

**ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİ  
ÜZERİNE BAZI İLAÇLARIN *IN VITRO* ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Mehmet KUZUCU**

**BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN**

**2011**

Her Hakkı Saklıdır

**Yrd. Doç. Dr. Murat ÇANKAYA** danışmanlığında, **Mehmet KUZUCU** tarafından hazırlanan bu çalışma 29.07.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ** Anabilim Dalı **BİYOLOJİ** Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Başkan : **Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR**

İmza:



Üye : **Doç. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN**

İmza:



Üye : **Yrd. Doç. Dr. Murat ÇANKAYA**

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.



Doç. Dr. Çetin DOĞAR  
Enstitü Müdürü V.

## ÖZET

Yüksek Lisans

### KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİ ÜZERİNE BAZI İLAÇLARIN *IN VITRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet Kuzucu

Erzincan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Murat ÇANKAYA

Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1 karbonat dehidrataz) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  iyonu içeren bir metaloenzimidir. Karbonik anhidraz (CA), canlılarda  $CO_2$ 'nin hidratasyonu ve  $HCO_3^-$ 'in dehidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir.

Karaciğer vücuda alınan ilaçların metabolize edilmesinde ve detoksifikasyonunda görev alan önemli bir organdır. Karaciğerde ekspresyon düzeyi düşük olduğu bilinen CA I ve II izoenzimlerinin doku pH dengesini sağlamakta önemli görevleri vardır. Karaciğerde detoksifikasyondan sorumlu enzimlerin optimum çalışma pH'sında bulunması önemli bir durumdur. Doku içine giren ilaçların CA I ve II izoenzimlerini inhibe etmesi detoksifikasyon enzimlerinin çalışmasını güçleştirecek yahut durduracaktır. Kronik olarak karaciğerde ilaç birikimi, sakatat tüketiminde insanlar içinde sorun teşkil etmektedir.

Bu çalışmamızda koyun karaciğer dokusundan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerini (CA I ve CA II) afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda saflaştırılan CA I ve II izoenzimleri üzerine koyunlarda kullanılan ve karaciğerde metabolize olunan bazı ilaçların etken maddelerinin *in vitro* şartlarda inhibisyon etkileri incelenmiştir. Çalışmamızdaki amaç; koyunlarda bu etken maddeleri içeren ilaçların kullanımında, fizyolojik olarak önem arzeden CA I ve II izoenzimlerine etkisinin incelenmesidir.

**2011, 82 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Karbonik anhidraz, Koyun, Karaciğer

**ABSTRACT**

Master Thesis

INVESTIGATION OF *IN VITRO* EFFECTS OF SOME DRUGS ON  
CARBONIC ANHYDRASE I AND II ISOENZYMES

Mehmet Kuzucu

Erzincan University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1 carbonate dehydratase) a metalloenzyme, commonly found in all organisms which containing  $Zn^{+2}$  ions in its active side. Carbonic anhydrase (CA) is an important enzyme for all organisms which catalyzes reversible hydration of  $CO_2$  and dehydration of  $HCO_3^-$  reactions.

Liver is an important organ, it involved in metabolized and detoxification of drugs taken into the body. Known to have low levels of expression in the liver tissue isoenzymes CA I and II are important tasks to provide pH balance. Enzymes responsible for detoxification in the liver from the optimum working pH is an important finding. Entering into the tissues of drugs to inhibit CA I and II isoenzymes, will be difficult or stop the run of detoxification enzymes. Chronic drug accumulation in the liver, organ meat consumption in humans is problematic.

In this study, liver tissue of sheep carbonic anhydrase I and II isoenzymes (CA I and CA II) were purified by affinity chromatography method. At the same time, on purified CA I and II isoenzymes, we investigated in vitro inhibitory effect of active ingredients of some drugs which are metabolized in the sheep liver. Purpose of our study, the use of drugs containing these the active ingredients on sheep, to investigate the effect of CA I and II isoenzymes which have important physiologically task.

**2011, 82 pages****Keywords:** Carbonic anhydrase, Sheep, Liver



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu alıőmanın deneysel kısmı Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Laboratuvarında gerekleőtirilmiőtir. Çalıőmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin her aőamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen tez danıőmanım değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat ÇANKAYA'ya derin minnet ve őükranlarımı sunarım. Çalıőmam boyunca eőtiz katkılarından dolayı değerli hocalarım Sayın Prof.Dr.Hasan ÖZDEMİR ve Doç.Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN'a tüm itenliklerimle teőkükürlerimi sunarım. Yüksek lisans dönemim boyunca her türlü yardımı esirgemeyen Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Yrd.Doç.Dr. Sevgi SEVSAY'a teőkükür ederim. Biyoloji A.B.D. araştırma laboratuvarında deneysel ve teorik çalıőmalarımnda hep yardımcı olan Kimya A.B.D. yüksek lisans öğrencisi Ahmet ÇETİN'e teőkükür ederim.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teőkükürler ederim.

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.1.1. Enzim İnhibisyonu	6
1.2. Afinite kromatografisi	10
1.2.1. Matriks	12
1.2.2. Ligand	13
1.2.3. Uzantı Kolu	13
1.2.4. Ligandı Bağlayacak Jelin Seçimi	14
1.2.5. Afinite Kromatografisi Türleri	15
1.3. Karbonik Anhidraz	16
1.3.1. Fizyolojik Fonksiyonları	16
1.3.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	18
1.3.3. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları	21
1.3.3.1. $\alpha$ -Karbonik anhidrazlar	23
1.3.3.2. $\beta$ -Karbonik anhidrazlar	24
1.3.3.3. $\gamma$ -Karbonik anhidrazlar	24
1.3.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	25
1.3.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	26
1.3.6. Karbonik Anhidrazın Önemli İnhibitörleri	28
1.3.7. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodları	33
1.3.7.1. Esteraz Aktivitesi	33
1.4. Deneyde kullanılan ilaçlar ve özellikleri	34
1.4.1. Klindamisin	34
1.4.2. Deksketoprofen Trometamol	35

1.4.3. Benzil Penisilin	37
1.4.4. Fenoksimetil Penisilin	38
2. KAYNAK ÖZETLERİ	40
3. MATERYAL ve YÖNTEM	43
3.1. Materyal	43
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	43
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	44
3.2. Yöntem	47
3.2.1. Protein Tayini	47
3.2.1.1. Kalitatif protein tayini	47
3.2.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini	47
3.2.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini	48
3.2.2.1. Esteraz aktivitesi tayini	48
3.2.3. Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid Afinite Jelinin Sentezi	48
3.2.3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye Tirozin Bağlanması	49
3.2.3.2. p-aminobenzensülfonamidin Kenetlenmesi	50
3.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü	50
3.2.4. Koyun Karaciğer Dokusundan Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması	52
3.2.4.1. Koyun karaciğeri temini ve hemolizat hazırlanması	52
3.2.4.2. Afinite kolonunun paketlenmesi	52
3.2.4.3. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	52
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	54
4.1. Sonuçlar	54
4.1.1. Saflaştırma sonuçları	54
4.1.2. İnhibisyon çalışmaları sonuçları	55
4.2. Tartışma	65
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	81

**SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ****Simgeler Açıklama**

L	Litre
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ M	Mikromolar
rpm	Devir/Dakika

**Kısaltmalar Açıklama**

BCA	Sığır eritrosit karbonik anhidraz
CA	Karbonik anhidraz enzimi
HCA	İnsan 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

<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. Michaelis-Menten grafiği	5
Şekil 1.2. Lineweaver-Burk grafiği	6
Şekil 1.3. Dönüşümsüz inhibisyon şematik şekli	7
Şekil 1.4. Yarışmalı inhibisyon şematik şekli	8
Şekil 1.5. Yarı yarışmalı inhibisyon şematik şekli	9
Şekil 1.6. Afinite kromatografisinin prensibi	11
Şekil 1.7. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi	18
Şekil 1.8. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri	19
Şekil 1.9. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri	22
Şekil 1.10. CA enziminin CO <sub>2</sub> -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi	27
Şekil 1.11. CAII nin aktif kısmı	27
Şekil 1.12. CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri	29
Şekil 1.13. Bazı Sülfanamidlerin açık formülleri	31
Şekil 1.14. Sülfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzimine Bağlanması	32
Şekil 1.15. Klindamisin'in molekül yapısı	34
Şekil 1.16. Deksketoprofen Trometamol' in molekül yapısı	36
Şekil 1.17. Benzil Penisilin' in molekül yapısı	38
Şekil 1.18 Fenoksimetil Penisilin' in molekül yapısı	39
Şekil 4.1. Saflaştırılmış CA izoenzimlerinin SDS-PAGE görüntüsü	55
Şekil 4.2. Fenoksimetil penisilinin CA I izoenzimine karşı I <sub>50</sub> grafiği.	56

Şekil 4.3. Benzilpenisilinin CA I izoenzimine karşı I <sub>50</sub> grafiği.	57
Şekil 4.4. Klindamisininin CA I izoenzimine karşı I <sub>50</sub> grafiği.	57
Şekil 4.5. Deksketoprofen Trometamol CA I izoenzimine karşı I <sub>50</sub> grafiği.	58
Şekil 4.6. Fenoksimetil penisilinin CA II izoenzimine karşı I <sub>50</sub> grafiği.	58
Şekil 4.7. Benzil penisilinin CA II izoenzimine karşı I <sub>50</sub> grafiği.	59
Şekil 4.8. Klindamisininin CA II izoenzimine karşı I <sub>50</sub> grafiği.	59
Şekil 4.9. Deksketoprofen trometamolün CA II izoenzimine karşı I <sub>50</sub> grafiği.	60
Şekil 4.10. Fenoksimetil penisilinin CA I izoenzimine karşı K <sub>i</sub> grafiği.	60
Şekil 4.11. Fenoksimetil penisilinin CA II izoenzimine karşı K <sub>i</sub> grafiği.	61
Şekil 4.12. Benzil penisilinin CA I izoenzimine karşı K <sub>i</sub> grafiği.	61
Şekil 4.13. Benzil penisilinin CA II izoenzimine karşı K <sub>i</sub> grafiği.	62
Şekil 4.14. Klindamisininin CA I izoenzimine karşı K <sub>i</sub> grafiği.	62
Şekil 4.15. Klindamisininin CA II izoenzimine karşı K <sub>i</sub> grafiği.	63
Şekil 4.16. Deksketoprofen Trometamol CA I izoenzimine karşı K <sub>i</sub> grafiği.	63
Şekil 4.17. Deksketoprofen Trometamol CA II izoenzimine karşı K <sub>i</sub> grafiği.	64

<b>TABLULAR LİSTESİ</b>	<b>Sayfa</b>
Tablo 1.1. Afinite kromatografisinde en sık kullanılan biyolojik sistemler	12
Tablo 1.2. Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlandıkları jeller	15
Tablo 1.3. Karbonik anhidraz izoenzimleri	21
Tablo 1.4. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	25
Tablo 1.5. Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin Hücre içi Yerleşimleri ve Sülfonamidlere ilgisi	32
Tablo 4.1. Koyun karaciğer CA-I ve CA-II izoenzimlerinin afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.	54
Tablo 4.2. Denemesi yapılan etken maddelerin $I_{50}$ değerleri.	64
Tablo 4.3. Denemesi yapılan etken maddelerin $K_i$ değerleri	64

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Enzimler:

Organizmada kimyasal reaksiyonların hızlarını artırmak için enzim adı verilen protein katalizörleri kullanılır, enzimlerin gerçekleştirdiği tepkimeler invitro şartlarda gerçekleşen aynı tepkimeye göre milyonlarca hatta milyarlarca kat daha fazladır. Enzimler, hücrel tepkimelerin hızını hücrenin gereksinimlerine göre ayarlar. Bunun için belli hücrel bölgelere yerleşir ve yüksek ölçüde spesifikklik gösterirler. Enzimler tepkime sırasında tüketilmezler ve reaksiyon sonunda değişikliğe uğramazlar (Konukoğlu, 2000).

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



Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna –az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır (Lehninger, 2011; Bingöl, 1983; Tekman ve Öner, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

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

Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon özgüllüğüne sahip enzimleri içerir. Oksidoredüktazlar (sınıf 1), bir redoks sisteminden diğerine indirgeyici ekivalentleri katalizlerler. Transferazlar (sınıf 2) bir substrattan diğerine hidrojen dışındaki diğer fonksiyonel grupların transferini katalizlerler. Çoğu oksidoredüktazların ve transferazların koenzimlere gereksinimi vardır. Hidrolazlarda (sınıf 3) grup transferinde rol alırlar ancak alıcı her zaman bir su molekülüdür. Liyazlar (sınıf 4) bir çift bağın uzaklaştırılması veya oluşumu ile ilgili reaksiyonları katalizlerler. İzomerazlar (sınıf 5) geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Ligazlar (sınıf 6, sentetazlar) tarafından katalizlenen reaksiyonlar, enerji bağımlıdır. Bu nedenle, her zaman nükleosit trifosfatların hidrolizi ile birlikte gerçekleşir (Koolman *et al.*, 2003; Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Biyokimya alanında günümüze kadar en çok araştırma yapılan konu enzimlerdir. Enzimler sağlıktan endüstriyel konulara kadar uygulama alanı bulmuştur. Kataliz olayı ile ilgili ilk denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerine yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışma 1860 yılında Pasteur tarafından yapılmış ve fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü ispat etmiştir. Bu yüzden enzimler için “Ferment” terimi kullanılmıştır. Buchner kardeşler 1897’li yıllarda maya hücrelerinde alkolik fermantasyonu katalize eden enzimleri elde etmeyi başarmışlardır. Bu buluş enzimlerin aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmalarının şart olmadığını ortaya koymuştur.

Enzimoloji alanında en önemli gelişme 1926 yılında Sumner’ın üreaz enzimini “Jack Bean” bitkisinden elde edip kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasıdır (Lehninger 2011; Keha ve Küfrevioğlu, 2010). Northrop 1930 yılında pepsin’i saf ve karakterize halde elde etmeyi başarmıştır. Bu araştırma sonucunda enzimlerin protein yapısında olduğu herkes tarafından kabul edilmeye başlanmıştır (Gözükara, 1997).

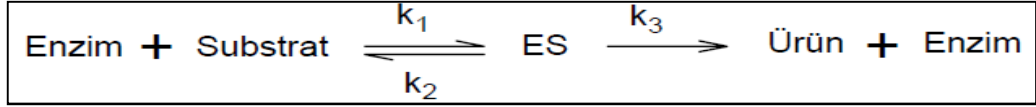
Günümüzde birçok enzim saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200’den fazla enzim de kristalleştirilmiştir. Yapılan genetik çalışmalar ve hücre içindeki kimyasal reaksiyonların çeşitliliği daha birçok enzimin keşfedilmediğini göstermektedir. Bütün canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonlar enzimlerle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

Enzimlerin katalizleme güçleri “turnover sayısı” adı verilen bir değerle ifade edilir ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı demektir.

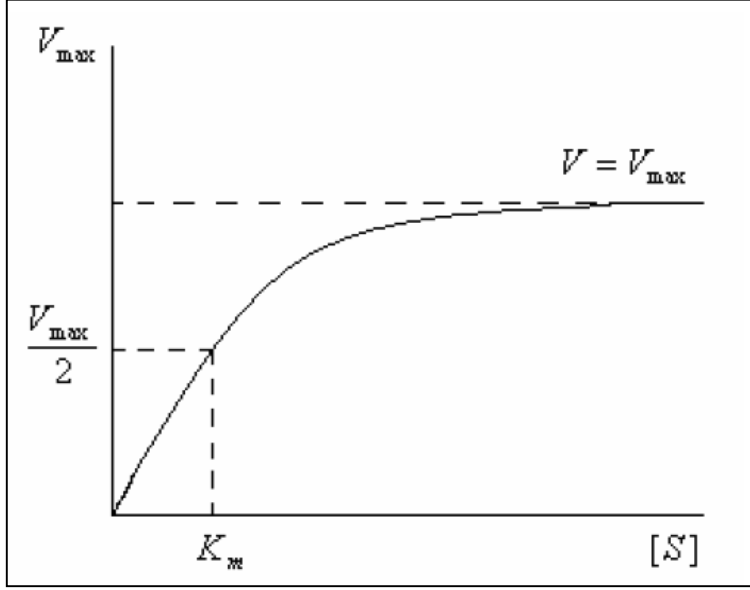
Enzim aktivitesine yani enzimli reaksiyon hızlarına etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz:

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

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir "Enzim-Substrat kompleksi" oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür.



Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağılılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 1.1.). Bunun çözümü ile Michaelis-Menten bağıntısı bulunur.



**Şekil 1.1.** Michaelis-Menten grafiği.

$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Michaelis-Menten Bağıntısı})$$

$V_{\max}$ : hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir.

Maksimum hızın yansına ( $V_{\max}/2$ ) karşılık gelen substrat derişimi  $K_m$  (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir.  $V_{\max}$  ve  $K_m$  bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

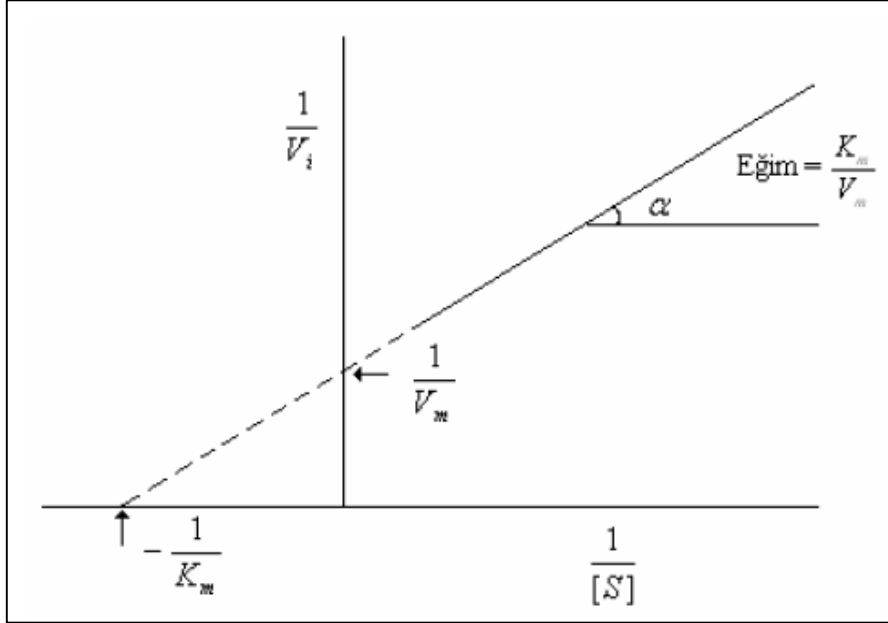
Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ( $[S] \ll K_m$ ) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede  $[S] \gg K_m$  'dir.  $V = V_{\max}$  olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir.

Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denkleminde dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı Lineweaver-Burk denklemdir (Lineweaver ve Burk, 1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{Lineweaver-Burk denkleminde})$$

Bu denkleme göre ordinatta  $1/V_{\max}$ , apsiste  $1/[S]$  değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise  $K_m/V_{\max}$  tır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Lineweaver-Burk grafiği.

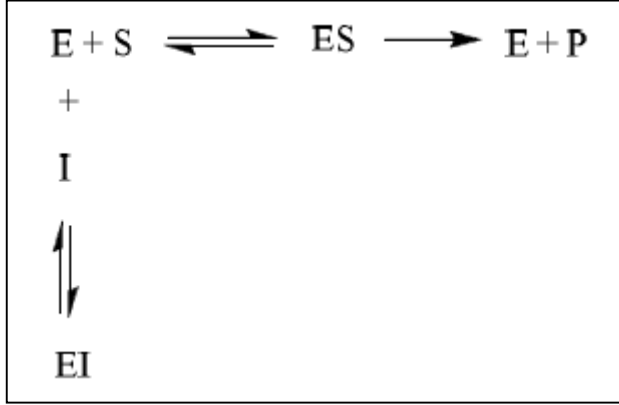
### 1.1.1. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin hem “*in vivo*” hem de “*in vitro*” aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına “inhibisyon” adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere “inhibitör” denilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan, önemli bir olaydır.

Birçok ilaçlar ve zehirli bileşiklerde etkilerini bu yolla gösterir. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında önemlidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Enzimatik inhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır.

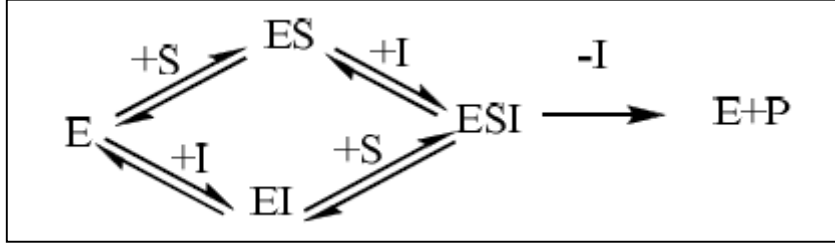
Dönüşümsüz inhibisyonda enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör, enzime ya kovalent olarak bağlanır veya kompleks oluşturur.  $V_{max}$  azalırken,  $K_m$  değişmeden kalır.



**Şekil 1.3.** Dönüşümsüz inhibisyon sematik şekli

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir. Bunlar: yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur.

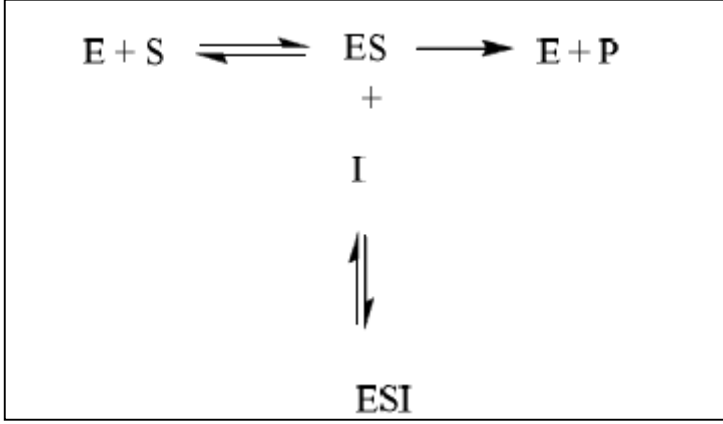
Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken,  $K_m$  değeri artar.



**Şekil 1.4.** Yarışmalı inhibisyon şematik şekli

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

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



**Şekil 1.5.** Yarı yarışmalı inhibisyon şematik şekli

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

İnhibisyon çeşidinin ve  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için en çok kullanılan yöntem, Lineweaver–Burk grafikleridir. Bu yöntemde  $1/V-1/S$  grafikleri sabit inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilerek  $K_i$  sabitleri hesaplanır.  $K_i$  sabitlerinin bulunmasında ikinci yol Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki basit substrat konsantrasyonunda  $1/V-[I]$  grafiği çizilerek kesim noktalarından  $K_i$  sabitleri hesaplanır (Lehninger, 2011; Keha ve Küfrevioğlu, 2010).



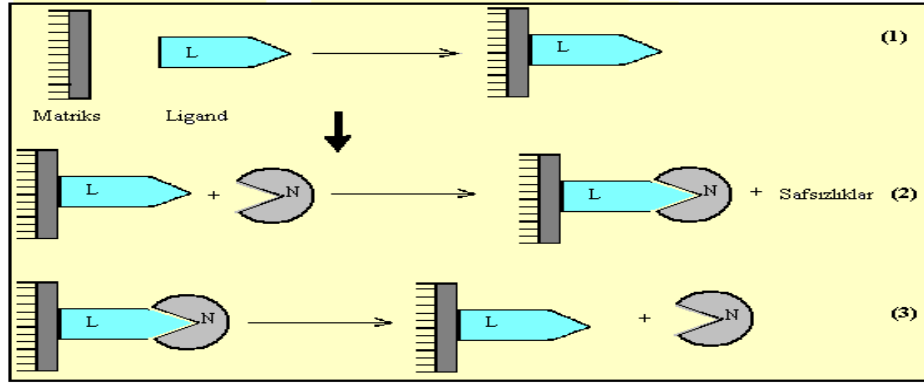
## 1.2. Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir katı destek materyaline kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010). Bir biyolojik ligand veya onun sentetik bir analogu ile saflaştırılmak istenen molekül üzerindeki komplementer bağlama bölgesi arasındaki spesifik etkileşimi esas alan, güçlü bir protein saflaştırma yöntemidir (Bollog *et al.*, 1996). Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Ligand olarak substrat, hormon, koenzim, kofaktör, antikor, aminoasitler, oligopeptid, oligonükleik asit ve nükleik asitlerin de (DNA, RNA) bulunduğu çok sayıda biyofonksiyonel molekül kullanılabilir (Denizli ve Pişkin, 1995).

Bu yöntem sayesinde çok yorucu, zor ve bazı hallerde imkansız olan birçok ayırma ve saflaştırma işlemi kısa zamanda gerçekleştirilebilir ve yüksek verimde binlerce kez saflaştırılmış bileşikler elde edilebilir (Arslan 1994). Afinite kromatografisi ilk defa 1910 yılında amilazın çözünmeyen nisastaya adsorpsiyonu sonucu izolasyonunda kullanılmıştır, fakat kovalent olarak ligandların bağlanabileceği dayanıklı matrikslerin bulunmayışından, bu tekniğin yaygın halde uygulanması 1967 den sonra gerçekleşebilmiştir. Bu tarihte, primer amino grubuna sahip bileşiklerin siyano bromür (CNBr) ile aktifleştirilmiş polisakkarit matriks üzerine kovalent bağlanabileceği gösterilmiştir (Arslan, 1994). Ayrıca literatürde, afinite jelleri için kullanılan matrikslerin aktivasyonu için, oksiran aktifleştirilmesi, karbodiimid aktifleştirilmesi gibi değişik aktifleştirilme yöntemleri de kullanılmıştır (Arslan, 1994). Bu keşiften sonra afinite kromatografisinden yararlanarak, biyospesifik ligandlarla antikorlar, bazı taşıyıcı proteinler, enzimler, nükleik asitler ve hatta bir takım hücrelerde çok saf halde elde edilmeye başlanmıştır (Arslan, 1994).

Literatürde afinite jelleri için kullanılan matrikslerin aktivasyonu için, CNBr aktifleştirmesi dışında, oksiran ve karbodiimid aktifleştirilmesi gibi değişik aktifleştirme yöntemleri de bulunmaktadır (Arslan, 1994). Afinite kromatografisinin yaygınlaşmasından sonra, yöntemin avantajlarından ve modifikasyonlara açık olmasından yararlanılarak, biyospesifik ligandlarla antikorlar, enzimler, bazı taşıyıcı proteinler, nükleik asitler ve çok saf halde elde edilmeye başlanmıştır. Karbonik anhidrazın afinite kromatografisi ile ilk defa 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1974 yılında Whitney'in, 1975 yılında Wistrand ve arkadaşlarının, 1976 yılında Johansen, 1992 yılında Özdemir'in, 1994 yılında Arslan'ın, 1995 yılında Çelik'in, 1997 yılında Tozlu'nun çalışmaları görülmektedir (Arslan, 1994; Çelik, 1995; Falkbring *et al.*, 1972; Johansen, 1976; Özdemir, 1992; Tozlu, 1997; Whitney, 1974).

Afinite kromatografisinde, katı destek materyaline "ligand" adı verilen özel bir molekül immobilize edilir. Bu molekül saflastırılmak istenen materyale karşı spesifik bir biyolojik ilgi duyarak onu belirli bir kuvvette dönüşümlü bir şekilde bağlamalıdır (Arslan, 2003).



Şekil 1.6. Afinite kromatografisinin prensibi

**Tablo 1.1.** Afinite kromatografisinde en sık kullanılan biyolojik sistemler.

<b>Saflaştırılacak madde</b>	<b>Ligand</b>
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre, hücre yüzey reseptörü
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, histon, nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein,
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

### 1.2.1. Matriks

Afinite kromatografisinde matriks olarak Sephadex, Sepharose, Bio-jel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. Bunlar içinde en çok kullanılan Sepharose, inci şeklinde dizilmiş bir agaroz jelidir. Bu jel, biyolojik aktif moleküllerin immobilizasyonda başarılı bir matriks için gerekli olan bütün özelliklere sahiptir

Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent bağlanması için kolayca derivatize edilebilir. Bunlardan Sepharose 4B en iyisidir ve en çok kullanılanıdır. Jel filtrasyon kromatografisindeki dışarılama limiti, (molekül kütlesi olarak)  $2 \cdot 10^7$  olan Sepharose 4B'nin açık porlu yapısı, iç tarafını ligand bağlanmasına uygun hale getirir ve büyük moleküller için bile, iyi bir bağlanma kapasitesi temin eder. Söz konusu jel, oldukça yüksek spesifikiteli adsorbsiyon gösterir; bunun böyle olması, afinite kromatografisinin gücünün spesifik etkileşmelere bağlı olmasından dolayı zorunludur. Jelin inci yapısı, mükemmel akış özellikleri ve partiküller arasında minimum kanallama sağlar; böylece hızlı ayırma mümkün olur (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

### 1.2.2. Ligand

Afinite kromatografisi için ligand seçimi iki faktör tarafından etkilenir. Birincisi, ligand saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir. İkincisi, ligandın bağlama aktivitesini tahrip etmeden matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır. Ligandın maddeyi bağlama afinitesinin serbest çözültide  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  M arasında olması idealdir.  $10^{-4}$  M'dan daha büyük ayrışma sabitlerini içine alan etkileşmeler (bir enzim ve zayıf bir inhibitörü arasındaki ilgi gibi ), başarılı afinite kromatografisi için uygun değildir.  $10^{-8}$  M'dan daha küçük ayrışma sabitlerine sahip olan maddeler (bir hormon ve reseptörü arasındaki etkileşme gibi)'den meydana gelen afinite kromatografisinde ise, bağlı maddelerin inaktive edilmeden elüsyonu zor olacaktır.

Ligandın matrikse bağlandığı bölgenin seçimi önemlidir. Ligand çeşitli fonksiyonel gruplara sahipse, saflaştırılacak molekülle en az ihtimalle spesifik etkileşme verecek grup vasıtasıyla matrikse bağlanmalıdır (Lehninger, 2011).

### 1.2.3. Uzantı Kolu

Biyolojik bir maddenin aktif bölgesi, genellikle molekülün derinliklerine yerleşmiştir. Küçük ligandları doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlamayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar .

Uzantı kolunun uzunluğu önemlidir. Şayet çok kısa ise, kol etkisiz olur ve ligand numunedeki maddeyi bağlayamaz. Aksine çok uzunsa, spesifik olmayan etkiler fazla olur ve ayırmanın seçiciliği azalır ( O'carra *et al.*, 1973 )

#### 1.2.4. Ligandı Bağlayacak Jelin Seçimi

Ligandı bağlayacak jelin uygun şekilde seçimi için, ligand molekülünde bulunan bağlanma gruplarının tipi ve saflaştırılacak madde ile bağlanma reaksiyonunun tabiatına dikkat edilir ve ona göre karar verilir. Ligandın matrikse kovalent bağlanması, normal bağlanma reaksiyonunu minimum engellemek amacıyla, molekülün en az etkili bölgesine yapılmalıdır. Örneğin, amino grupları ihtiva eden bir enzim inhibitörü, matrikse amino grupları vasıtasıyla bağlanabilir; bu suretle inhibitörün enzimle spesifik bağlanma aktivitesi korunmuş olur. Bununla birlikte amino grupları da bağlanma reaksiyonuna girerlerse, bu durumda zorunlu olmayan başka bir grupla bağlamak gerekecektir. Ligandlardaki bağlanma bölgelerinin yeri hakkında önceden bilgi bulunmadığı durumlarda, deneme-yanılma yöntemi kullanılmalıdır.

Ligandı immobilize etmek için çoğunlukla kullanılan gruplar, Tablo 12.1.4.1.'de verilmiştir. Bu grupların her biri tarafından ligandların bağlanabileceği jeller de karşılarında gösterilmiştir (Lehninger, 2011).

**Tablo 1.2.** Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlandıkları jeller.

<i>Ligand</i>	<i>Fonksiyonel Grup</i>	<i>Bağlanacak Jel</i>
Protein, peptid, aminoasit	Amino	CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B
		CH- Sepharose 4B
		Aktifleştirilmiş CH-Sepharose 4B
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
	Karboksil	AH-Sepharose 4B
	Tiyol	Tiyopropil- Sepharose 6B
		Aktifleştirilmiş tiyol sepharose
		Epoksi aktif.- Sepharose 6B
Şeker	Hidroksil	Epoksi aktif.- Sepharose 6B
	Amino	CH- Sepharose 4B
		Aktif.CH- Sepharose 4B
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
Karboksil	AH- Sepharose 4B	
Polinükleotit	Amino	CNBr ile aktif. Sepharose 4B
		Tiyopropil- Sepharose 6B
Koenzim, kofaktör, antibiyotik, steroid vs.	Amino, karboksil, tiyol veya hidroksil	Uzantı kollu jel kullanarak

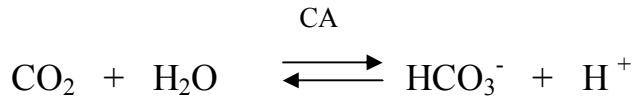
### 1.2.5. Afinite Kromatografisi Türleri

1. Pseudo-Spesifik Afinite Kromatografisi
2. Metal Şelat Afinite Kromatografisi
3. Kovalent Afinite Kromatografisi
4. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
5. Yük Transfer Adsorpsiyon Kromatografisi
6. Boya-Ligand Afinite Kromatografisi

### 1.3. Karbonik Anhidraz

#### 1.3.1. Fizyolojik Fonksiyonları

Karbonik anhidraz bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  iyonu içeren bir metaloenzimdir (karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1). İlk defa sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz (CA), canlılarda  $CO_2$ 'nin hidratasyonu ve  $HCO_3^-$ 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (Supuran, 2011).



CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir, daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükrüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, sığır kemik iliği çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Son olarak Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Beydemir *et al.*, 2002; Beydemir ve Gülçin, 2004; Feldstein ve Silverman, 1984; Krungkrai *et al.*, 2001).

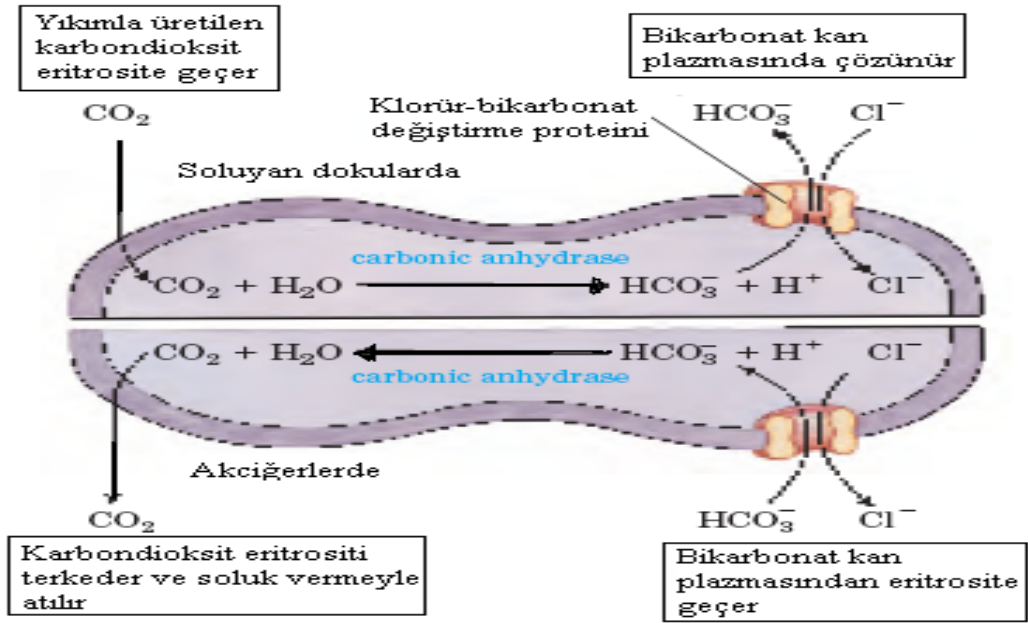
Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde, enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır (Supuran ve Scozzafava, 2001; Wistrand, 1981; Holmes, 1977; Chegwiddden *et al.*, 2000).

Yeşil bitkiler, fotosentetik hücre kloroplastları vasıtasıyla, gün ışığı varlığında fotosentez yapabilmek için atmosferden karbondioksit kullanılır. Gaz halindeki karbondioksit, bitkinin yapraklarında bikarbonat iyonları halinde taşınır. Hem kara hem de su bitkilerindeki CA enzimi, bikarbonat iyonlarının tekrar karbondioksit d6n6smesini sağlar (Arslan, 1994 ).

