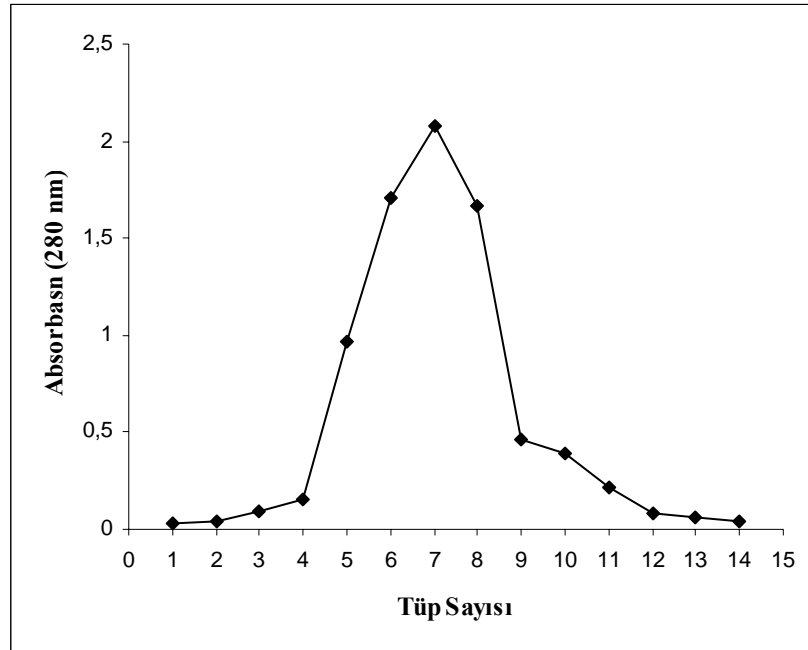
değeri,  $V$  (hız) değeri olarak alındı. Lineweaver – Burk grafiklerini çizmek için bu değerler  $1/V$  değerlerine çevrildi. Aynı zamanda beş farklı substrat – konsantrasyonları  $[S]$ , grafikte kullanmak için  $1/[S]$  değerlerine dönüştürüldü. Bu değerlerden faydalanılarak her bir inhibitörün, sıgır eritrosit BCA enzimi 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.

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

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

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

Sığır kanından elde edilen hemolizatlar kolona direk olarak tatbik edildi. Jelin kolona yerleştirilmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işleminden sonra BCA; 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/ 0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH= 5,6) tamponuyla elüe edildi. Elüatlar 5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, her tüpteki numune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesine bakıldı (Şekil 4.1) .



**Şekil 4. 1.** Sığır eritrositlerinden elde edilen BCA enziminin elüsyonunda; 280 nm'de elde edilen absorbans değerleri

Sığırdan saflaştırılan BCA enzimi için Coomassie Blue yöntemiyle protein tayini ve esteraz 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.

Sığır kanından hazırlanan hemolizat için protein miktarı 107,4 mg/mL ve hidrataz aktivitesi 2400 EU/mL bulundu ve buradan spesifik aktivite,

$$(SA) = 2400/107,4 = 22,34 \text{ olarak bulundu.}$$

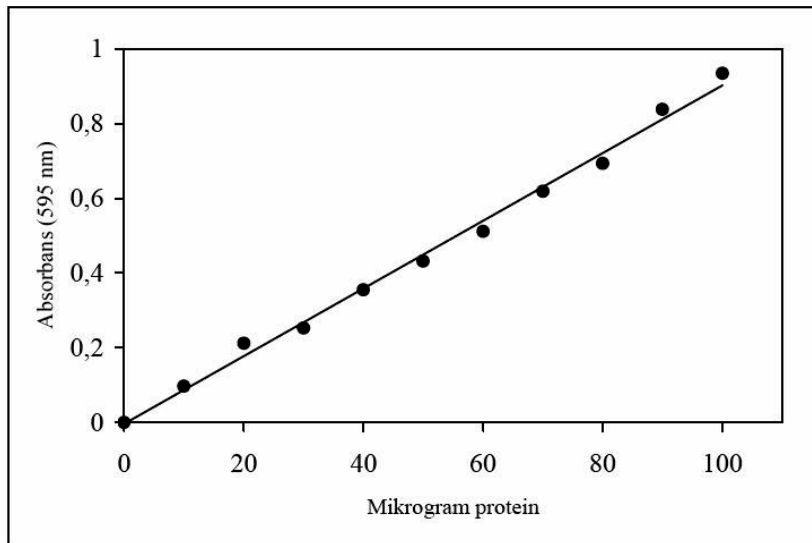
BCA için 4-6 no'lu tüplerdeki eluatlar birleştirilerek coomassie blue yöntemiyle protein tayini ve hidrataz aktivitesi deneyleri yapıldı. Saflaştırılan enzim çözeltisi için mL'deki protein miktarı 0,74 mg ve mL'deki enzim ünitesi 166,78 EU olarak bulundu. Saf enzimlerin aktivite ölçümünde 100 kat seyreltme yapıldığından aktivitesi BCA için 16678 EU/mL olarak bulundu. Buna göre;

$$\text{BCA için spesifik aktivite (SA)} = 16678/0,74 = 22539$$

Bu değerlere göre, hemolizatın doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucu;

$$\text{BCA } 22539/22,34 = 1009 \text{ kat saflaştırılmış oldu.}$$

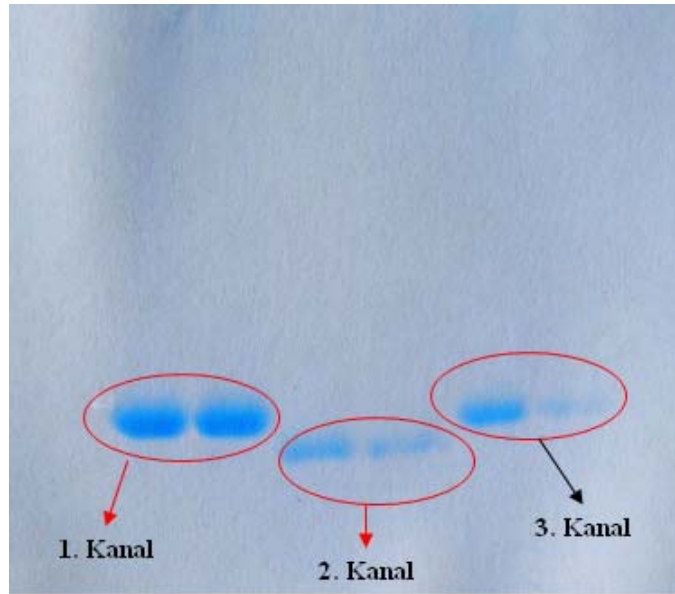
Kantitatif protein tayini Coomassie Blue yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem için önce standart bir eğri hazırlandı. Hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerlerinden faydalanarak, ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein miktarları bulundu (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Coomassie-Blue yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik.

## 4. 2. Sığır Eritrositlerinden Elde Edilen BCA Enziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları

Afinite kolonundan saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için 3.4, 3.2’de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektroforezine, sığır kanından saflaştırılan enzim tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3).



**Şekil 4. 3.** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ftğ. (1. Kanal: HCA-I, 2. Kanal: BCA, 3. Kanal: HCA-II)

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

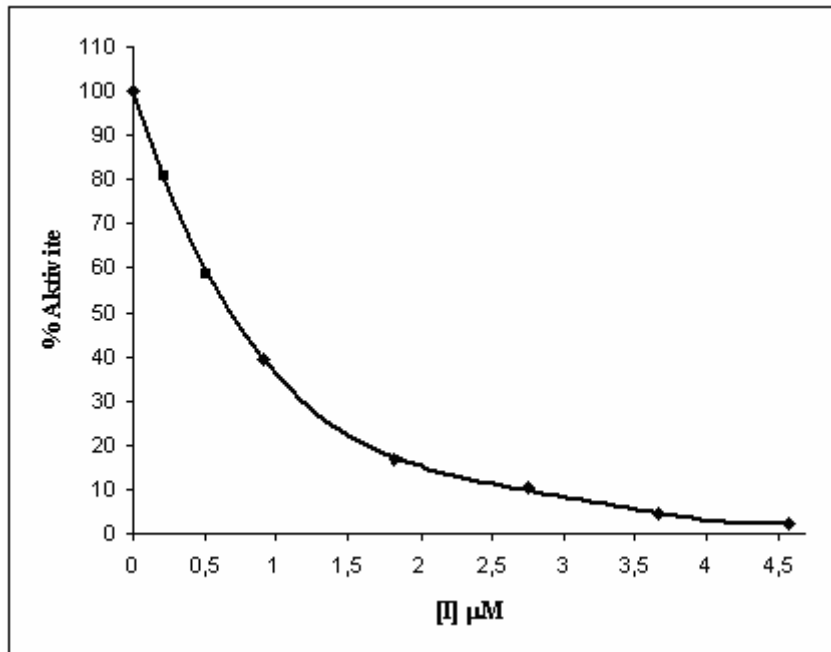
### 4. 3. 1. Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enziminin Hidrataz Aktiviteleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin in vitro Olarak İncelenmesi

Sığır eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen (1), (2), (3) no’lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glaucoma hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1’lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için sığır kanından elde edilen BCA enzimi 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 4. 1.** BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla **(1)** bileşiminin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

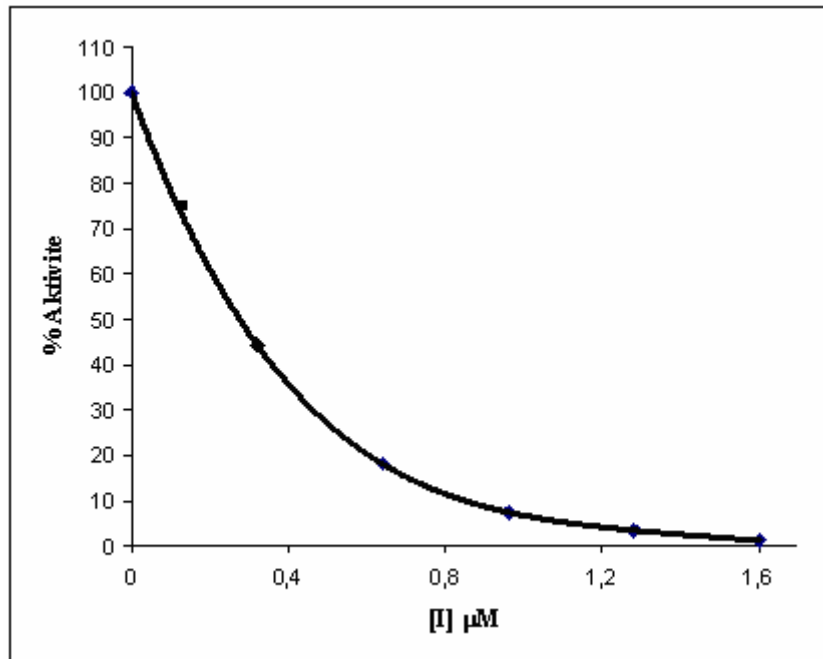
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	BromTimol Mavisi (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile Su (µL)	Substrat CO <sub>2</sub> Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] M
<b>(1)</b>	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	20	480	2,5	40	$0,9 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	40	460	2,5	16	$1,8 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	60	440	2,5	10	$2,7 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	80	420	2,5	4,4	$3,6 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	100	400	2,5	2,5	$4,5 \cdot 10^{-6}$



**Şekil 4. 4.** BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla **(1)** bileşiminin etkisi

**Çizelge 4. 2.** BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla **(2)** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

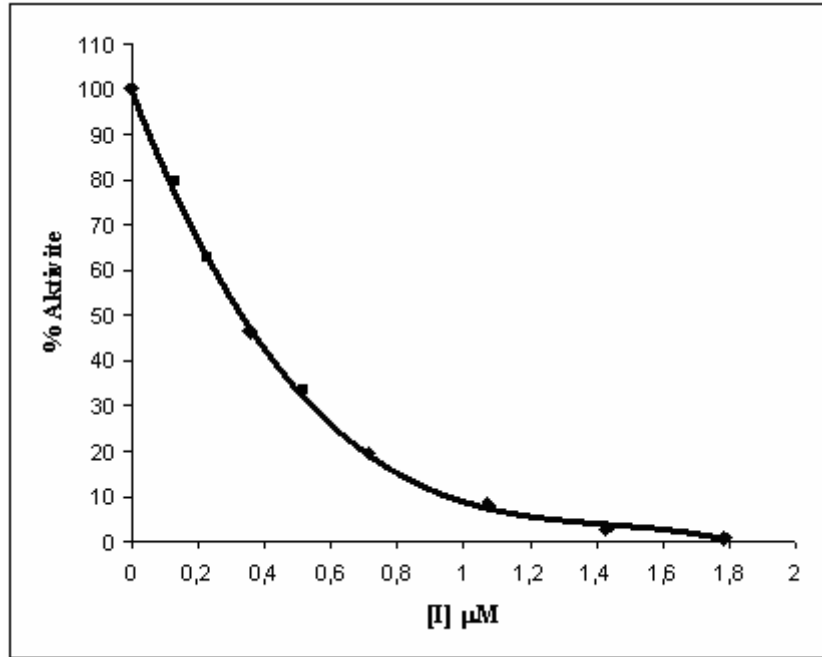
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	BromTimol Mavisi (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile Su (µL)	Substrat CO <sub>2</sub> Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] M
<b>(2)</b>	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	10	490	2,5	44,4	$0,3 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	20	480	2,5	18,1	$0,7 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	30	470	2,5	7,4	$1,2 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	40	460	2,5	3,5	$1,5 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	50	450	2,5	1,1	$1,9 \cdot 10^{-6}$