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile son derece 6nemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği g6r6lmektedir. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidrasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin end6striyel organik sentezlerde kullanımını g6ndeme getirmiştir (Arslan, 1995 ).

CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH d6zenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak 6zere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku / organlar ile akciğer arasındaki CO<sub>2</sub> / bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO<sub>2</sub> homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve 6re sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, t6m6r oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda g6rev alır (Chegwidden *et al.*, 2000; Supuran ve Scozzafava, 2000).

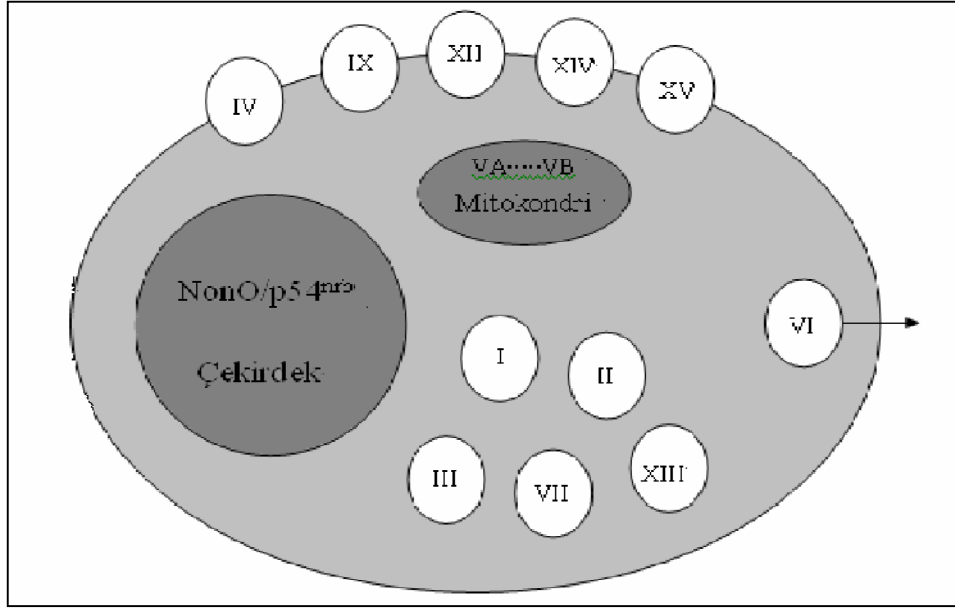




**Şekil 1.7.** Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi. Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan  $\text{HCO}_3^-$ 'in giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın  $\text{CO}_2$  taşıma kapasitesini artırmaktır (Lehninger, 2005).

### 1.3.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere izoenzim veya izozim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktrlerine 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 (Devlin, 2002).



**Şekil 1.8.** Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin sematik olarak hücredeki yerleşimleri[Aydoğan, 2006]

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 nonkataliktir (VIII, X, XI) (Supuran *et al.*, 2003; Supuran *et al.*, 2004). CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izozimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimori, 2004; Hilvo *et al.*, 2005).

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

Genelde insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu izoenzimler ortaya çıkarılmıştır. CA-I, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır. Eritrositlerde CA-I izoenzimi yanında CA-II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları ise, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan  $\text{CO}_2$ 'i,  $\text{HCO}_3^-$ 'a, akciğer pulmoner kapilerde ise  $\text{HCO}_3^-$ 'ın  $\text{CO}_2$ 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır (Şekil 1.2). CA-I izoenziminin turnover sayısı  $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu CA-II kadar açık değildir. CA-I eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Ren ve Lindskog, 1992; Sly ve Hu, 1995; Supuran ve Scozzafava, 2001).

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

Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, CA-II ve CA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan CA-II izoenziminin önemi, glaucoma hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. (Renzi *et al.*, 2000). Böbrek korteksinde ise membrana yapışık halde olan CA-II izoenzimi ile  $\text{Na}^+$  ve  $\text{H}_2\text{O}$ 'nun geri emilimi sağlanmaktadır. CA-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 CA-II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Maren *et al.*, 1997).

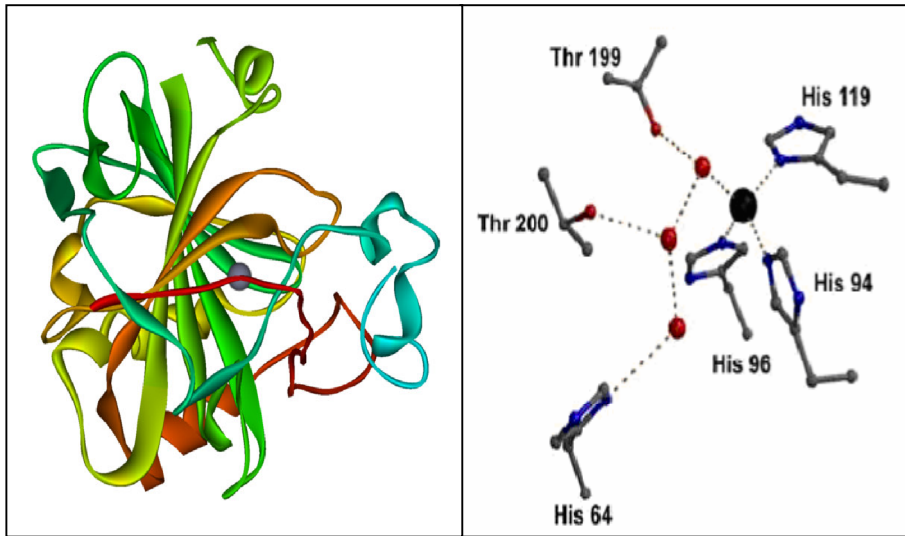
**Tablo 1.3.** Karbonik anhidraz izoenzimleri (Lindskog 1997).

<b>İZOENZİM</b>	<b>KATALİTİK AKTİVİTE</b>	<b>BULUNDUĞU BÖLGE</b>
CA I	Düşük	Sitozol
CA II	Yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Membrana bağlı
CA V	Orta-yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Tükürükte gizli
CA VII	Yüksek	Sitozol
CA-RP VIII	Akatalitik	Muhtamelen sitozolik
CA IX	Yüksek	Membrana bağlı
CA-RP X	Akatalitik	Bilinmiyor
CA-RP XI	Akatalitik	Membrana bağlı
CA XII	Düşük	Membrana bağlı
CA XIII	Muhtemelen yüksek	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Membrana bağlı

### 1.3.3. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarında büyük farklılıklar gözlenmektedir. izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına karşın, aktif bölgelerindeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. şekil 1.9'de gösterildiği gibi, her bir izoenzimin aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü koordine olmuştur.  $Zn^{+2}$  iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA enzimleri, tam anlamıyla aktiviteden yoksundurlar(Lindskog, 1997; Mohanty ve Kannan, 1998; Lindskog ve Coleman, 1973; Lowe *et al.*, 1991).

Karbonik anhidrazın sözü edilen üç izoenzimi, yapıları yönünden çok benzemesine rağmen, aktiviteleri açısından farklılık göstermektedir. CA-II izoenzimi CA-I izoenziminden 60 ile 100 kat daha fazla aktif olup, bilinen enzimler arasında katalitik aktivitesi en yüksek olanıdır. CA-III ise, en az aktif olan izoenzimdir ve CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi CA-I izoenziminin %5 kadardır (Wistrand, 1980; Ryon *et al.*, 1982).



**Şekil 1.9.** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119) (Büyük küre Zn<sup>+2</sup> iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir.)( Lindskog, 1997).

$\alpha$ -CA,  $\beta$ -CA ve  $\gamma$ -CA olarak adlandırılan, evrimsel açıdan ilişkisiz üç farklı familyada varlığı tespit edilen CA'lar, şaşırtıcı yeni buluşlardan biridir (Hewett *et al.*, 1996). Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimler arasında önemli bir fark yoktur, aksine onların hepsinde çinko iyonu vardır. Bundan dolayı bu familyaların hepsi, katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapıdalardır (Hewett ve Emmett, 2000).

### 1.3.3.1. $\alpha$ -Karbonik anhidrazlar

İnsan CA-I ve CA-II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA-III, yassı formu bir sığın CA-V'i ve E. coli'de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir. Bu izoenzim formlarının genel yapıları çok benzerdir. Moleküller neredeyse küresel, yaklaşık boyutları ise  $5 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$ 'tür. Molekülün kalan kısmına gevşek şekilde bağlı olan amino terminal bölge haricinde (yaklaşık 24 aminoasit), bu  $\alpha$ -CA'lar tek etki alanlı proteinler olarak düşünülebilir (Lesburg ve Christianson, 1995).

Molekülün geri kalan kısmına zayıfça bağlanan amino terminal bölgesinin dışında,  $\alpha$ -CA bir bölge proteini olarak düşünülebilir. Yapının ikinci bölgesi on iplikçik ve molekülü iki eşit parçaya bölen sarılmış bir  $\beta$  şeridinden oluşmuştur. Paralel iplikçiklerin iki parçası dışında, diğer  $\beta$  şeritleri antiparalel olarak uzanmışlardır. Diğerlerine nispetle daha kısa olan heliksler, molekülün yüzeyine yerleşmişlerdir (Boriack-Sjodin *et al.*, 1995).

Aktivite bölgesi, neredeyse molekülün merkezine uzanan büyük, koni biçimli bir oyukta bulunur. Çinko iyonu bu oyukun tabanına yakındır. Dördüncü ligandın  $\text{H}_2\text{O}$  veya  $\text{OH}^-$  olduğu tetrahedral geometrideki His-94, His-96 ve His-119'dan üç azot atomuna bağlıdır. Ligandlar proteindeki diğer gruplara hidrojen bağlarıyla tutunmuş ve bir "dolaylı ligand" kabuğu oluşturmuştur (Lesburg ve Christianson, 1995).

Metal iyonlu ligandlar ve dolaylı ligandların  $\alpha$ -CA amino asit dizilişleri sabittir. Doğrudan ve dolaylı çinko ligandlarına ek olarak, sıralı bütün  $\alpha$ -CA'larda 17 aminoasit rezidüsü kesin şekilde korunur. Bu rezidülerden bazıları katalitik aktivite açısından önem taşırken, diğerleri protein yapısının kararlılığında rol oynar. Esasen bilinen, bütün  $\alpha$ -CA ailesi ve  $\alpha$ -CA ile ilişkili proteinler içinde, sadece 10 aminoasit rezidüsü tamamen sabittir. Bu rezidülerden bazılarının insan CA II'nin kararlılığı açısından önemi, bölgeye özel mutajenez ile test edilmiştir.

### 1.3.3.2. $\beta$ -Karbonik anhidrazlar

Henüz hiçbir  $\beta$ -CA yapısı belirlenmemiştir. Doğal ve mutant bezelye kloroplast CA'sı çapraz bağ çalışmaları, enzimin belirlenen bir alt birimin oktamer yapısında olduğunu kuvvetle savunur. 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 (Björkbacka *et al.*, 1997).

### 1.3.3.3. $\gamma$ -Karbonik anhidrazlar

Son araştırmalarda *M. thermophila*'dan elde edilen bir yapı olarak  $\gamma$ -CA'nın yapısı ortaya konmuştur. Bu trimetrik molekül  $\alpha$ -CA'lardan tamamen farklı katlanmalara sahip olup ve bu bölge kalıtsal bölgeyi vurgulamaktadır. Her bir ünite, her dönüş başına üç kısa iplikçik bulunan sol el  $\beta$ -heliks yapısının yedi dönüşü ile olmaktadır. 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. *M. thermophila* CA'sındaki ve insan CA-II'deki metal merkezli bu pozisyon önemli benzerlikler gösterir ve bu durumda katalitik fonksiyonların yakın olması da çinko bağlı bölgelerin benzer olmasından ileri gelmektedir (Kisker *et al.*, 1996).

### 1.3.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz  $\text{CO}_2$  molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanısıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sulfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında aşağıdaki tablodan da görüldüğü üzere elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil pirüvatların hidratasyonu, pirüvik sulfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlediği bilinmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Kaiser, 1969; Jabusch, 1989).

**Tablo 1.4.** Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri (Özensoy, 2002)

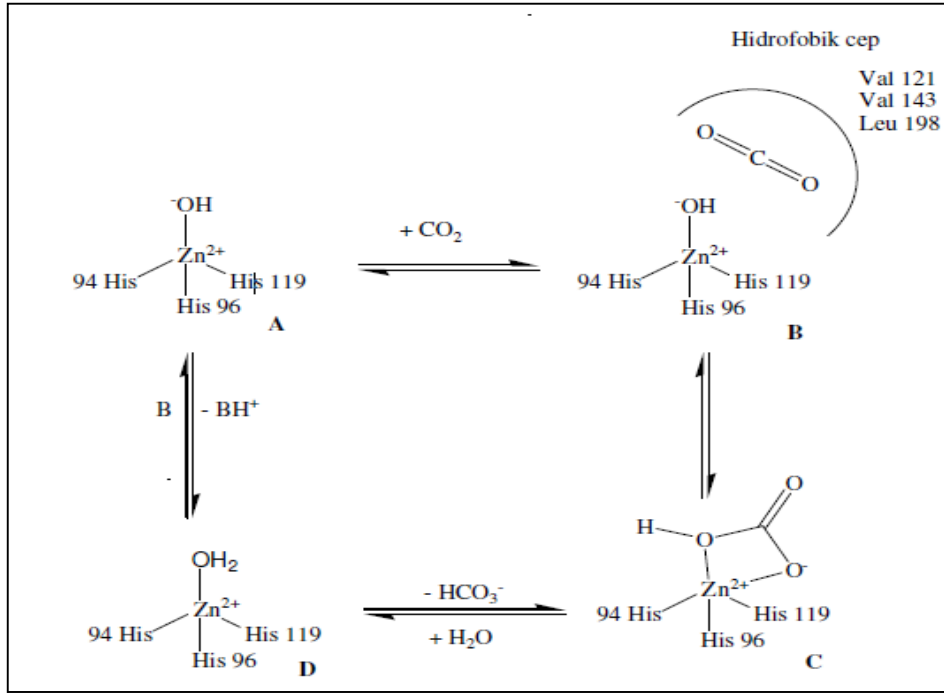
(1)	$\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
(2)	$\text{O}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCOOH}$
(3)	$\text{HN}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCONH}_2$
(4)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



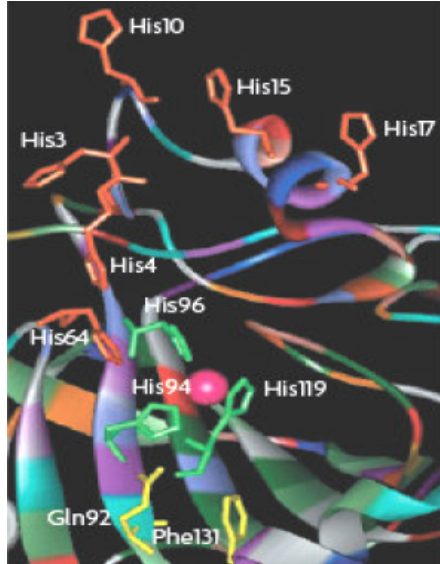
### 1.3.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son 20 yıldır CA enzimini katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır (Lindskog ve Silverman, 2000). Bu çalışmalarla elde edilen sonuçlara göre, CA enziminin, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Aktif bölgede  $Zn^{+2}$  iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. Aktif bölge yakınındaki aminoasitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmiştir (Lindskog and Silverman 2000).

CA enziminin reaksiyonları katalizinde,  $Zn^{+2}$  iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-ray kristalografi sonuçları, metal iyonunun bir  $H_2O$  veya  $OH^-$  iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96, His 119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki  $15^\circ$  derinliğindeki bir yarımın tabanında yer alandığını göstermektedir. Çinko bağlı  $H_2O$ , Glu106'nın karboksilat grubuna sırasıyla köprü oluşturan Thr199'un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilik karakterini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun yerdeki  $CO_2$ ' ye doğru hareket etmektedir (Arslan 1994).  $Zn^{+2}$  iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur (Şekil 1.10-A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla  $CO_2$  molekülüne saldırır (Şekil 1.10-B). Bu da,  $Zn^{+2}$  iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 1.10-C). Daha sonra,  $HCO_3^-$  iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunun sonucunda,  $Zn^{+2}$  iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da Şekil 1.10-D 'de görüldüğü gibi enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Lindskog 1997). Ana form A' nın rejenerasyonu için aktif kısımdan çevreye bir proton transferi reaksiyonu oluşur, buna da ya çözeltinin aktif kısmı( His64 gibi – diğerleri arasında, izoenzim I, II, IV, VII ve IX daki proton mekiği ya da ortamda mevcut tampon yardımcı olur. Reaksiyon mekanizması, şematik olarak Denklem 1.10 ve 1.11 de sunulmuştur(Scozzafava ve Supuran, 2002).



**Şekil 1.10.** CA enziminin CO<sub>2</sub>-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi (Lindskog, 1997).



**Şekil 1.11.** CAII aktif kısmı. Zn(II) iyonu(merkez) ve 3 histidin ligantı ( His94, His 96, His119) görülmektedir. Anyon değiş-tokuşunun karboksiterminal kısmında gerçekleşmektedir (Scozzafava ve Supuran, 2002).

Katalizdeki hız sınırlaması ikinci reaksiyondur. Enzimin hidroksit kısımlarını rejenere eden proton transferidir (Zimmerman *et al.*, 2007). CAII, CAIV, CAV, CAVII ve CAIX gibi kataliz özellikli çok aktif izoenzimlerde süreç, bir histidin rezidüsü (His64) tarafından, en etkili CA izoenzimi CAII 'ye yönelik oldukça etkili proton transferi sürecini takiben aktif kısmın girişinde konuşlanır. Bu durum, ayrıca CA II' nin, bilinen en aktif enzim olduğunu açıklar (  $k_{cat} / K_m = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  degeri ile) ve aynı zamanda klinik uygulamaları olan inhibitörlerin dizaynı için önemli sonuçlar veren bir durum olmaktadır (Supuran, 2008).