**Şekil 4. 5.** BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla **(2)** bileşiğinin etkisi

**Çizelge 4. 3.** BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (3) bileşğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	BromTimol Mavisi (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile Su (µL)	Substrat CO <sub>2</sub> Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] M
(3)	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	10	490	2,5	46,42	$0,3 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	20	480	2,5	19,64	$0,7 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	30	470	2,5	8,1	$1,2 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	40	460	2,5	2,9	$1,5 \cdot 10^{-6}$
	1	100	100	50	450	2,5	0,89	$1,9 \cdot 10^{-6}$



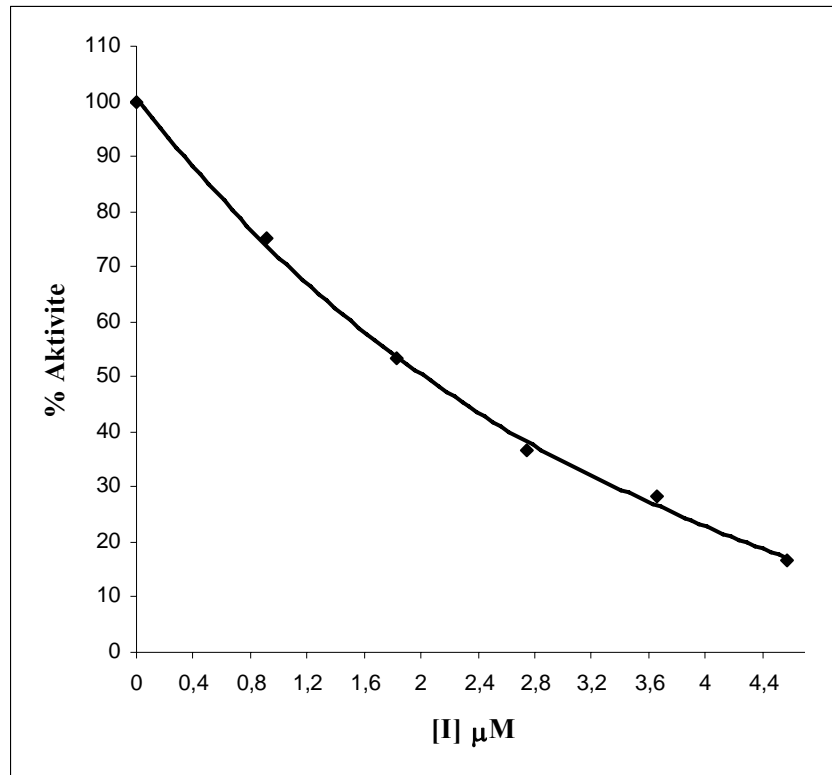
**Şekil 4. 6.** BCA enzimi üzerine hidrataz aktivitesi yoluyla (3) bileşğinin etkisi

#### **4. 3. 2. Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisinin in vitro Olarak İncelenmesi**

BCA'nın esteraz aktivitesi üzerinde (1), (2), (3) bileşiklerinin inhibisyon etkileri; glaucoma hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmiştir. Bu amaçla sığır kanından elde edilen BCA 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 4. 4.** BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla **(1)** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

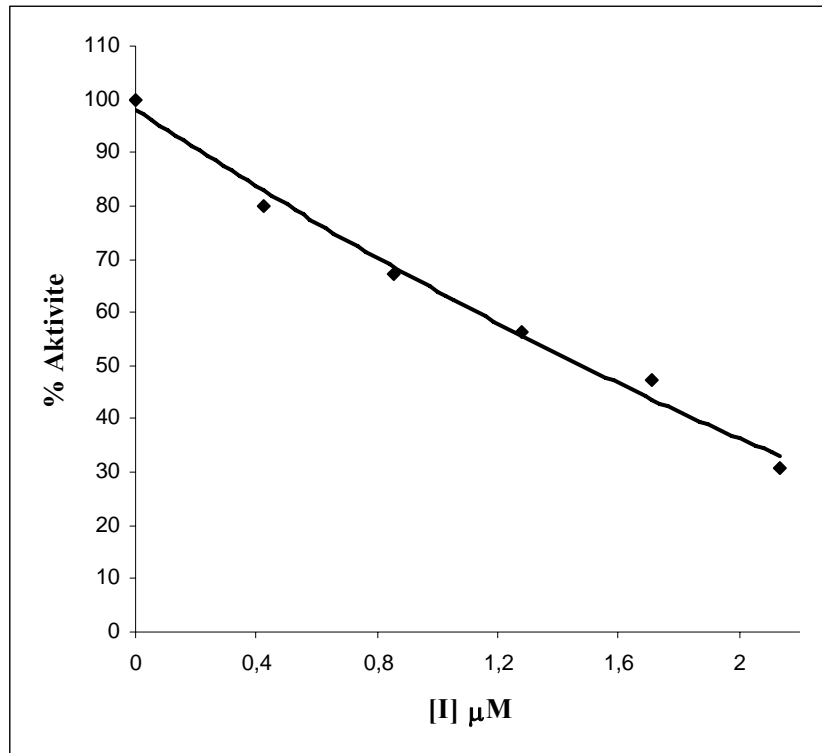
İnhibitör No	Substrat (mL)	Tris-SO <sub>4</sub> Tamponu (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile Su (µL)	% Aktivite	[I] M
<b>(1)</b>	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	15	585	75	$0,92 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	30	570	53,3	$1,82 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	45	555	36,6	$2,74 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	60	540	28,3	$3,65 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	75	525	16,6	$4,57 \cdot 10^{-6}$