### 1.3.6. Karbonik Anhidrazın Önemli İnhibitörleri

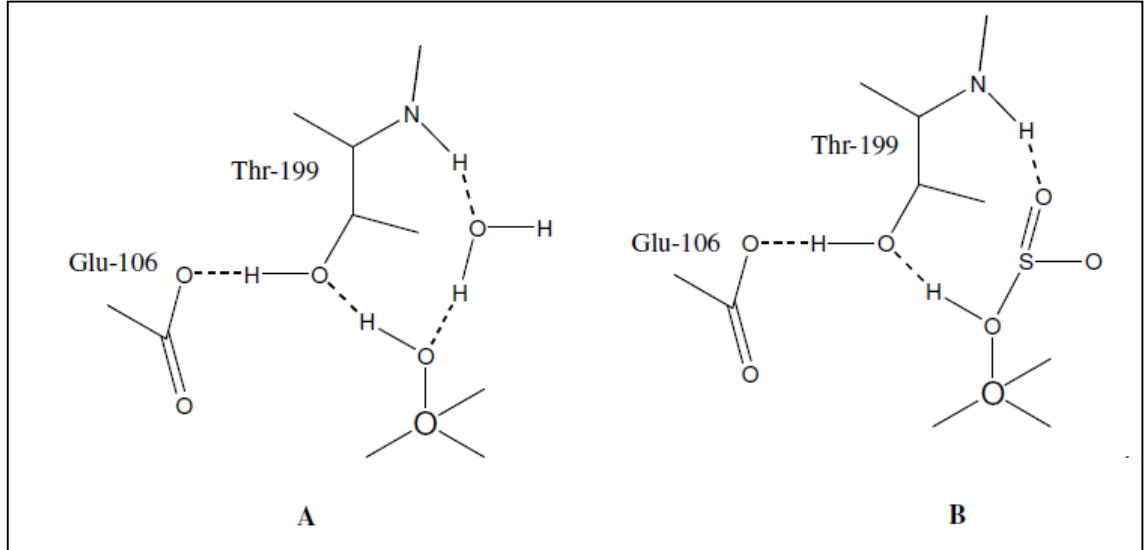
Çogu tek değerli anyon CA enzimini inhibe eder. Fakat bu iyonların konsantrasyonları: (sıgır CA-II, pH 7,55'de) birkaç mikromolar seviyesinde inhibisyon gösteren  $\text{CN}^-$  iyonu ve 1 M'lik iyon konsantrasyonunda inhibisyon gösteren  $\text{F}^-$  iyonunda olduğu gibi büyük değişiklik gösterir (Lindskog, 1982).

İnhibisyonun pH bağımlılığına ve  $2 \text{Co}^{+2}$ 'nin yer değiştirdiği enzimin optik spektrum üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar, anyonik inhibitörlerin metal iyonuna bağlandığı ve katalitik  $\text{CO}_2$  hidrasyonunda önemli bir rolü olan  $\text{OH}^-$  iyonunun oluşumunu önlediği sonucuna varılmıştır.  $2 \text{Co}^{+2}$  ile ilgili spektrumlar bazı anyonların sadece çinko bağlı çözücü molekülü yerinden ederek tetrahedral koordinasyonu sağladığını, diğer anyonlarınsa pentahedral koordinasyon yapısı oluşturduğunu ileri sürmektedir (Lindskog, 1982).

Lund Üniversitesinde Profesör Anders Liljas'ın labarotuarında yapılan insan CA-II alışmaları başta olmak üzere, son kristalografik çalışmalar, anyonik inhibitörlerin çeşitli bağ biçimlerine yeni bir ışık tutmuştur. Aktif bölgenin önemli bir özelliği çinkoya bağlı  $\text{H}_2\text{O}$  veya  $\text{OH}^-$  iyonu içeren Glu-106 ve Thr-199 bulunduran indirekt liganddaki bir H bağlanma sistemidir.

Glu-106 büyük olasılıkla iyonlaşmıştır ve bu nedenle, hidrojen bağı Thr-199 ile bir alıcı görevi görmelidir. Sonuç olarak, Thr-199'un hidroksil grubunun, metal bağı 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 (Liljas *et al.*, 1994).

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 grubu ile hidrojen bağı oluşturur. Üçüncü oksijen atomu 0,31 nm mesafeden çinkoya doğru yönelir (Mangani ve Hakansson, 1992).



**Şekil 1.12.** CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının sematik çizimleri. (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 (Simonsson and Lindskog 1982). 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 (Hakansson *et al.*, 1992).

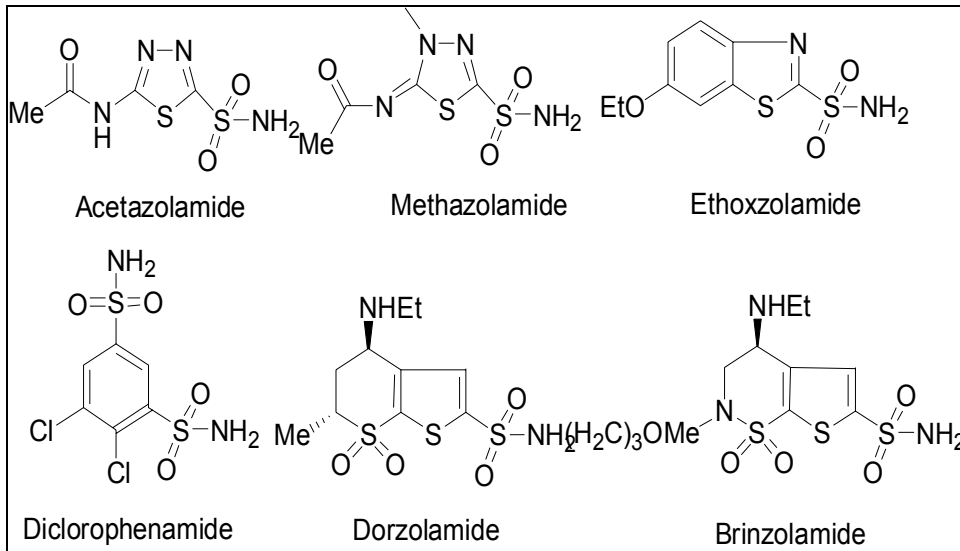
Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.



Sülfonamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfonamid ligand olarakta kullanılmaktadır (Roughton ve Booth, 1946; Tozlu, 1997).

CA'nın en güçlü organik inhibitörleri aromatik veya hetero aromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerdir. Sülfon amidlerin genelde CA-II için K<sub>i</sub> değerleri 10<sup>-5</sup> ile 10<sup>-10</sup> M arasında değişir. Glokom hastalığı tedavisinde CA'nın güçlü inhibitörlerinden olan asetazolamid kullanılmaktadır. Oral yoldan verilen bu ilacın oldukça fazla yan etkileri vardır. Bu yan etkileri azaltmak ve daha etkili bir ilaç molekülü bulmak amacıyla bir çok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan CA-II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Supuran ve Scozzafava, 2001; Bülbül *et al.*, 2002).

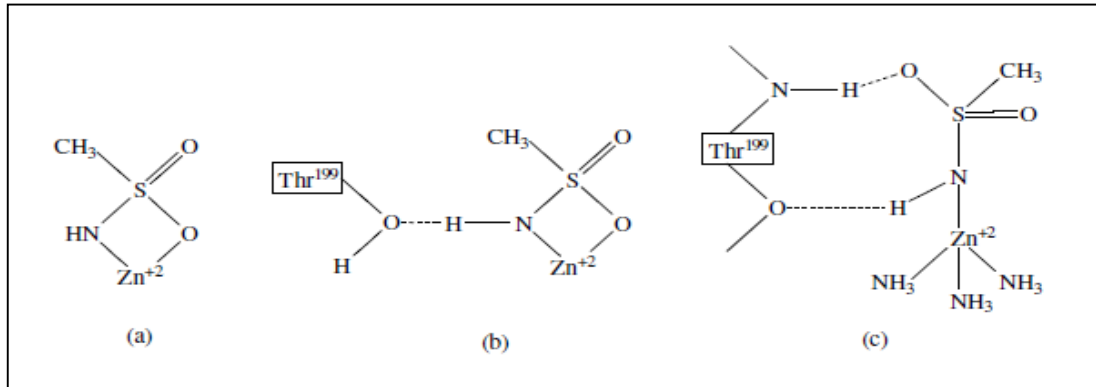
Günümüzde sülfonamidler glokom hastalığı tedavisi dışında diüretik, antibakteriyel ve antifungal ilaç olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Bu sebepten dünyanın bir çok yerinde farklı gruplar tarafından yeni sülfonamid türevleri sentezlenmektedir. Asetazolamid, metazolamid, etazolamid, diklofenamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi bazı önemli sülfonamid türevleri aşağıda verilmiştir. Sülfonamidler antiglokom ilacı kullanımının yanı sıra CA-IX ile kanser dokularının direk ilişkisi olması sebebiyle kanser teşhisinde kullanılabilir. Ayrıca CA enzimi inhibitörü olan bu moleküllerin yapılan birçok çalışma sonucunda antiobezite, antifungal, antibakteriyel, diüretik ilaç olarakta kullanılabileceği belirtilmiştir (Supuran, 2008).



**Şekil 1.13.** Bazı Sülfanamidlerin açık formülleri

**Tablo 1.5.** Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin Hücre içi Yerleşimleri ve Sülfonamidlere ilgisi (Lindskog, 1997).

İzoenzim	Kataliz Aktivitesi (CO <sub>2</sub> hidrasyonu)	Sülfonamidler için Afinite	Hücre içi Yerleşim
CA I	Düşük ( CAII'nin %10'u )	Orta	Sitozol
CA II	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük ( CAII'nin %0.3'ü )	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CA VA	Orta-Yüksek*	Yüksek	Mitokondri
CA VB	Yüksek	Yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Yüksek	Salgı halinde
CA VII	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CA VIII	Akatalitik		Sitozol
CA IX	Orta	Yüksek	Transmembran
CARP X	Akatalitik		Sitozol
CARP XI	Akatalitik		Sitozol
CA XII	Düşük	Yüksek	Transmembran
CA XIII	Orta	Yüksek	Sitozol
CA XIV	Düşük	Yüksek	Transmembran
CA XV	Düşük	Yüksek	Membrana bağlı

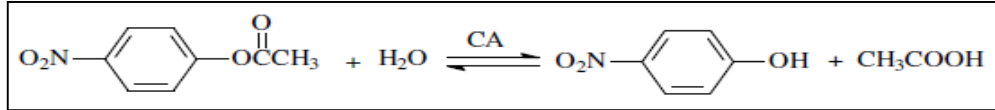


**Şekil 1.14.** Sülfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzimine Bağlanması (Özensoy, 2002).

### 1.3.7. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodları

#### 1.3.7.1. Esteraz Aktivitesi

Kinetik çalışmalarda, CA aktivitesi ölçümleri bu yöntemle yapılmaktadır. Bu yöntem, CA'nın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır (Mc Intosh 1970). Prensip olarak, karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitrofenol ve p-nitrofenolata hidroliz etmekte ve bu da 348 nm dalga boyunda absorpsiyon vermektedir. Reaksiyon denklemi şöyledir;



Ölçümü yapılan 348 nm'deki dalga boyu, p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun izosbestlik olduğu, yani her ikisinin de aynı absorpsiyon verdiği bölgedir.

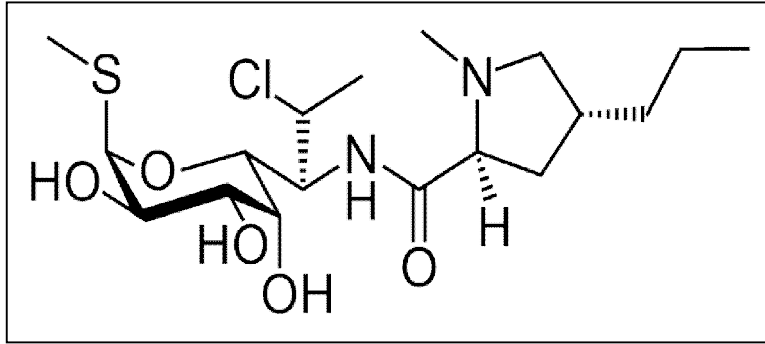
Fenol grupları asidik oldukları için ortamın pH'sına göre, değişen oranda, fenolat ve H<sup>+</sup> iyonlarına ayrılır. 348 nm dalga boyunda p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun absorpsiyonları aynı anda okunabildiği için bu durum absorpsiyon ölçümünü etkilemez. p-nitrofenol bileşiminin molar ekstiriksiyon katsayısı,  $\hat{I}_{348} = 5.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$  'dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil asetatın çok az bir absorpsiyonu vardır ve  $\hat{I}_{348} = 0.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$  molar ekstiriksiyon katsayısına sahiptir.



## 1.4. Deneyde kullanılan ilaçlar ve özellikleri

### 1.4.1. Klindamisin

Klindamisin antimikrobiyal bir ajan olarak dünyada otuz yıldan fazla süredir kullanılmaktadır ve geniş spektrumdaki fakültatif ve zorunlu anaerobik bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde etkili olarak kullanılmaktadır (Brook *et al.*, 2005).



Şekil 1.15. Klindamisin'in molekül yapısı

Klindamisin bakterilerin 50S ribozomal alt ünitesindeki protein sentezini engelleyerek etkinliğini gösterir böylece bakterinin peptit zinciri oluşmasını engeller. Aynı zamanda bakterilerde mRNA'ya ve aminoasit taşıyan tRNA'ya da bağlanarak protein sentezinin inhibisyonuna yardımcı olur (Brook *et al.*, 2005; Addy and Martin, 2005). Klindamisin çeşitli fakültatif ve zorunlu anaerobik bakterilere karşı yüksek derecede *in vitro* aktiviteye sahiptir. Etki spektrumuna giren gram-pozitif mikroorganizmalar; *Actinomyces*, *Eubactehum*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* türleri ve bu türlerin penisiline dirençli olan suşlarıdır. Klindamisin aynı zamanda  $\beta$ -hemolytic streptococci (A. B. C. Ve G grupları), *Streptococcus viridans* grubu ve *S.millieri* grubuna etkilidir.

Zorunlu anaeroblar içerisinde gram-negatif türlere karşı *Porphyromonas* türleri, *Prevotella* türleri, *Bacteroides fragilis* grubu, *Veillonella* grubu ve *Fusobacterium* grubu ve  $\beta$ -laktamaz üreten suşlar dahil olmak üzere etkilidir. *Eikenella corrodens*, *Haemophilus* türleri, *Moraxella* türleri, ve *Escherichia coli* gibi gram negatif fakültatif organizmalara karşı bu antibiyotik çok etkili olmamasına rağmen bu organizmalar dental enfeksiyonlarda major patojenler olarak gözlenmemektedir.

Klindamisinin direkt ribozomal ünitelerdeki antibakteriyel etkisinin yanı sıra kendine özgü çok önemli farmakolojik etkilere sahiptir. Klindamisin mukozal yüzeylerdeki epitelyal hücrelere bakterilerin tutunmasını engellediği ve virulans faktörlerini inhibe ettiği ispatlanmış tek antibiyotiktir. Buna ilaveten A grubu  $\beta$ -hemolytic streptococci'nin ürettiği M proteini inhibe ederek fakültatif gram-pozitif *Streptococcus* türlerinin kapsül oluşturmasını engeller. *Clostridium* türlerinin *S aureus*'un ürettikleri toksinleri inhibe eder. Bununla birlikte bakteri hedef dokunun içinde iken oluşturduğu bakteriyel proteinleri, toksinleri, enzimleri ve sitokinleri inhibe eder.

Klindamisin bakterinin yüzeyinde morfolojik değişikliklere sebep olarak bakteriyi öldürülmeye daha yatkın bir hale getirir. Aynı zamanda kemotaksisi stimule eder ve polimorfonükleer lökositlerin enfeksiyon alanına mobilizasyonu gerçekleşir ve böylece bakterinin öldürülmesi sağlanır (Brook *et al.*, 2005).

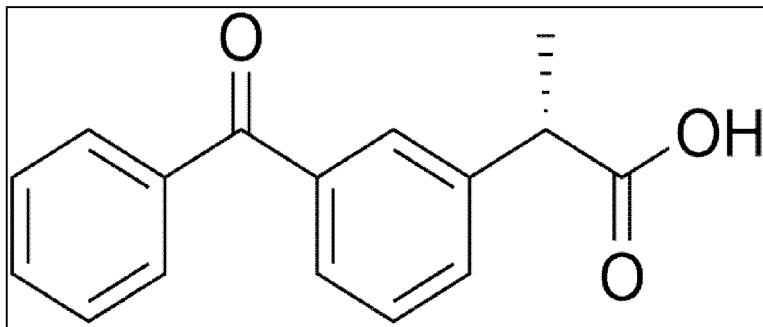
#### **1.4.2. Deksketoprofen Trometamol**

Arilpropiyonik asit grubundan nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlarda S(+) ve R(-) enantiyomerleri 50:50 oranlarında bir karışım halinde bulunur; bunlardan yalnızca S(+)- enantiyomeri COX inhibitörüdür (Hayball, 1996).

Ketoprofen, ibuprofen ve flurbiprofen gibi rasemik ilaçlarda enantiyomerik açıdan saf ilaçların kullanılmasının birçok avantajları olacağı öne sürülmüştür. Böylece hasta daha az ksenobiyotiğe maruz kalacak, metabolik ve renal yük azalacak, inversiyon yolu ile üretilen S-enantiyomerinin miktarında daha az değişkenlik görülecektir. Ayrıca R-enantiyomeri ve onun metabolitleri aracılığıyla meydana gelen yan etkiler engellenecek ve adipoz dokuda birikmelere neden olacak ilacın lipitlerle kaynaşmasının önüne geçilecektir (Wechter *et al.*, 1993; Evans, 1996).

Rasemik ketoprofen saf S(+)- ketoprofen (deksketoprofen) vermek üzere saflaştırılmıştır. Aktif ilacın çözünürlüğünü arttırmak ve akut ağrıda kullanıldığında görülen farmakokinetik görüntüsünü iyileştirmek için deksketoprofen trometamin tuzu geliştirilmiştir (Carganico *et al.*, 1994).

Deksketoprofen trometamol (S(+)-2-(3-benzoilfenil) propiyonik asidin trometamin tuzu), NSAİ ilaçlardan ketoprofenin toropatik olarak 1973'ten beri ağrı kesici, antienflamatuar ve ateş düşürücü etkili, dekstrorotatuar enantiyomerinin suda çözünebilen tuzu olup (Veys, 1991), prostaglandin sentezini in vitro şartlarda inhibe etme potansiyeli az dozda bile çok yüksek ajanlardan biridir. Bu etkisini (S)-(+)-enantiyomeri (deksketoprofen) nin (R) - (-) - enantiyomerinden yoksun olmasından kaynaklanmaktadır (Barbanoj *et al.*, 2001).



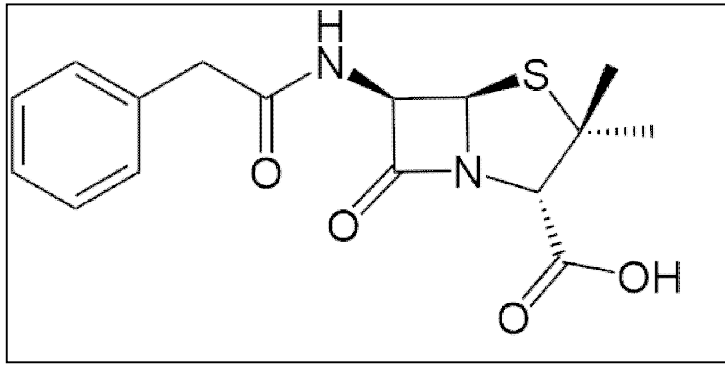
**Şekil 1.16.** Deksketoprofen Trometamol' in molekül yapısı

Deksketoprofen trometamolun ikili bir ağrı kesici etkisi vardır. Ya doğrudan lezyon yerinde (travma, enflamasyon, vb.) periferik seviyede, ya da doğrudan merkezi sinir sistemi üzerinden, merkezi seviyede etkide bulunur (Mauleon *et al.*, 1996). Periferik olarak, deksketoprofen trometamol, lokal olarak salınan prostaglandinlerin tetiklediği ağrı reseptörlerinin sensitizasyonunu inhibe ederek etkide bulunur. Buna karşılık merkezi olarak, COX aktivitesini inhibe ederek merkezi sensitizasyon etkisini azaltır, dolayısıyla ağrı yapıcı uyarının üst sinir merkezlerine aktarımını bloke eder (Mauleon *et al.*, 1996).

### 1.4.3. Benzil Penisilin

Penisilin G (Benzil Penisilin) aside dayanıksız olduğu için parenteral kullanılan ve intramüsküler (i.m.) enjeksiyonu ile iyi emilen doğal penisilin grubu üyesidir. İntramüsküler enjeksiyonu iyi emilir ve 1 milyon Ü'lik (600 mg) bir dozdan 30 dakika sonra plazmada 12 mg/l pik konsantrasyonuna ulaşır. Erişkinlerde serum yarı ömrü 30 dakika olup ciddi böbrek yetmezliklerinde yarılanma ömrü 10 saate çıkar. Penisilin G, Na<sup>+</sup> ya da K<sup>+</sup> tuzu şeklinde bulunur ve 1 milyon Ü'de 2.0 mEq Na<sup>+</sup> ya da 1.7 mEq K<sup>+</sup> içerir. Bu nedenle böbrek ve kalp yetmezliğinde dikkatle kullanılmalıdır. Penisilin G bir depo tuzu ile i.m. olarak (prokain veya benzatin) verildiğinde daha uzun süre (saatler veya günler) maksimum düzeylerin elde edilmesi mümkündür. Ancak bu tür penisilinlerin yalnızca i.m. kullanımık mümkündür. Prokain penisilin 300.000 Ü'lik formu yaklaşık 120 mg prokain içerir ve i.m. enjeksiyonunun ardından yaklaşık 12 saat yüksek serum ve doku konsantrasyonu oluşturur. Penisilin G prokain i.m. enjeksiyondan sonra 2-4 saat içinde maksimal plazma konsantrasyonuna ulaşır. Bir doz 600.000 Ü ile 2-3 saatte 1.5 Ü/ml, 24 saatte 0.2 Ü/ml pik düzeyi elde edilir. Penisilin G benzatinin i.m. uygulanması ile 3-4 haftalık düşük düzey elde etmek mümkündür. Tek doz 1.2 milyon Ü, i.m. enjeksiyon ile 1. gün 0.15 Ü/ml düzeyine erişilebilmektedir.

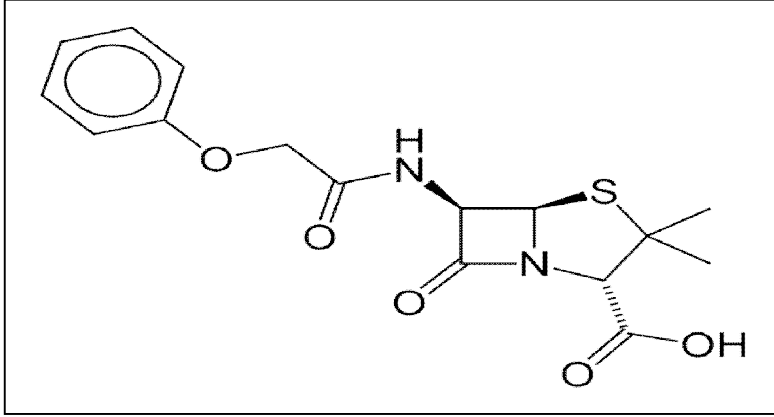
Penisilin G diğer penisilinler gibi meninkslerde inflamasyon olduğunda genellikle plazma konsantrasyonunun %5'i kadar BOS'a geçer. Verilen dozun yaklaşık %60-90'ı ilk saat içinde idrarla atılır. Bu özelliklerinden ötürü penisilin G, duyarlı suşlarla oluşan akut bakteriyel menenjit, osteomyelit, otitis media, alt solunum yolu enfeksiyonları ve yumuşak doku enfeksiyonlarında güvenle kullanılabilir (Kurt, 2000; Neu, 1982; Prince, 1983).



Şekil 1.17. Benzil Penisilin' in molekül yapısı

#### 1.4.4. Fenoksimetil Penisilin

Penisilin V (Fenoksimetilpenisilin) oral kullanımı olan tek doğal penisilindir. Gram pozitif bakterilere karşı etkinliği penisilin G'ye benzer. Enterik gram negatif bakteriler, *Haemophilus* ve *Neisseria*'ya karşı penisilin G'den 5-10 defa daha az aktif olduğundan sadece gram pozitif enfeksiyonlarda tercih edilmelidir. Yarılanma ömürleri kısa olduğu için dozlar gün içinde dörde bölünerek kullanılır. Penisilin V'nin yetişkinlerde 500 mg'lık oral uygulanımı, 600.000 Ü'lik prokain penisilin serum konsantrasyonuna eşdeğer serum konsantrasyonu oluşturur. Alışılmış doz çocuklarda 25-50 mg/kg/gün ve yetişkinlerde de 1-4 g/gün'dür. Çocuk ve yetişkinler için hazırlanan oral formları güvenle kullanılmaktadır(Kurt, 2000; Neu, 1982; Prince, 1983).



**Şekil 1.18** Fenoksimetil Penisilin' in molekül yapısı

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

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

Memeli dokularında şimdiye kadar 16 adet CA izoenzimi belirlenmiş ve bu izoenzimlerin farklı canlıların hangi dokularında eksprese oldukları araştırılmış ve hala bu konuda çalışmalar sürdürülmektedir (Lönnerholm *et al.*, 1985; Okuyama *et al.*, 1995; Parkkila ve Parkkila, 1996; Christie *et al.*, 1997; Raisanen *et al.*, 1999).

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

Hall ve Schaer (1983), kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Biogel iyon değişim kolonu kullanarak gökkuşuğı alabalıkları eritrositlerinden CA enzimi 3,7 kat saflaştırmışlardır. Buna ek olarak, insan eritrositlerinden CA-I izoenzimi 10366 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %39,5 verimle ve yaklaşık 1000 kat ve HCA-II ise 52200 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %22,4 verimle ve yaklaşık 5000 kat saflaştırılmıştır (Beydemir *et al.* 2002).

Enzim *Plasmodium falciparum*'dan katyon değiştirici Mono S kolonu, anyon değiştirici Mono Q kolonu ve Sepharose 12 jel filtrasyon kromatografisinin kombine edilmesiyle 18 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %6,5 verimle ve 66,7 kat saflaştırılmıştır (Krungkrai *et al.* 2001).

Banerjee ve arkadaşları (2004), rekombinant HCA-II'yi Sepharose-IDA-Zn<sup>2+</sup> afinitekolonu kullanarak 0,74 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %76 verimle ve 4,6 kat saflaştırmışlardır.

Karbonik anhidraz enzimleri pek çok dokudan saflaştırılmış ve moleköl kütleleri belirlenmiştir. Burt ve arkadaşlarının 1992'de yaptıkları bir çalışmada literatürde yüz sineği olarak ifade edilen *Musca autumnalis* larvalarından CA saflaştırılmış SDS-PAGE yapılarak enzimin saflığı kontrol edilmiş ve moleköl kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir.

Daha sonra enzimin doğal moleköl kütlelerini belirlemek amacıyla jel filtrasyon kromatografisi yapılmış ve 31.000 Da olarak tespit edilmiştir. Böylece enzimin aktif formunun monomerik yapıda olduğu gösterilmiştir. Krungkrai ve arkadaşlarının (2001), yaptıkları bir araştırmada, *Plasmodium falciparum*'dan saflaştırılan CA'nın moleköl kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir.



CA enzimleri hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının bir çoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül *et al.*, 2003). Örneğin insanlarda glokom hastalığında CA inhibitörleri farmakolojik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Casini *et al.*, 2002; Gülçin *et al.*, 2004).

Supuran ve arkadaşları (2011) *Dicentrarchus labrax* solungaçlarından CA enzimini Sepharose-4B-aniline-sulfanilamid afinite kolonunun kullanılmasıyla 935.42 EÜ/mg protein spesifik aktivite, % 72.42 verimle 108.4 kat saflaştırılmışlardır.

Ekinci ve arkadaşları (2011) *Dicentrarchus labrax* karaciğer dokusundan CA enzimini Sepharose-4B-tirozin-sulfanilamid afinite kolonunun kullanılmasıyla 751.72 EÜ/mg protein spesifik aktivite, % 46 verimle 78.8 kat saflaştırılmışlardır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

##### 3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	:	Hettich UNIVERSAL 320
Spektrofotometre	:	TU- 1810 DASPC UV-VIS
pH metre	:	Radiometer meterlab PHM 210
Elektroforez tankı	:	BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	:	Ismatec MCL
Karıştırıcı (Vorteks)	:	Heidolph Reaxtop

Hassas terazi	:	Gecavery (UK)
Otomatik pipet	:	Eppendorf
Çalkalayıcı	:	Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	:	Heidolph
Saf su cihazı	:	Nüve
Kar makinesi	:	Scotsman AF-20
Güç kaynağı	:	1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	:	Bosch
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar):	:	Ariston

### 3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

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

1. 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, pH=8,8 (Sepharose matrisleri üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO<sub>3</sub>, 950 ml destile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

2. 25 mM Tris-HCl/0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

3. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon) 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

4. 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0,5 M NaClO<sub>4</sub>, pH= 5,6 (kolona tutunmuş CA-II enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,04 g NaCH<sub>3</sub>COO.3H<sub>2</sub>O ve 9,187 g NaClO<sub>4</sub> 120 ml destile su ile çözülerek, 1 N HCl ile pH = 5,6'ya getirildikten sonra destile su ile hacim 150 ml'ye tamamlandı.
5. %0,9'luk NaCl (Homojenatın yıkanması için kullanılan çözelti): 4,5 g NaCl alınıp hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
6. 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub>, pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
7. %0,02'lik NaN<sub>3</sub> çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg NaN<sub>3</sub> alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
8. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0,65 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8) 1 ml %10'luk SDS ve 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β- merkaptoetanol ilave edildi.
9. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 ml suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
10. Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

11. Yıkama çözeltisi (elektroforez jelinin yıkanması için kullanılan çözelti): %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

12. Sabitleştirme çözeltisi (elektroforez jelindeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadarı hazırlandı.

13. Coomassie brilliant blue G-250, reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiliye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.

14. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi ( $\text{CO}_2$ -hidrataz aktivitesinde indikatör olarak kullanılan çözelti): 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra hacminin saf suyla 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

15. 1 M Tris-HCl pH=8,8: 12,1 g Tris 90 ml suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

16. 1 M Tris-HCl pH=6,8: 2,42 g Tris 5 ml suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.

17. %30'lük Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi: 6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid alınıp 13,84 ml suda çözüldü.

18. %10'lük SDS çözeltisi: 0,5 g SDS alınıp 4,5 ml suda çözüldü.

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

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Protein Tayini**

#### **3.2.1.1. Kalitatif protein tayini**

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel, 1968). Bu metod yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

#### **3.2.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini**

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı ve absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılan numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

### **3.2.2.Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini**

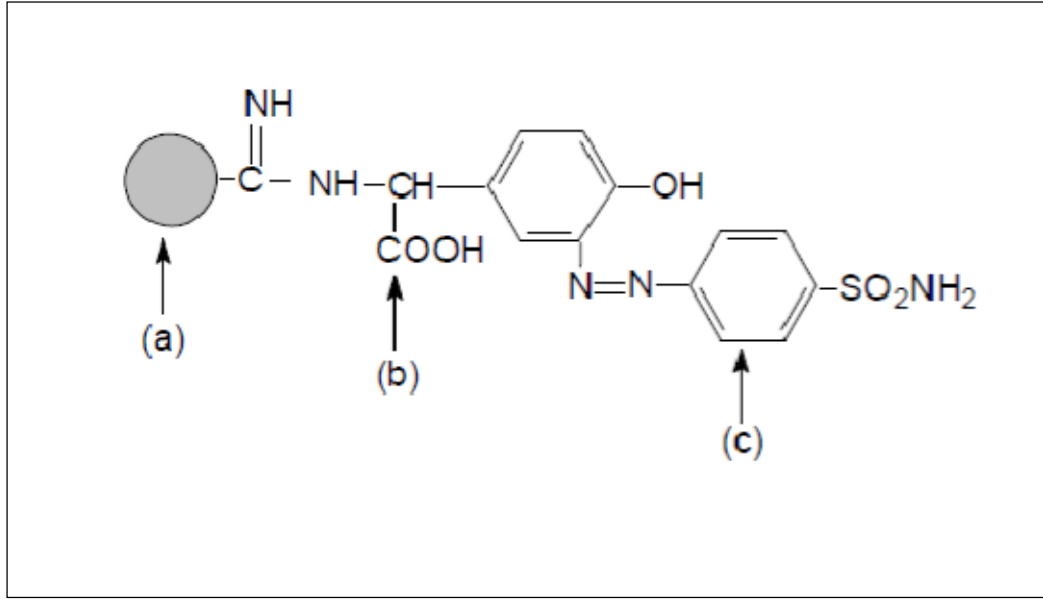
#### **3.2.2.1. Esteraz aktivitesi tayini**

Kinetik çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesi ölçümleri bu yöntemle yapıldı. Bu yöntem karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensipte olarak karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve bu da 348 nm'de absorpsiyon vermektedir ( $\epsilon_{348} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Verpoorte *et al.*, 1967).

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

#### **3.2. 3. Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid Afinite Jelinin Sentezi**

CA izoenzimlerinin 2. adımdaki saflaştırılması için, afinite jelinin organik sentezi yapılmıştır (Arslan, 1995). Matriks olarak kullanılan CNBr aktive edilmiş Sepharose-4B kullanılmıştır. Matriksle enzim arasındaki sterik engeli azaltmak amacı ile L-tirozin uzantı kolu, siyanojen bromür ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye bağlanmıştır. Bundan sonraki adım ise, ligandın (p-aminobenzen-sülfonamid) uzantı koluna bağlanmasıdır. Çalışma için sentezlenen afinite jelinin yapısı Şekil-3.1 de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için kullanılan afinite jelinin kimyasal yapısı. a) Matriks. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B b) Uzantı kolu. L-tirozin c) Sulfanilamid

Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunun, sulfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sulfanilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörü olup afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlanmıştır.

### 3.2.3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye Tirozin Bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B Buchner hunisine alındı ve 4°C'de 250 mL NaHCO<sub>3</sub> (0.1 M, pH 10.0) tamponu ile yıkandı. Daha sonra 20 mL tamponun içerisine alınan CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B ile aynı tampon içerisinde 15 mg tirozin içeren çözeltisi ilave edilerek 90 dakika yavaş tempoda 4°C'de karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde, yıkama suyu 280 nm dalga boyunda, absorbans vermeyinceye kadar destile su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu.



Yıkama son olarak 100 mL 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.80) tamponu ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye edilen CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B aynı tamponun 40 mL si içine alındı (Arslan, 1995).

### **3.2.3.2. p-aminobenzen-sulfonamidin Kenetlenmesi**

25 mg p-aminobenzen-sulfonamidin 0°C civarında 10 mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> İhtiva eden 0°C'deki 5 mL çözelti, p-aminobenzen-sulfonamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sulfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH 9.5' a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 litre destile su ve 200 mL 0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH 7.5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi (Clanis, 1990; Warburg ve Christian, 1941)

### **3.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü**

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

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yağma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi.

Yığıma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önleildi. Yığıma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi.

Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 100 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı.

Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Şekil 4.1).

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 5 ml 1 M Tris-HCl pH=8,8, 4,4 ml %30'luk akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml % 0,1'lik SDS, 0,13 ml % 5'lik TEMED (N,N, N',N'-Tetrametil etilen diamin) ve 3,13 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,27 ml %5'lik PER [amonyum persülfat, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>] eklendi. Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,41 ml 1 M Tris-HCl pH=6,8, 0,44 ml %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml % 0,1'lik SDS, 0,03 ml % 5'lik TEMED ve 2, 45 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,07 ml %5'lik PER eklendi.

### **3.2.5.Koyun Karaciğer Dokusundan Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması**

#### **3.2.5.1. Koyun karaciğeri temini ve hemolizat hazırlanması**

Deneyde kullanılan koyun karaciğer dokusu taze olarak temin edildi. Doku örneği kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Doku homojenatını hazırlamak için, ilk olarak doku küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak, 3 ml/g olacak şekilde 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,0) tampon çözeltisinin içinde +4 °C'de homojenize edildi. Elde edilen homojenat süzgeç kağıdı kullanılarak süzme işlemine tabi tutuldu. Bu işlemden sonra süspansiyon 60 dakika 13000 rpm'de 2 defa santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelek atıldı, süpernatant bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı

#### **3.2.5.2. Afinite kolonunun paketlenmesi**

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH=7,8) içine alınarak jel süspansiyonu edildi ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı Süspansiyon edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olup olmadığı eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

#### **3.2.5.3. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu**

Katı Tris ile pH sı 8,7'ye ayarlanmış olan hemolizat kolona tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl/22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH:8.7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1M NaCl/25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH:6,3) tamponu tatbik edilerek CAI enzimi; daha sonra 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH:5.6) çözeltisi kolona tatbik edilip CAII enzimi elüe edildi.

Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

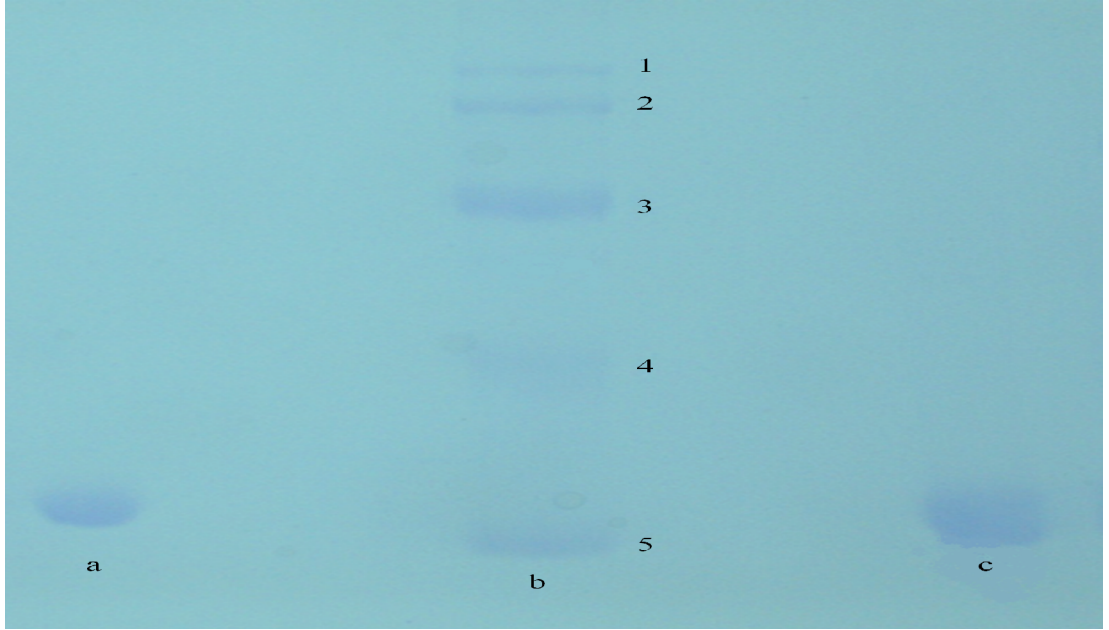
### 4.1. Sonuçlar

#### 4.1.1. Saflaştırma sonuçları

Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, bu bölümde çizelge ve şekiller ile gösterildi. Tablo 4.1’de, koyun karaciğeri CA-I ve CA-II izoenzimlerinin Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamaklarının sonuçlarını vermektedir. Ayrıca afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırma sonucu yapılan SDS-PAGE sonuçları verilmektedir (Şekil 4.1.).

**Tablo 4.1.** Koyun karaciğeri CA-I ve CA-II izoenzimlerinin Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.

Numune türü	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	155	42	16,86	708,12	6510	9,19	100	1,0
CA-I	521	8	0,47	3,76	4168	1108,51	64	120,62
CA-II	856	4	0,15	0,6	3424	5706,67	53	620,96



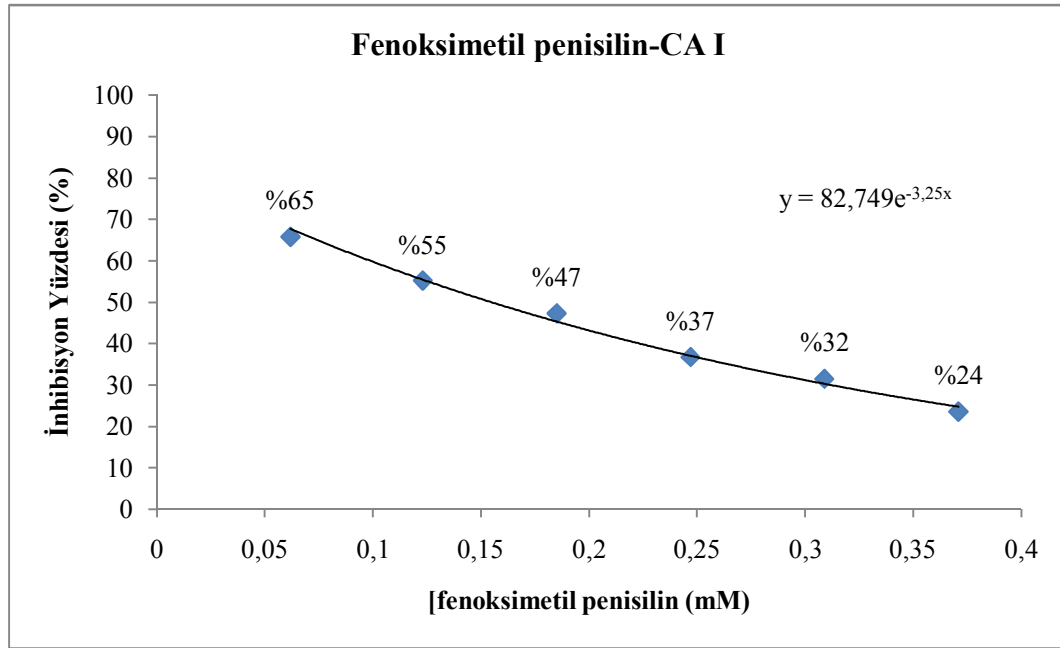
**Şekil 4.1.** Saflaştırılmış CA izoenzimlerinin SDS-PAGE'si. b Standardlar: 1. *E.coli*  $\beta$ -galoksidaz (116 kDa), 2. tavşan kası fosforilaz b (97 kDa), 3. sığır albümin (66 kDa); 4. ovalbümin (45 kDa), 5. sığır eritrosit CA (29 kDa), a: CA I, c: CA II.

#### 4.1.2. İnhibisyon çalışmaları sonuçları

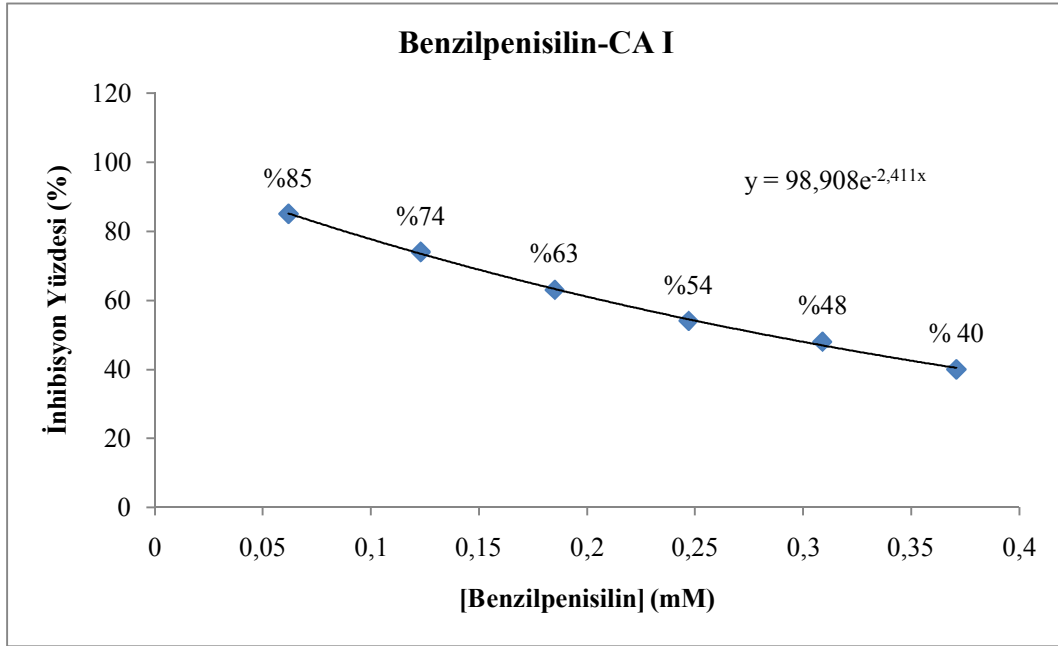
Koyun karaciğer karbonik anhidraz I ve II izoenzim aktivitesi üzerine Prokain benzilpenisilin (prokain penisilin), Fenoksimetil penisilin (penisilin V), Benzilpenisilin (penisilin G), Klindamisin, Deksketoprofen trometamol, Feniramin hidrojen maleat, Meloksikam, Metoklopramid, Rifamisin ve Diklofenak sodyumun inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı.

Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak koyun karaciğerinden saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II izoenzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırıldı. Konsantrasyona karşı % aktivite (%aktivite-[I]) olarak oluşturulan grafikler Şekil 4.1-4.8'de gösterildi. Eğrilerin denkleminde  $I_{50}$  değerleri hesaplandı.

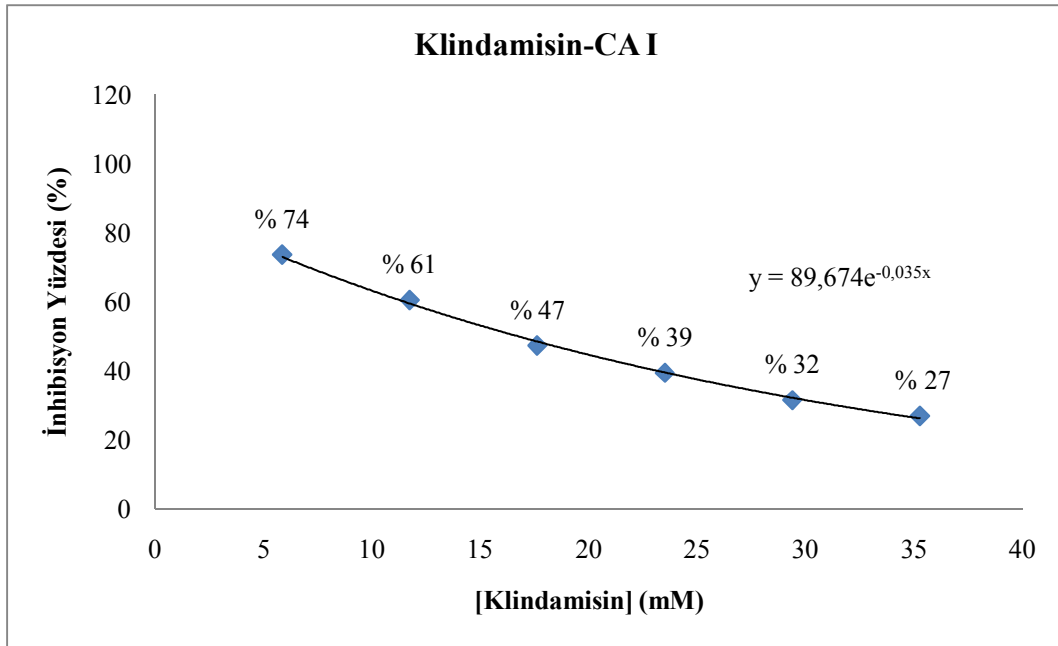
Bu inhibitörlerin  $K_i$  değerlerini belirlemek amacıyla, üç sabit inhibitör konsantrasyonunda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonu için elde edilen aktivite değerleri ile her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarı yarışmalı ve yarışmasız inhibisyon için  $V_{max}=V_i(1+[I]/K_i)$  formülünden yararlanılarak  $K_i$  değerleri belirlendi (Şekil 4.9-4.16)



**Şekil 4.2.** Fenoksimetil penisilin CA I izoenzimine karşı  $I_{50}$  grafiği.

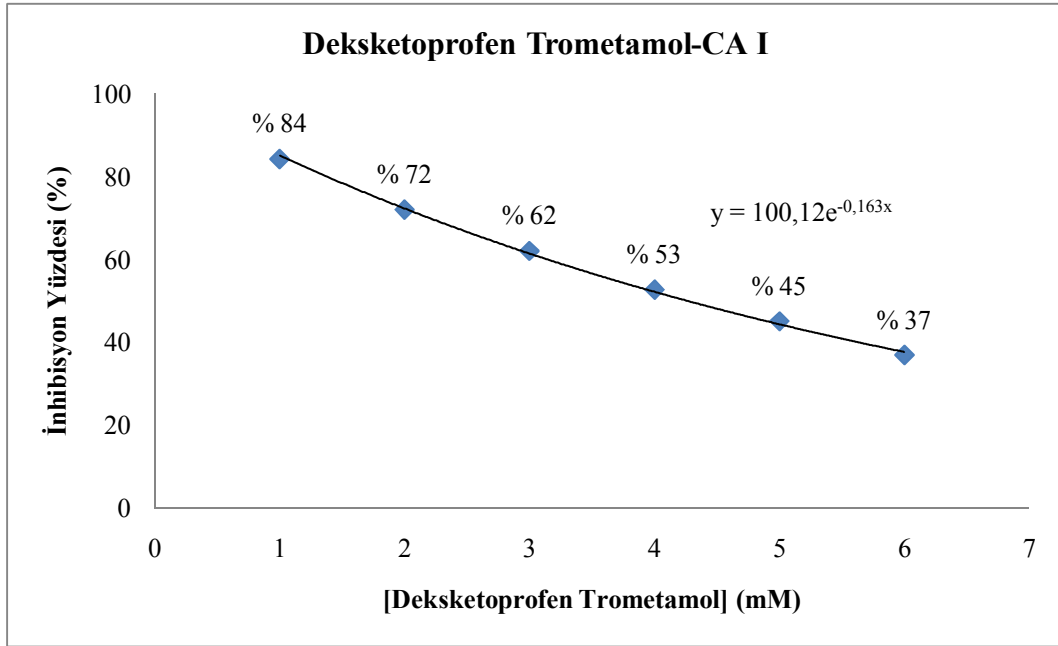


Şekil 4.3. Benzilpenisilin CA I izoenzimine karşı I<sub>50</sub> grafiği.

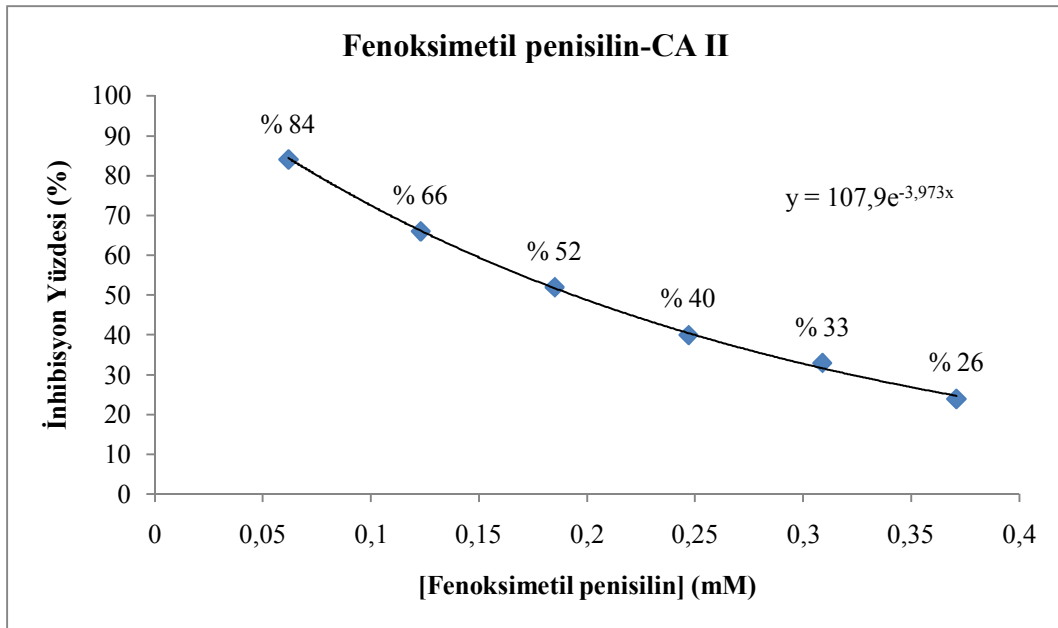


Şekil 4.4. Klindamisin CA I izoenzimine karşı I<sub>50</sub> grafiği.