**Şekil 4. 7.** BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla **(1)** bileşiğinin etkisi

**Çizelge 4. 5.** BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşiminin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

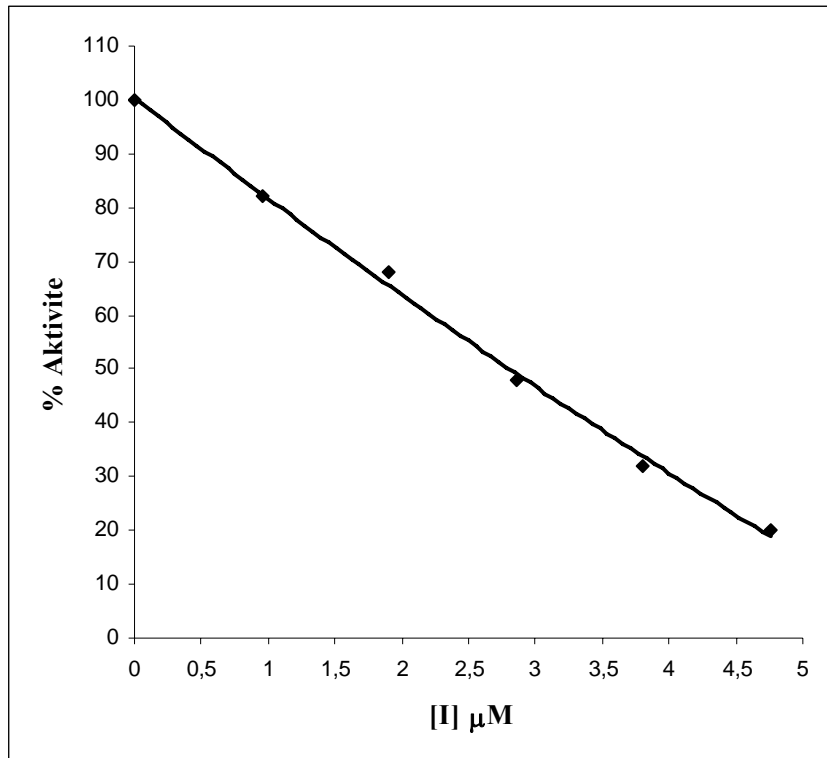
İnhibitör No	Substrat (mL)	Tris-SO <sub>4</sub> Tamponu (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile Su (µL)	% Aktivite	[I] M
(2)	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	10	590	80	$0,42 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	20	580	67,27	$0,85 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	30	570	56,36	$1,28 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	40	560	47,27	$1,70 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	50	550	30,90	$2,13 \cdot 10^{-6}$



**Şekil 4. 8.** BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşiminin etkisi

**Çizelge 4. 6.** BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

İnhibitör No	Substrat (mL)	Tris-SO <sub>4</sub> Tamponu (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile Su (µL)	% Aktivite	[I] M
(3)	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	20	580	82	$0,95 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	40	560	68	$1,90 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	60	540	48	$2,85 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	80	520	32	$3,80 \cdot 10^{-6}$
	1	1,3	0,1	100	500	20	$4,75 \cdot 10^{-6}$



**Şekil 4. 9.** BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (3) bileşiğinin etkisi

Sentezlenen bileşiklerin eritrosit BCA enziminin CO<sub>2</sub> hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan (Şekil 4.4, 4.5, 4.6'daki grafiklerden) hesaplanan I<sub>50</sub> değerleri toplu olarak çizelge 4.7'de verilmiştir.

**Çizelge 4. 7.** Sentezlenen bileşiklerin BCA enziminin in vitro CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

<b>I<sub>50</sub> (M)</b>	
<b>İnhibitör</b>	<b>BCA</b>
<b>(1)</b>	2.10 <sup>-6</sup>
<b>(2)</b>	1,46.10 <sup>-6</sup>
<b>(3)</b>	2,8.10 <sup>-6</sup>

Sentezlenen inhibitörlerin eritrosit BCA enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan (Şekil 4.7, 4.8, 4.9'daki grafiklerden) hesaplanan I<sub>50</sub> değerleri toplu olarak çizelge 4.8'de verilmiştir.

**Çizelge 4. 8.** Sentezlenen bileşiklerin BCA enziminin in vitro esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

<b>I<sub>50</sub> (M)</b>	
<b>İnhibitör</b>	<b>BCA</b>
<b>(1)</b>	7,0.10 <sup>-7</sup>
<b>(2)</b>	2,8.10 <sup>-7</sup>
<b>(3)</b>	3,2.10 <sup>-7</sup>



#### **4. 4. Sentezlenen Bileşiklerin Sığır 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.

**Çizelge 4. 9.** BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla **(1)** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve  $K_i$  elde etmek için yapılan işlem sonuçları