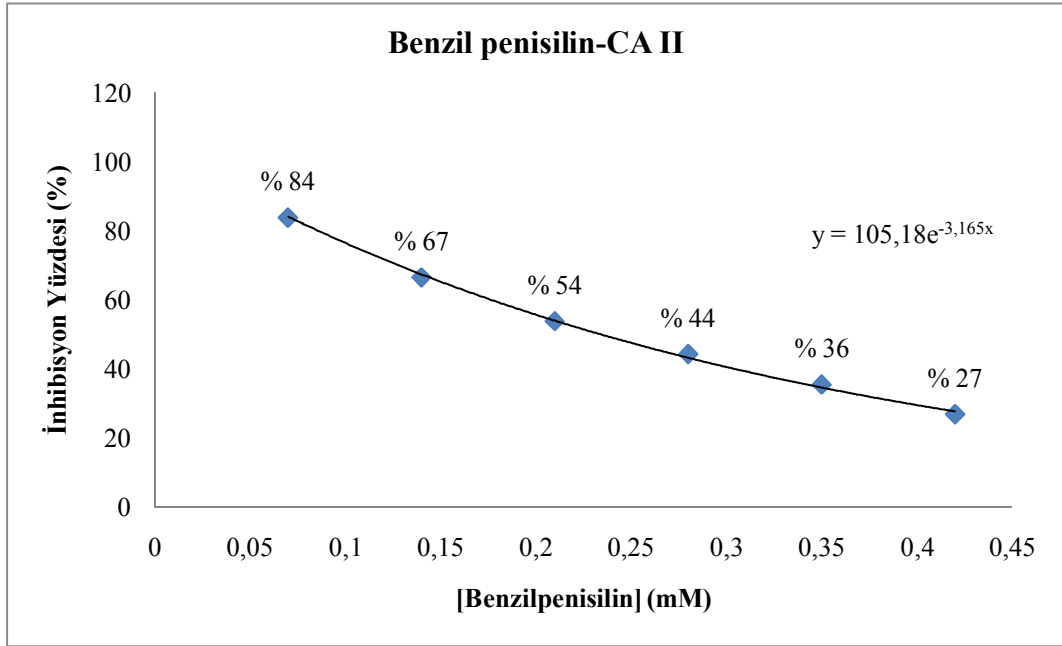




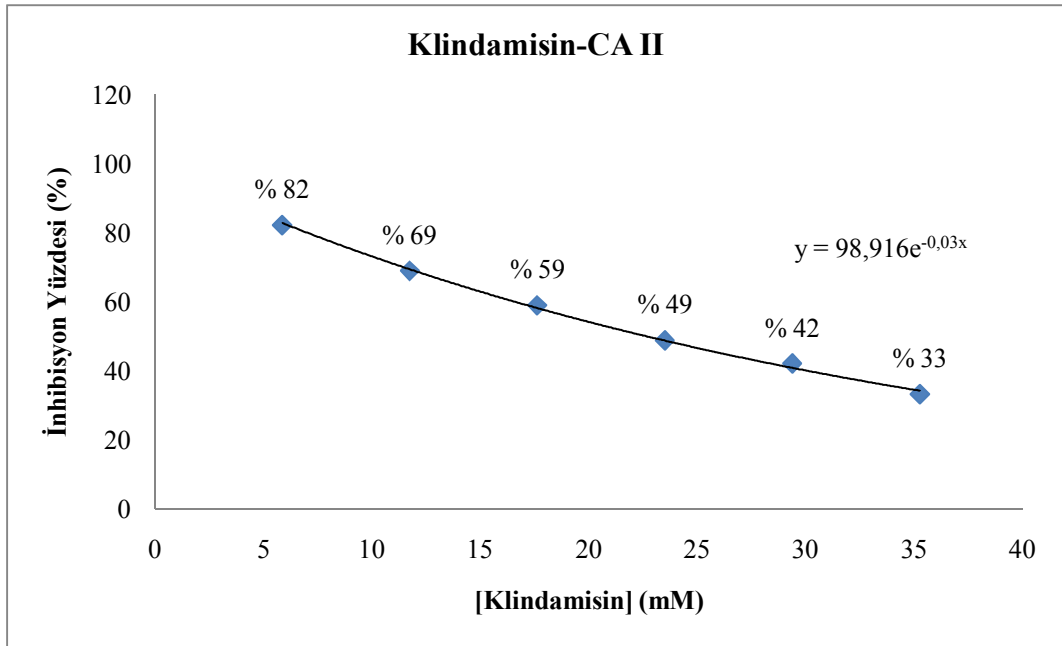
Şekil 4.5. Deksketoprofen Trometamol CA I izoenzimine karşı  $I_{50}$  grafiği.



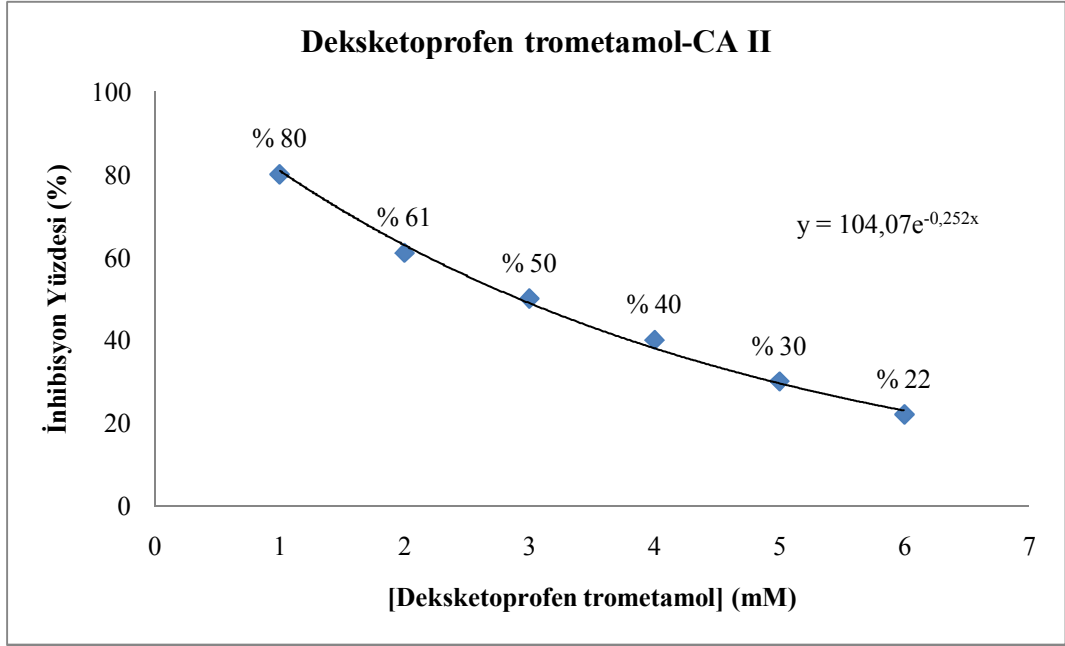
Şekil 4.6. Fenoksimetil penisilin CA II izoenzimine karşı  $I_{50}$  grafiği.



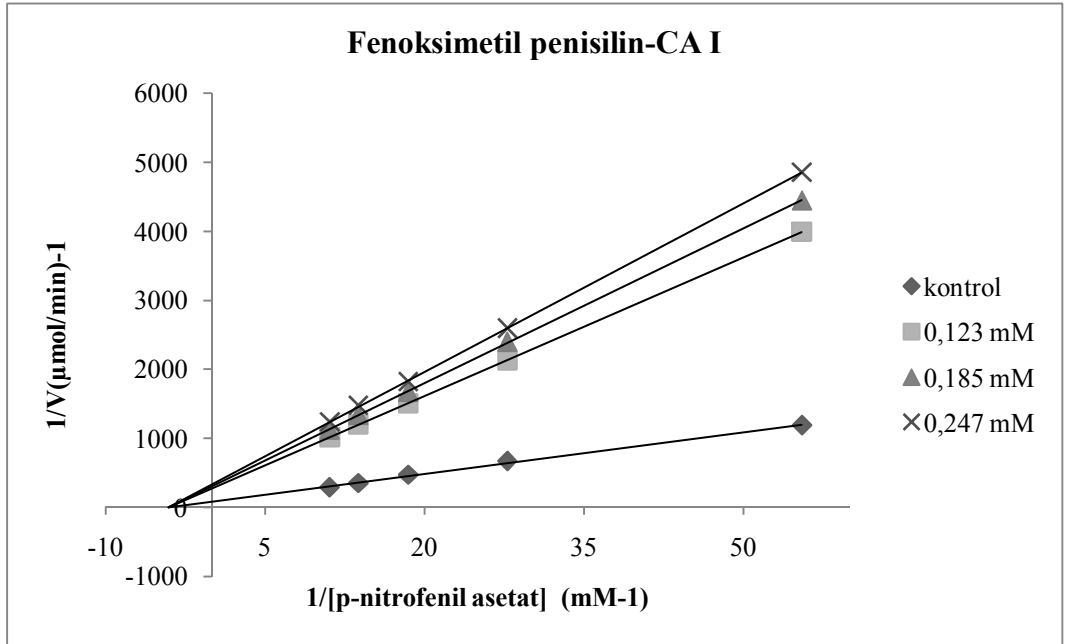
Şekil 4.7. Benzil penisilin CA II izoenzimine karşı  $I_{50}$  grafiği.



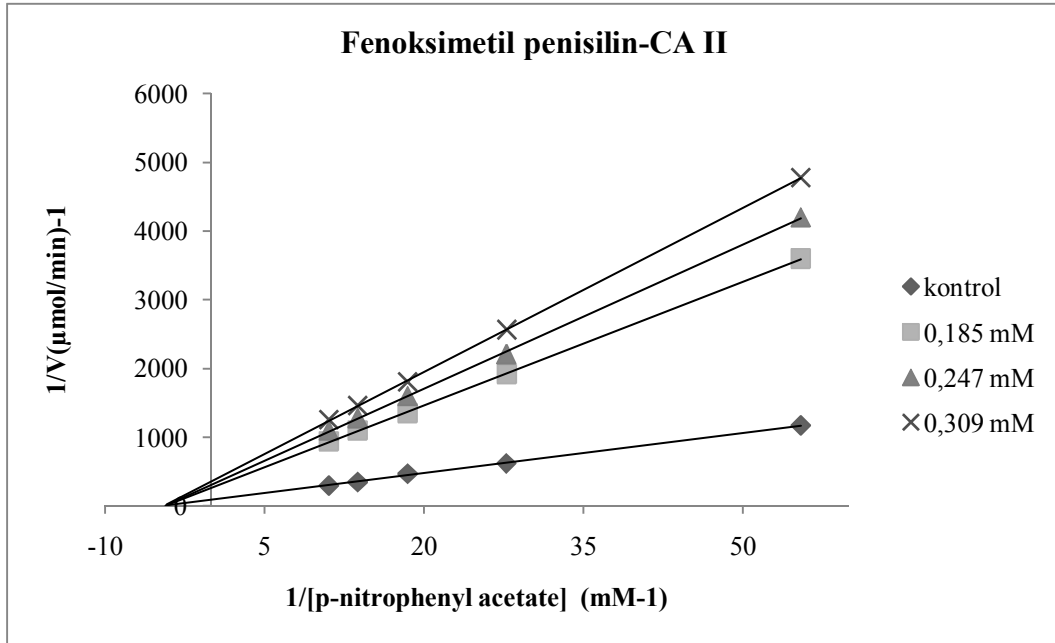
Şekil 4.8. Klindamisin CA II izoenzimine karşı  $I_{50}$  grafiği.



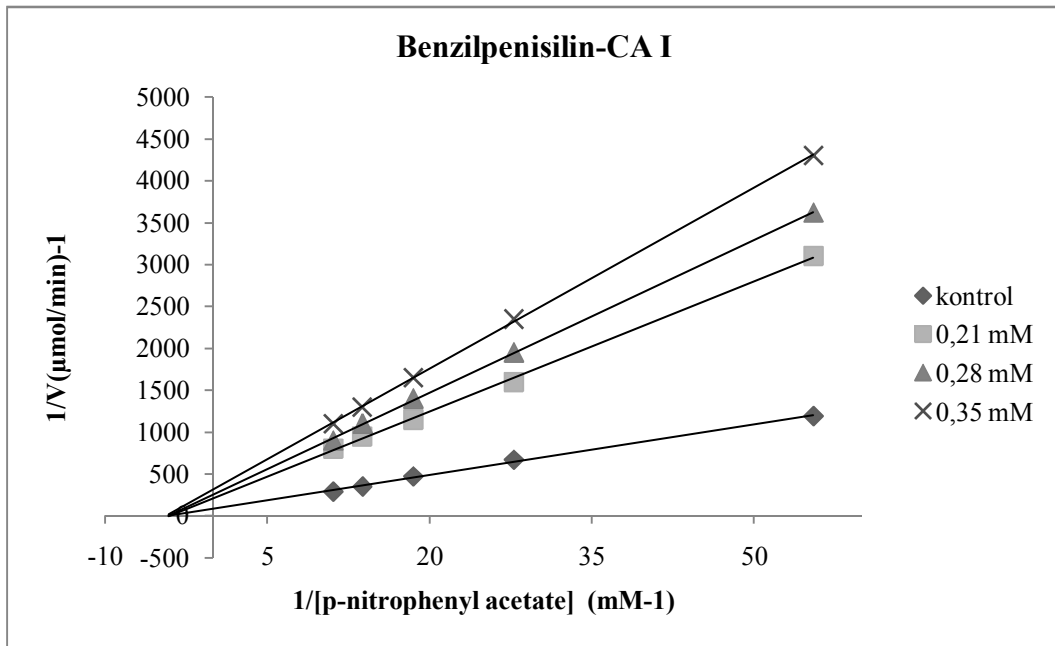
Şekil 4.9. Deksketoprofen trometamolün CA II izoenzimine karşı  $I_{50}$  grafiği.



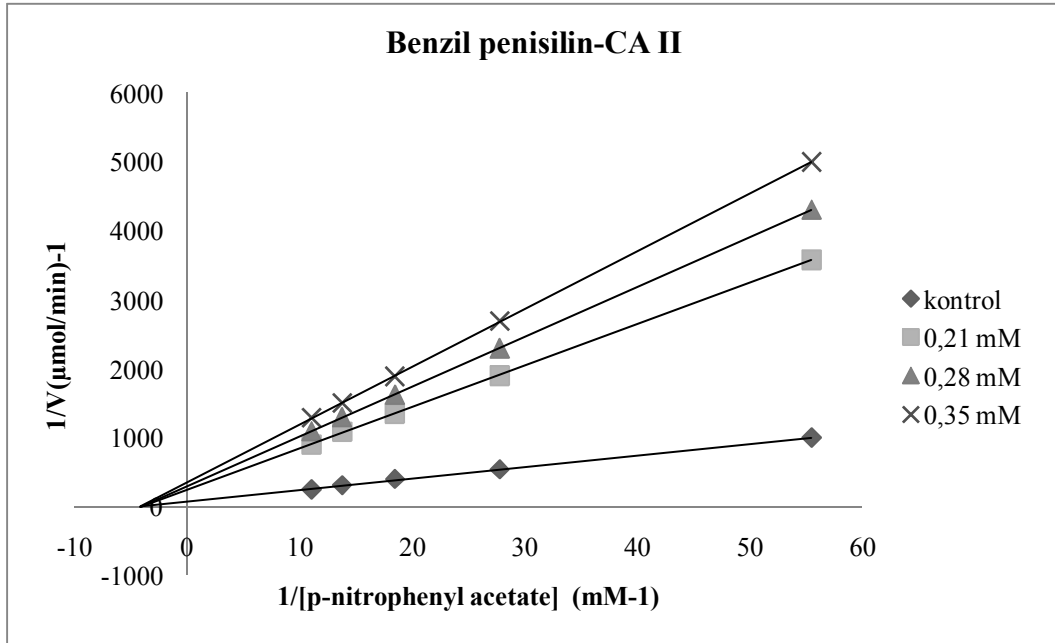
Şekil 4.10. Fenoksimetil penisilin CA I izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



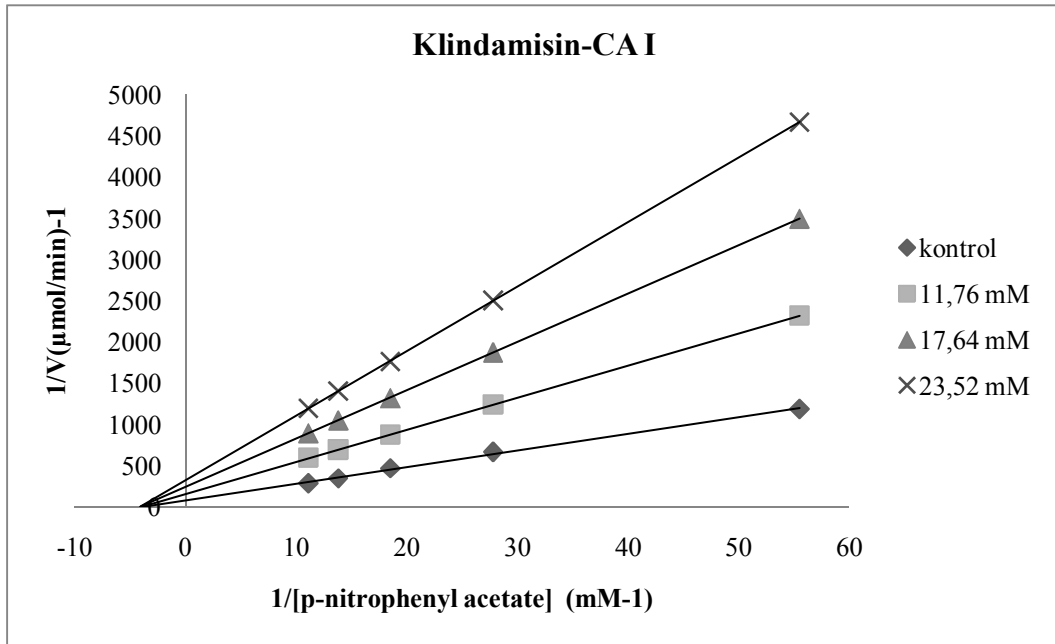
Şekil 4.11. Fenoksimetil penisilin CA II izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



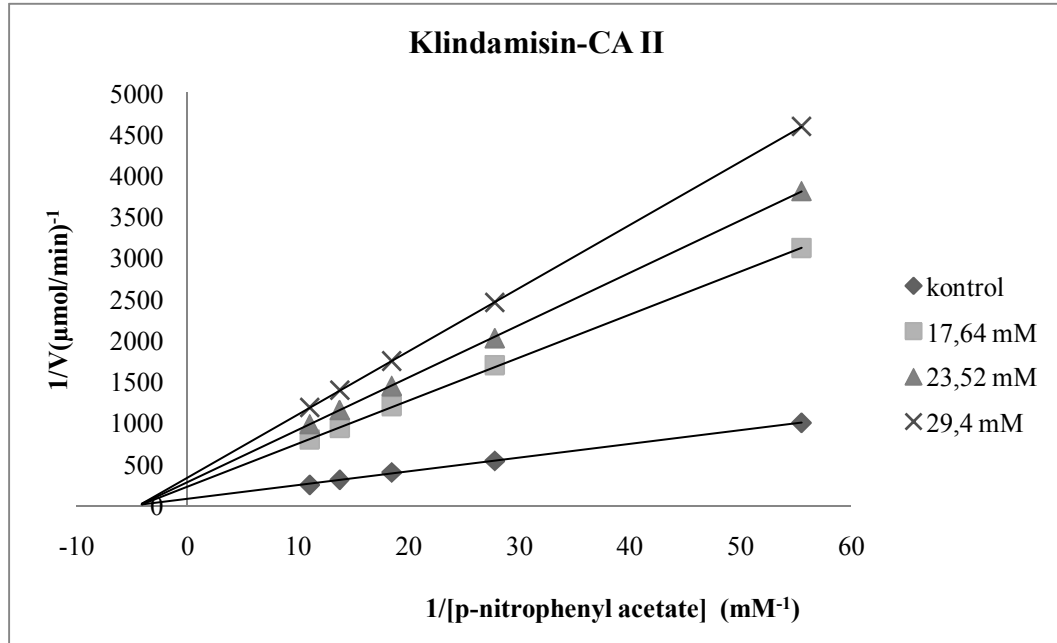
Şekil 4.12. Benzil penisilin CA I izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