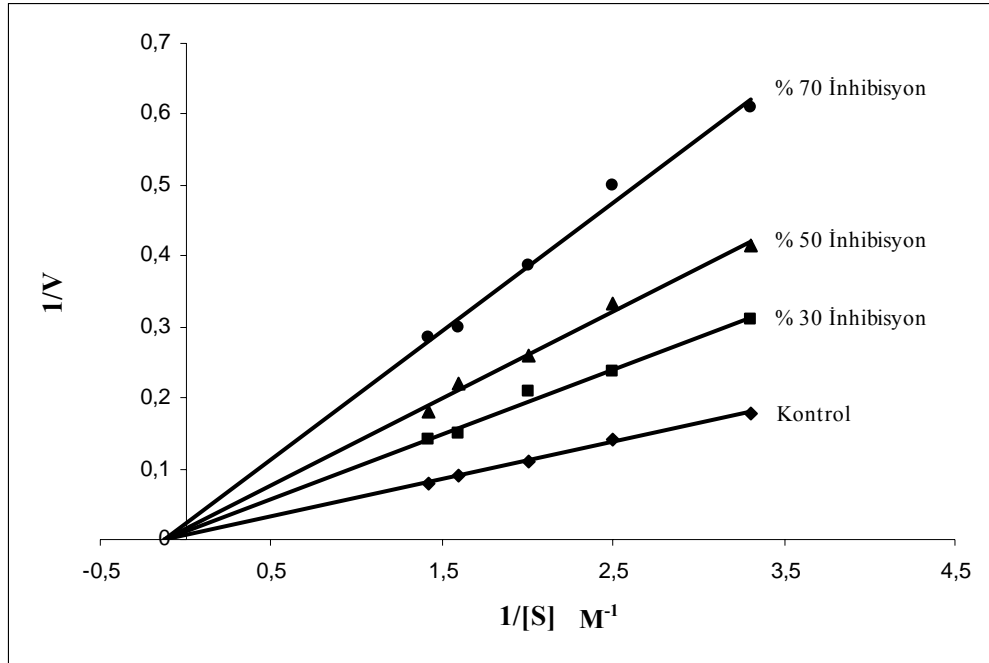
<b>İnhibitör No</b>	<b>Substrat (ml)</b>	<b>Tris-SO<sub>4</sub> Tamponu (ml)</b>	<b>Enzim (ml)</b>	<b>İnhibitör (µL)</b>	<b>Destile Su (ml)</b>	<b>1/[S] (M<sup>-1</sup>)</b>	<b>1/V (µmol/dak)<sup>-1</sup></b>
<b>(1)</b>	0,6	1,3	0,1	-	1,0	3,3.10 <sup>4</sup>	0,178
	0,6	1,3	0,1	15	0,985	3,3.10 <sup>4</sup>	0,31
	0,6	1,3	0,1	30	0,97	3,3.10 <sup>4</sup>	0,416
	0,6	1,3	0,1	60	0,94	3,3.10 <sup>4</sup>	0,61
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	2,5.10 <sup>4</sup>	0,14
	0,8	1,3	0,1	15	0,785	2,5.10 <sup>4</sup>	0,238
	0,8	1,3	0,1	30	0,77	2,5.10 <sup>4</sup>	0,333
	0,8	1,3	0,1	60	0,74	2,5.10 <sup>4</sup>	0,5
	1	1,3	0,1	-	0,6	2.10 <sup>4</sup>	0,11
	1	1,3	0,1	15	0,585	2.10 <sup>4</sup>	0,208
	1	1,3	0,1	30	0,57	2.10 <sup>4</sup>	0,26
	1	1,3	0,1	60	0,54	2.10 <sup>4</sup>	0,386
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	1,6.10 <sup>4</sup>	0,09
	1,2	1,3	0,1	15	0,385	1,6.10 <sup>4</sup>	0,15
	1,2	1,3	0,1	30	0,37	1,6.10 <sup>4</sup>	0,22
	1,2	1,3	0,1	60	0,34	1,6.10 <sup>4</sup>	0,3
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	1,42.10 <sup>4</sup>	0,08
	1,4	1,3	0,1	15	0,185	1,42.10 <sup>4</sup>	0,14
	1,4	1,3	0,1	30	0,17	1,42.10 <sup>4</sup>	0,18
	1,4	1,3	0,1	60	0,14	1,42.10 <sup>4</sup>	0,285

**Çizelge 4. 10.** BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşğinin in vitro inhibisyon etkileri ve  $K_i$  elde etmek için yapılan işlem sonuçları

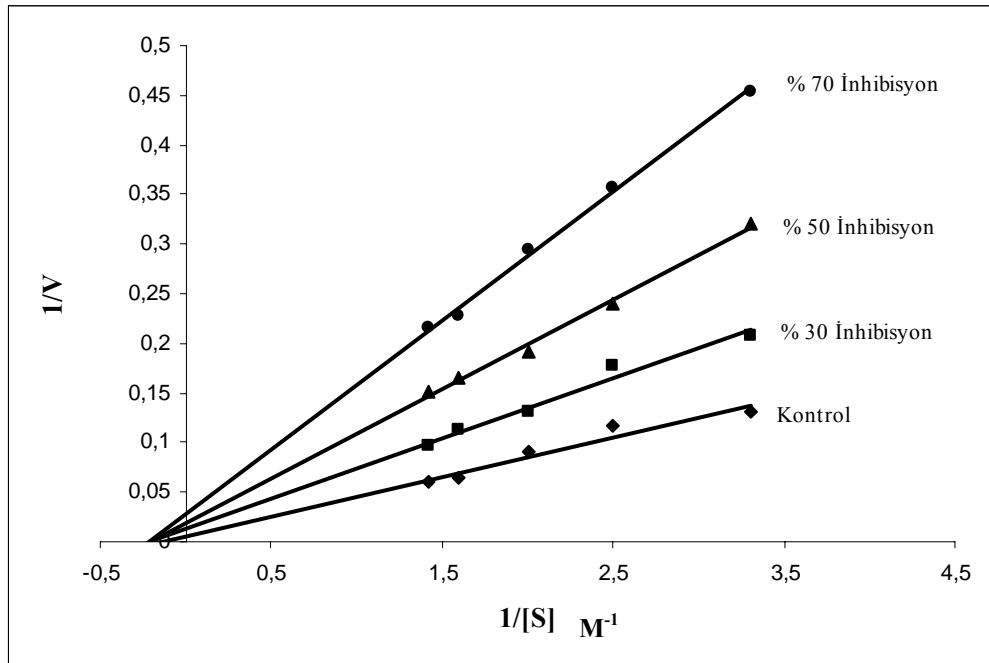
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO <sub>4</sub> Tamponu (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (µL)	Destile Su (ml)	1/[S] (M <sup>-1</sup> )	1/V (µmol/dak) <sup>-1</sup>
(2)	0,6	1,3	0,1	-	1,0	3,3.10 <sup>4</sup>	0,131
	0,6	1,3	0,1	20	0,98	3,3.10 <sup>4</sup>	0,208
	0,6	1,3	0,1	40	0,96	3,3.10 <sup>4</sup>	0,32
	0,6	1,3	0,1	50	0,95	3,3.10 <sup>4</sup>	0,454
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	2,5.10 <sup>4</sup>	0,116
	0,8	1,3	0,1	20	0,78	2,5.10 <sup>4</sup>	0,178
	0,8	1,3	0,1	40	0,76	2,5.10 <sup>4</sup>	0,24
	0,8	1,3	0,1	50	0,75	2,5.10 <sup>4</sup>	0,357
	1	1,3	0,1	-	0,6	2.10 <sup>4</sup>	0,09
	1	1,3	0,1	20	0,58	2.10 <sup>4</sup>	0,131
	1	1,3	0,1	40	0,56	2.10 <sup>4</sup>	0,192
	1	1,3	0,1	50	0,55	2.10 <sup>4</sup>	0,294
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	1,6.10 <sup>4</sup>	0,065
	1,2	1,3	0,1	20	0,38	1,6.10 <sup>4</sup>	0,112
	1,2	1,3	0,1	40	0,36	1,6.10 <sup>4</sup>	0,166
	1,2	1,3	0,1	50	0,35	1,6.10 <sup>4</sup>	0,227
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	1,42.10 <sup>4</sup>	0,06
	1,4	1,3	0,1	20	0,18	1,42.10 <sup>4</sup>	0,096
	1,4	1,3	0,1	40	0,16	1,42.10 <sup>4</sup>	0,152
	1,4	1,3	0,1	50	0,15	1,42.10 <sup>4</sup>	0,215

**Çizelge 4. 11.** BCA enzimi üzerine esteraz aktivitesi yoluyla **(3)** bileşğinin in vitro inhibisyon etkileri ve  $K_i$  elde etmek için yapılan işlem sonuçları

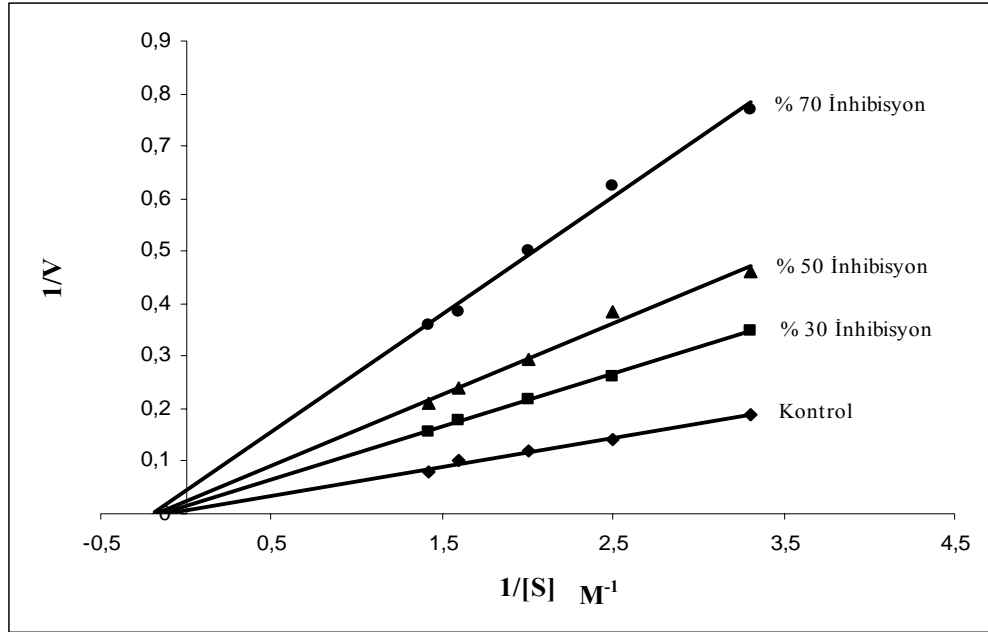
<b>İnhibitör No</b>	<b>Substrat (ml)</b>	<b>Tris-SO<sub>4</sub> Tamponu (ml)</b>	<b>Enzim (ml)</b>	<b>İnhibitör (µL)</b>	<b>Destile Su (ml)</b>	<b>1/[S] (M<sup>-1</sup>)</b>	<b>1/V (µmol/dak)<sup>-1</sup></b>
<b>(3)</b>	0,6	1,3	0,1	-	1,0	3,3.10 <sup>4</sup>	0,19
	0,6	1,3	0,1	40	0,96	3,3.10 <sup>4</sup>	0,35
	0,6	1,3	0,1	60	0,94	3,3.10 <sup>4</sup>	0,46
	0,6	1,3	0,1	80	0,92	3,3.10 <sup>4</sup>	0,768
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	2,5.10 <sup>4</sup>	0,142
	0,8	1,3	0,1	40	0,76	2,5.10 <sup>4</sup>	0,263
	0,8	1,3	0,1	60	0,74	2,5.10 <sup>4</sup>	0,384
	0,8	1,3	0,1	80	0,72	2,5.10 <sup>4</sup>	0,625
	1	1,3	0,1	-	0,6	2.10 <sup>4</sup>	0,119
	1	1,3	0,1	40	0,56	2.10 <sup>4</sup>	0,217
	1	1,3	0,1	60	0,54	2.10 <sup>4</sup>	0,294
	1	1,3	0,1	80	0,52	2.10 <sup>4</sup>	0,5
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	1,6.10 <sup>4</sup>	0,102
	1,2	1,3	0,1	40	0,36	1,6.10 <sup>4</sup>	0,178
	1,2	1,3	0,1	60	0,34	1,6.10 <sup>4</sup>	0,238
	1,2	1,3	0,1	80	0,32	1,6.10 <sup>4</sup>	0,384
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	1,42.10 <sup>4</sup>	0,08
	1,4	1,3	0,1	40	0,16	1,42.10 <sup>4</sup>	0,156
	1,4	1,3	0,1	60	0,14	1,42.10 <sup>4</sup>	0,21
	1,4	1,3	0,1	80	0,12	1,42.10 <sup>4</sup>	0,36



Şekil 4. 10. BCA enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4. 11. BCA enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 5. 12. BCA enzimi üzerinde (3) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 12. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları

İnhibitör	[I] (M)	$K_i$ (M)	Ortalama $K_i$ (M)	İnhibisyon Türü
(1)	$9,14 \cdot 10^{-7}$	$8,17 \cdot 10^{-7}$	$1,05 \cdot 10^{-6}$	Yarışmasız
	$1,82 \cdot 10^{-6}$	$1,18 \cdot 10^{-6}$		
	$3,65 \cdot 10^{-6}$	$1,14 \cdot 10^{-6}$		
(2)	$8,53 \cdot 10^{-7}$	$7,35 \cdot 10^{-7}$	$7,13 \cdot 10^{-7}$	Yarışmasız
	$1,70 \cdot 10^{-6}$	$7,96 \cdot 10^{-7}$		
	$2,13 \cdot 10^{-6}$	$6,09 \cdot 10^{-7}$		
(3)	$1,90 \cdot 10^{-6}$	$2,40 \cdot 10^{-6}$	$1,49 \cdot 10^{-6}$	Yarışmasız
	$2,85 \cdot 10^{-6}$	$1,29 \cdot 10^{-6}$		
	$3,80 \cdot 10^{-6}$	$7,80 \cdot 10^{-7}$		

## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidrolizaz E. C. 4. 2. 1. 1) eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilen  $Zn^{+2}$  iyonlu bir metaloenzimdir [4]. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz (CA); canlılarda  $CO_2$ 'in hidratasyon ve  $HCO_3^{-}$ 'in dehidratasyonu 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 glaucoma hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni sentezlenen (1), (2), (3) no'lu karbonik anhidraz inhibitörlerinin sığır karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Çalışmalarda kullanılan karbonik anhidraz enzimi, afinite jeli hazırlanarak, eritrositlerden saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisinde kullanılan jel, üç ayrı reaksiyon sonucu sentezlendi. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B CNBr ile aktifleştirildi. CNBr ile aktifleştirme işlemi sadece 5 dakika da gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmış oldu. Aktifleştirilen jele L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış p-aminobenzen sülfanilamid kenetlendi. Uzantı kolu olarak, L-tirozin seçilmiştir. Bu uzantı kolu ile sentezlenen afinite jelleri peptidazlara karşı oldukça hassastır.

Ligand olarak karbonik anhidrazın güçlü inhibitörlerinden olan sülfanilamid yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Hazırlanan afinite jeline takılan bu ligand, eritrosit karbonik anhidraz enziminin ayrılmasında uygun özelliklere sahiptir.

Jele adsorbe olan BCA enziminin elüsyonu için, elüsyon çözeltisi kullanılmıştır. Saflaştırılan enzimler için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi uygulanarak BCA için tek bant gözlenmiştir.

Afinite kromatografisi ile karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması sırasında eluatların protein muhtevaları 280 nm'de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif tayin, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbans 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 µg arasındadır [45]. Enzim aktivitesi tayini için hidrataz ve esteraz aktiviteleri ölçüldü.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede  $I_{50}$  değerleri kullanılmaktadır. Sığır CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen **(1)**, **(2)**, **(3)** no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glaucoma hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için sığır kanından elde edilen BCA enzimi 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 BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi hidrataz aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda çizilen %Aktivite-[I] M grafiklerinden bulunan  $I_{50}$  değerleri tekrar aşağıda özetlenmiştir.

<b>Hidrataz için, <math>I_{50}</math> (M)</b>	
<b>İnhibitör</b>	<b>BCA</b>
<b>Tiyadiazol</b>	$5.10^{-6}$
<b>Asetazolamid</b>	$13.10^{-6}$
<b>1</b>	$2.10^{-6}$
<b>2</b>	$1,46.10^{-6}$
<b>3</b>	$2,8.10^{-6}$

Bunun sonucunda **(1)**, **(2)**, **(3)** no'lu bileşiklerinin BCA üzerindeki inhibisyon etkisini veren  $I_{50}$  değerleri (sırasıyla  $2.10^{-6}$ ,  $1,46.10^{-6}$ ,  $2,8.10^{-6}$ ) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II izoenzimiyle benzer özellikler gösteren sığır CA enzimi üzerinde **(1)**, **(2)**, **(3)** no'lu bileşiklerinin iyi inhibisyon etkilerinin bulunması bu bileşiklerin glaucoma hastalığı tedavisinde kullanılacak inhibitörler olduğunu teyid etmektedir.



BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde **(1)**, **(2)**, **(3)** no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glaucoma hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildi. Daha sonra inhibisyon gösteren bileşikler için; sığır kanından saflaştırılan eritrosit BCA enzimi 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 BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi in vitro esteraz aktivite ölçümleri sonucu çizilen % Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen  $I_{50}$  değerleri tekrar aşağıda özetlenmiştir.

Esteraz için, $I_{50}$ (M)	
İnhibitör	BCA
Tiyadiazol	$2.10^{-6}$
Asetazolamid	$4,9.10^{-6}$
<b>1</b>	$0,7.10^{-6}$
<b>2</b>	$0,28.10^{-6}$
<b>3</b>	$0,32.10^{-6}$

Bunun sonucunda **(1)**, **(2)**, **(3)** no'lu bileşiklerin BCA üzerindeki inhibisyon etkisini veren  $I_{50}$  değerleri (sırasıyla  $0,7.10^{-6}$ ,  $0,28.10^{-6}$ ,  $0,32.10^{-6}$ ) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II izoenzimiyle benzer özellikler gösteren sığır CA'sı üzerinde **(1)**, **(2)**, **(3)** no'lu bileşiklerinin iyi inhibisyon etkisi göstermesi, bu bileşiklerin glaucoma hastalığı tedavisinde kullanılabilecek inhibitörler olduğunu teyid etmektedir.

Tiyadiazol için ( $K_i= 0,82.10^{-4}$ ), asetazolamid için ( $K_i= 2,01.10^{-4}$ ) olarak bulunmuştur. Sentezlenen bileşiklerin çizelge 5. 12'deki sonuçlara göre BCA üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde, **(1)** bileşiği için, ( $K_i= 1,05.10^{-6}$ ), **(2)** bileşiği için, ( $K_i= 7,13.10^{-7}$ ) ve **(3)** bileşiği için, ( $K_i= 1,49.10^{-6}$ )'dir. Bu durum; sentezlenen bileşiklerin BCA enzime karşı daha fazla ilgisi olan inhibitörler olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla sentezlenen bileşiklerin glaucoma hastalığının tedavisinde kullanılmaya aday yeni inhibitörler olabileceğini söylemek mümkündür.

### KAYNAKLAR

- [1] Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004, Biyokimya, Aktif Yayınevi, 642 s.
- [2] Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Principles of Biochemistry, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- [3] Champe, P.C. ve Harvey, R.A., 1997, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 438 s.
- [4] Gözükara, E., 1997. Enzimler. Biyokimya. Ofset Repromat Ltd. Şti. Ankara
- [5] 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.
- [6] Meldrum, N. U. and Roughton, F. J. W., 1933, Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. J. Physiol., 80, 113 p.
- [7] Daveport, H. W., Wilhelmi, A.E., 1941, Renal carbonic anhydrase Proc. Soc. Exp. Biol. Med.48, 53
- [8] Vangoog, H. 1948. Carbonic anhydrase, Its properties. Distribution and significance for carbon dioxide transport. Enzymologia (13): p 73-164.
- [9] Polya, J. B., Wirtz, A. J. 1965. Studies on carbonic anhydrase-II occurrence of the enzyme in some invertebrates: Enzymologia (30): p 27-37.
- [10] Harper, H. 1975. enzymes. Review of physiological chemistry. Californiyalos Altos 15th Edition. P 126-172.
- [11] Maren, T. H., 1967, Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. Physiol. Rev., 47, 595 p. Ren, X. and Lindskog, S., 1992, Buffer dependence of CO<sub>2</sub> hydration catalyzed by human carbonic anhydrase. I. Biochim. Biophys. Acta., 1120, p 81-86.
- [12] Carter, N., Jeffery, S., Shiels, A., Edwards, Y., Tipler, T., Hopkinson, D.A., 1979 Characterization of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle. Biochem Genet, 17 (9-10), 837-54.
- [13] Pocker, Y. and Janjic, N., 1989, Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II, J. Am. Chem. Soc., p 111-731.

**KAYNAKLAR (devam)**

- [14] Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry with Clinical Correlations*, Kanada.
- [15] Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, Italy, 1, 61-97 p.
- [16] Nishimori, I., 2004. Acatalytic CAs, Carbonic anhydrase related proteins, in *Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators* (Supuran, C.T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.) pp 24-43, CRC Pres, Boca Raton, FL.
- [17] Hewett-Emmett, D., 2000. In *the Carbonic Anhydrase-New Horizons*. Birkhauser Verlag, Basel, p 29-78.
- [18] Ren, X. and Lindskog, S., 1992, Buffer dependence of CO<sub>2</sub> hydration catalyzed by human carbonic anhydrase. I. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1120, p 81-86.
- [19] Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995, Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, p 375-401.
- [20] 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, p 867 – 874.
- [21] 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, p 673-676.
- [22] Maren, T. H. and Conroy, C. W., 1993, A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239 p.
- [23] Cabiscol, E., Levine, R.L., 1996. The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 93 (9), p 4170-4174.
- [24] Enberg, P., Millqvist, E., Pohl, G., Lindskog, S., 1998. Purification and some properties of carbonic anhydrase from bovine skeletal-muscle *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 241 (2), p 628-638.

**KAYNAKLAR (devam)**

- [25] Okuyama, T., waheed, A., Kusomoto, W., Zhu, X.L. and Sly, W.S., 1995. Carbonic Anhydrase IV role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320, p 312-315.
- [26] Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J., 1996. Differentiation dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEB Journal*, 10 (4), p 481-490.
- [27] Lakkis, M. M., Bergenhem, 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.
- [28] Maa, J.S., Rodriguez, J.F. and Esteban, M., 1990. Structural and functional characterization of a cell surface binding protein of Vaccinia virus. *Journal of Biological Chemistry*, 265, p 1569-1577.
- [29] Sjoblom, B., Elleby, B., Wallgren, K., Jonsson, B.H., Lindskog, S., 1996. Two point mutations convert a catalytically inactive carbonic anhydrase-related protein (CARP) to an active enzyme. *FEBS Letters*, 398 (2-3), p 322-325.
- [30] Henry, R.P., Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas Exchange organs. *Respiration Physiology*, 121 (1), p 1-12.
- [31] 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 p, 6368-6844.
- [32] Boriack-Sjodin, P. A., Heck, R. W., Laipis, P. J., Silverman, D. N. and Christianson, D. W., 1995, Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase. V at 2.45-Å resolution: implications for catalytic proton transfer and inhibitor design. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92, p, 10949 – 10953.
- [33] 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 (devam)**

- [34] Pocker, Y. and Janjic, N., 1989, Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, p, 731.
- [35] Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, Italy, 1, 61-97 p
- [36] 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.
- [37] Briganti, F., Pierattelli, A, Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 1996 *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 1001 p.
- [38] Maren, T. H. and Conroy, C. W., 1993, A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239 p.
- [39] 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.
- [40] Verpoorte, J. A., Mehta, S. And Edsall, J. T., 1967, Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, p, 242, 4221.
- [41] 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.
- [42] Liljas, A., Hakansson, K., Jonsson, B. H. and Xue, Y. 1994, Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 219, 1-10 p.
- [43] 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.
- [44] Simonsson, I. and Lindskog, S. 1982, The interaction of sulfate with carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.* 123 : 29-36 p.
- [45] 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.

**KAYNAKLAR (devam)**

- [46] 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.
- [47] Tozlu, İ., 1997, Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Van.
- [48] Lindskog, S. and Wistrand, P. J. 1988, Inhibitors of carbonic anhydrase. In: *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*, pp. 698-723 p.
- [49] Lindskog, S., Enberg, P., Formsan, C., İbrahim, S.A., Jonsson, B.H., Simonsson, İ., Tibell, I., 1984. Kinetics and mechanism of carbonic anhydrase isoenzymes. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 429 (JUN), p, 61-75.
- [50] Liesegang, T. J., 1996, *Glaucoma: Changing Concepts and Future Directions*, Mayo Clin. Proc., 71, 689 p.
- [51] Chiou, C. Y., 1981, *Biochem. Pharm.*, 30, 103 p.
- [52] Wilson MR and Martane JF. 1996, Epidemiology of chronic open – angle glaucoma in: *The Glaucomas*. Ritch R, Shields MB, Krupin, (eds), StLouis Masby, p, 735-68.
- [53] Wiggs J. L., 1995, Genetics of Glaucoma *Ophthalmol Clin. Nort. Am.*: 203-14 p.
- [54] Maren, T. H., 1967, Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 p.
- [55] 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.
- [56] Maren, T. H. and Jankowska, L., 1985, Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot. *Cur. Eye. Res.*, 4, 399 p.
- [57] Sugrue, M. F., 1996, The preclinical pharmacology of dorzolamide hydrochloride, a topical carbonic anhydrase inhibitor. *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 12, 363-376 p.

**KAYNAKLAR (devam)**

- [58] 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.
- [59] Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248 p.
- [60] Maren, C. H., 1960, A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, p, 130, 26.
- [61] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characterization of carbonic anhydrase activity. *J. Pharm. And Toxicol. Meth.*, 38, 169 – 172 p.
- [62] 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.*, p, 214, 5137.
- [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.*, p, 245, 2444.
- [64] Kohn, J. and Wilchek, M. A., 1978, Colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 7, 14 p.
- [65] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö. İ., 1997, A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Tr. J. of Med. Sci.*, 27, 559 p.
- [66] Laemmli, D. K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680 p.
- [67] Cuatrecasas, P., 1970, Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads. *J. Biol. Chem.*, 245, 3059 p.
- [68] Keha, E. E., 1981, Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu. Doçentlik tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi.

**KAYNAKLAR (devam)**

- [69] Axen, R., Ernback, S., 1971, Chemical fixation of enzymes Halide activated polysaccaride carriers. Eur. J. Biochem, 18, 351 p.
- [70] Armstrong, J. Mc D., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. and Edsall, J.T., 1966, Purification and properties of human erythrocte carbonic anhydrase. J. Biol. Chem., 214, 5134 p.