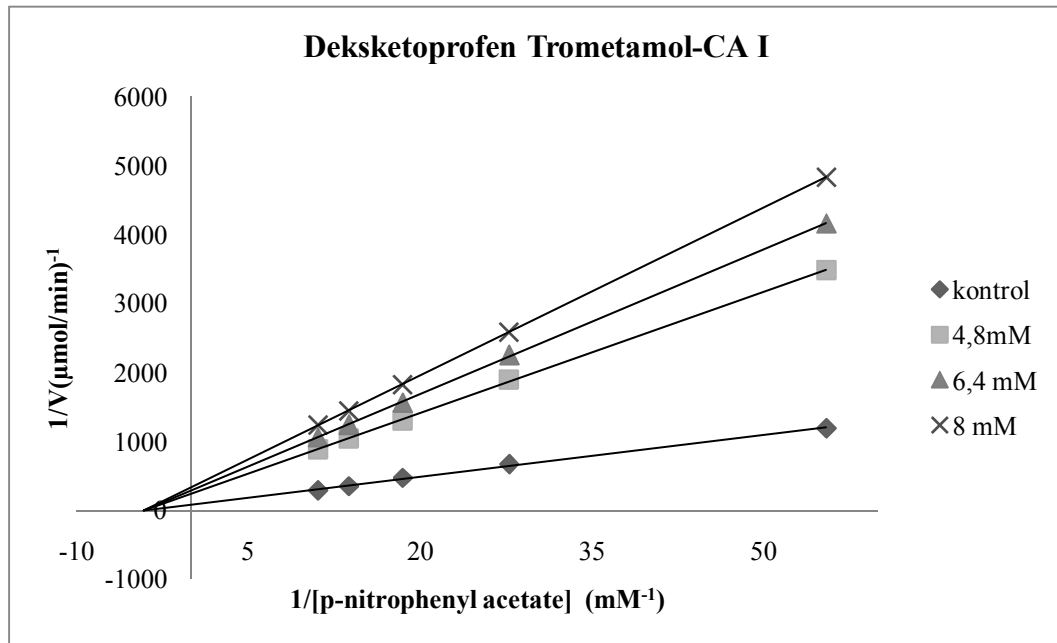
Şekil 4.13. Benzil penisilinin CA II izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



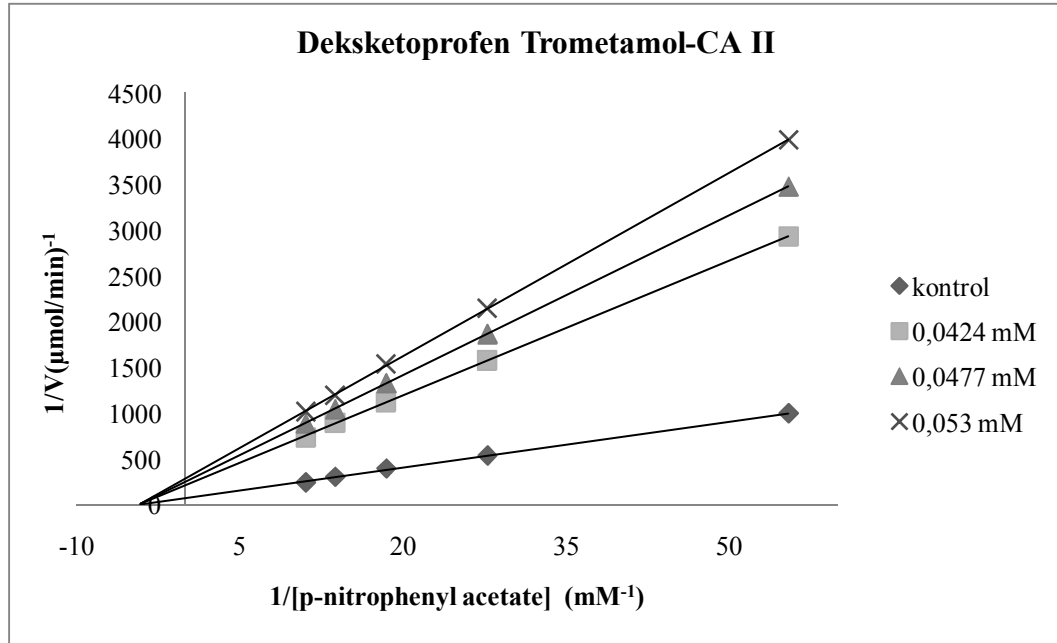
Şekil 4.14. Klindamisinin CA I izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



Şekil 4.15. Klindamisinin CA II izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



Şekil 4.16. Deksketoprofen Trometamol CA I izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



**Şekil 4.17.** Deksketoprofen Trometamol CA II izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.

**Tablo 4.2.** Denemesi yapılan etken maddelerin  $I_{50}$  değerleri.

İnhibitör	CA-I $I_{50}$ değeri (mM)	CA-II $I_{50}$ değeri (mM)
Fenoksimetil penisilin	0,155	0,1938
Benzilpenisilin	0,283	0,235
Klindamisin	15,76	22,74
Deksketoprofen trometamol	4,26	2,909

**Tablo 4.3.** Denemesi yapılan etken maddelerin  $K_i$  değerleri.

İnhibitör	CA I $K_i$ değeri (mM)	İnhibisyon türü	CA II $K_i$ değeri (mM)	İnhibisyon türü
Fenoksimetil penisilin	0,0686	yarışmasız	0,0833	yarışmasız
Benzilpenisilin	0,1	yarışmasız	0,1346	yarışmasız
Klindamisin	9,157	yarışmasız	9,752	yarışmasız
Deksketoprofen Trometamol	2,203	yarışmasız	2,717	yarışmasız

## 4.2. Tartışma

Bu çalışmamızda belirli ölçüde saflaştırılarak, saf izoenzimler üzerinde farklı gruplarda beş antibiyotik, üç antiinflamatuvar, bir antihistaminik ve antiemetik ilacın etken maddelerinin inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Enzimin saflığı inhibisyonu önemli derecede etkilediği düşünüldüğünde daha sağlıklı sonuçların elde edilebilmesi için enzimin saflaştırılmasının zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla, bu çalışmada tek bir basamakta yüzlerce kat saflaştırmayı sağlayan afinite kromatografi tekniği kullanılmıştır.

Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B'ye ligand (p-aminobenzen sulfonamid) L-tirozin bileşiği aracılığı ile immobilize edilmiştir. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörü olup, söz konusu izoenzimlerin kolonda yüksek pH'da bağlayarak çalışmamızda başarıyla kullanılmıştır.

Afinite kromatografisinde kullanılan jel, ardışık iki basamakta sentezlenmiştir. Önce matriks olarak seçilen CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış sulfonamid bileşiği katıldı. Sepharose-4B'nin matriks olarak seçilmesinin başlıca sebebi çok iyi akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmesidir. Tablo 4.1 de görüldüğü gibi CA I enzimi afinite kromatografisi ile koyun karaciğer dokusundan, spesifik aktivitesi 1108,51 (EÜ/mg protein) olan, %64 verimle ve yaklaşık 120 kat; CA II enzimi ise, spesifik aktivitesi 5706,67 (EÜ/mg protein) olan, %53 verimle ve yaklaşık 620 kat saflaştırılmıştır.

Hall ve Schaer (1983), kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Biogel iyon değişim kolonu kullanarak gökkuşağı alabalıkları eritrositlerinden CA enzimi 3,7 kat saflaştırmışlardır.



Buna ek olarak, insan eritrositlerinden CA-I izoenzimi 10366 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %39,5 verimle ve yaklaşık 1000 kat ve HCA-II ise 52200 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %22,4 verimle ve yaklaşık 5000 kat saflaştırılmıştır (Beydemir *et al.* 2002).

Enzim *Plasmodium falciparum*'dan katyon değiştirici Mono S kolonu, anyon değiştirici Mono Q kolonu ve Sepharose 12 jel filtrasyon kromatografisinin kombine edilmesiyle 18 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %6,5 verimle ve 66,7 kat saflaştırılmıştır (Krungkrai *et al.* 2001).

Banerjee ve arkadaşları (2004), rekombinant HCA-II'yi Sepharose-IDA-Zn<sup>2+</sup> afinitekolonu kullanarak 0,74 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %76 verimle ve 4,6 kat saflaştırmışlardır.

Literatürde kromatografik matriks olarak kullanılan bir başka bileşik EUPERGIT C-250 L ticari ismi ile temin edilen ve oksiran grupları içeren jeller de kullanılmıştır. Söz konusu bileşik bağlamada spesifik olmamasına rağmen, üzerinde taşıdığı oksiran grupları ile çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında kromatografik matriks olarak seçilmiştir. Ayrıca bu jel herhangi bir aktivasyona gerek duyulmadan ligand immobilize edilebilmektedir. Bunun yanında uzun süre kullanılabilir olması, mekanik etkilere karşı dayanıklı olması ve akış özelliğinin iyi olması sebebiyle de oldukça kullanışlıdır. Fakat yapılan bir çalışmada sepharose-4B ile sentezlenen afinite jeli ile Eupergit ile hazırlanan afinite jeli karşılaştırıldığında Sepharose-4B ile daha iyi akışkanlık ve saflık elde edilmiştir (Özensoy, 2004).

Supuran ve arkadaşları (2011) *Dicentrarchus labrax* solungaçlarından CA enzimini Sepharose-4B-aniline-sulfanilamid afinite kolonunun kullanılmasıyla 935.42 EÜ/mg protein spesifik aktivite, % 72.42 verimle 108.4 kat saflaştırılmışlardır.

Ekinci ve arkadaşları (2011) *Dicentrarchus labrax* karaciğer dokusundan CA enzimini Sepharose-4B-tirozin-sulfanilamid afinite kolonunun kullanılmasıyla 751.72 EÜ/mg protein spesifik aktivite, % 46 verimle 78.8 kat saflaştırılmışlardır.

Çalışmamızda kullanılan antibiyotiklerin, antiinflamatuvar, antiemetik ve antihistaminiklerin karaciğerde metabolize edilerek detoksifiye edildiği bilinmektedir.

Koyun karaciğer dokusundan bu affinite tekniğiyle saflaştırdığımız karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerinde *in vitro* inhibisyon etkileri araştırılmıştır. İnhibisyona neden olan antibiyotiklerin inhibisyon etkisi  $K_i$  ve  $I_{50}$  olmak üzere iki farklı degerle verilebilir. En pratik parametre  $I_{50}$  degeridir. Çünkü materyal ve yöntemde belirtildiği gibi  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit antibiyotik konsantrasyonunda beş farklı substrat konsantrasyonu için hız degerleri belirlenmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktivite belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan antibiyotik konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Fakat inhibisyon tipinin belirlenmesi için  $K_i$  degerinin hesaplanması gerekmektedir.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında uygulanan antibiyotikler içinde, çok düşük konsantrasyonda aktiviteyi % 50 azaltması ile CA I ve II izoenzimleri üzerinde denediğimiz en kuvvetli inhibitör Fenoksimetil penisilin ( $I_{50}$  mM; CA I: 0,155; CA II: 0,1938) olarak tespit edilmiştir.

Etkisini sağlam hücrelerde protein sentezini inhibe ederek gösteren benzil penisilin ( $I_{50}$  mM; CA I: 0,283; CA II: 0,235) yarışmasız olarak inhibisyon etkisi göstermiştir. Bunun yanısıra kullanımı yaygın olan klindamisin ( $I_{50}$  mM; CA I: 15,76; CA II: 22,74) antibiyotikler arasında en az etkiye sahip olmasıyla dikkat çekicidir.

Araştırmamızda kullanılan non steroid antiinflamatuvar olan Deksketoprofen trometamol ( $I_{50}$  mM; CA I: 4,26; CA II: 2,909) diğer etken maddelerden farklı olarak CA II izoenzimine ilgisinin fazla olduğunu görmekteyiz.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. Koyun karaciğerinden Karbonik anhidrazın I ve II izoenzimlerinin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.
2. Çalışma sonucunda koyun karaciğeri CA I enzimi % 64 verimle yaklaşık 120 kat saflaştırılabildiği görülmüştür. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlemlenmiştir.
3. CA II enzimi % 53 verimle yaklaşık 620 kat saflaştırılabildiği görülmüştür. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlemlenmiştir.
4. Koyun karaciğeri CA I ve II izoenzimleri üzerine bazı ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Prokain benzilpenisilin (prokain penisilin), Fenoksimetil penisilin (penisilin V), Benzilpenisilin (penisilin G), Klindamisin, Deksketoprofen trometamol, Feniramin hidrojen maleat, Meloksikam, Metoklopramid, Rifamisin ve Diklofenak sodyumun ihtiva eden ilaçların enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.
5. CA I ve II izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Fenoksimetil penisilin (penisilin V), Benzilpenisilin (penisilin G), Klindamisin ve Deksketoprofen trometamol etken maddeleri için  $I_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abbate, F., Supuran, C. T., Scozzafava, A., Orioli, P., Stubbs, M. T., Klebe, G., Nonaromatic sulfonamide group as an ideal anchor for potent human carbonic anhydrase inhibitors: Role of hydrogen-bonding networks in ligand binding and drug design. *J Med Chem*, 45: 3583–3587 (2002).
- Addy, L. D., Martin, M. V., Clindamycin and dentistry. *British Dental Journal*, 199: 23-26, (2005).
- Ahmed, S., James, K., Owen, C. P., Patel, C. K., Patel, M., Acid dissociation constant: A potential physicochemical factor in the inhibition of the enzyme estrone sulfatase (ES). *Bioorg Med Chem Lett*, 11: 899–902 (2001).
- Antel, J., Weber, A., Sotriffer, C. A., Klebe, G., Multiple binding modes observed in X-ray structures of carbonic anhydrase-inhibitor complexes and elsewhere: Consequences for structure-based drug design. In: Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., editors. *Carbonic anhydrase—Its inhibitors and activators*. Boca Raton, FL: CRC Press, 45–66 (2004).
- Arslan, O. , “Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitorlarının Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Arastırılması”, Doktora Tezi, Ataturk Universitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Ozdemir, H., and Kuhrevioğlu, İ. O., “A New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography”, *Turk J. Med Sci.*, 26: 163 (1995).
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Ozdemir, H., and Kufrevioglu O.I., A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turk J. Med. Sci*, 26-163 (1996).
- Arslan, O., “Biyomolükeller Teori ve Uygulamaları ile”, Balıkesir, (2003).

- Aydoğan, S., “Yönlendirilmiş Mutagenез ile Mutant CAII Geninin Eldesi ve Mutant Proteinlerin inhibitörlere Karşı ilgisinin Araştırılması”, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, (2006).
- Barbanoj , M. J., Antonijoan , R. M., Gich, I ., Clinical pharmacokinetics of Dexketoprofen, Clin Pharmacokinet, 40(4): 245–262 (2001).
- Banerjee, A.L., Swanson, M., Malik, S., and Srivastava, DK., Purification of recombinant human carbonic anhydrase-II by metal affinity chromatography without incorporating hstidine tags. Protein Expres. Purif, 37:450-454 (2004).
- Bayram, E., Şentürk, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16: 9101-9105 (2008).
- Bayram, T., “Kopek Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile Saflastırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Sulfonamidlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, (2006).
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo, Biological and Pharmaceutical Bulletin , 25(8): 966-969 (2002).
- Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19: 193-197 (2004).
- Bingöl, G., Biyokimya. Güven Matbaası. Ankara, 169 – 174 (1983).
- Bollog, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J., “Protein Purification Methods”, Second Edition, Wiley-Liss, Inc. New-York, (1996).

- Boriack-Sjodin, P. A., Heck, R. W., Laipis, P. J., Silverman, D. N. and Christianson, D.W., 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: 10949 – 10953 (1995).
- Brook, I., Lewis MAO, Sandor GKB, Jeffcoat M, Samaranayake LP, Rojas JV. Clindamycin in dentistry: More than just effective prophylaxis for endocarditis? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 100(5): 550-558 (2005).
- Bülbül M., Saraçoğlu N., Küfrevioğlu Ö.İ., Çiftçi M., Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibition effects. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10: 2561 (2002).
- Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 (1976).
- Briganti, F., Pierattelli, R., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors. Part 37. Novel classes of carbonic anhydrase inhibitors and their interaction with the native and cobalt-substituted enzyme: Kinetic and spectroscopic investigations. *Eur J Med Chem*, 31: 1001–1010 (1996).
- Cabiscol, E., Levine, R.L., 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): 4170-4174 (1996).
- Clanis, Y., D., "Matrix Evaluation for Preparative High-Performance affinity Chromatography", *J. Chromatogr.*, 407, Pt. A, 179-187 (1990).
- Camarasa, M. J., Fernandez-Resa, P., Garcia-Lopez, M. T., De las Heras FG, Mendez-Castrillon PP, Alarcon B, Carrasco L. Uridine 50-diphosphate glucose analogues. Inhibitors of protein glycosylation that show antiviral activity. *J Med Chem*, 28: 40–46 (1995).

- Carganico, G., Mauleon, D., Garcia, M. L., A novel arylpropionic derivative, its method of preparation and its application as an analgesic, Patent W09411332, (1994).
- Casini, A., Antel, J., Abbate, F., Scozzafava, A., David, S., Waldeck, H., Schafer, S., Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II, and IV. *Bioorg Med Chem Lett*, 13: 841–845(2003).
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N., *The Carbonic Anhydrases-New Horizons., Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., McGraw-Hill, Inc., New York, 2165–2204 (2000).
- Chegwidden, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M., “In the Carbonic Anhydrase New Horizons”, Birkhauser Verlag, Basel, 343 (2000).
- Çelik, İ., Bazı Pestisit ve Bitki Büyüme Regülatörlerinin Sığır ve insan Eritrosit Karbonik Anhidraz izoenzimleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması (doktora tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Van, (1995).
- Denizli, A., ve Pişkin, E., “Heparin Immobilized Polyhydroxyethylmethacrylate “microbeads for cholesterol removal: A Preliminary Report”, *J. Chromatogr. B.*, 670: 157-161 (1995).
- Devlin T M. *Biochemistry with Clinical Correlations*. Kanada, (2002).
- Ekinci D., Ceyhun S. B., Şentürk M., Yerlikaya E., Erdoğan O., Küfrevioğlu Ö. İ., Purification and characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass) liver and toxicological effects of metals on enzyme activity. *Env toxi and pharm.* 32: 69–74 ( 2011)
- Evans, A. M., Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the profens: enantioselectivity, clinical implications and special reference to S(+)-ibuprofen, *J Clin Pharmacol*, 36: 7–15 (1996).

- Falkbring, S.O., Göthe, P.O., Nyman, L., and Porath, J., Affinity chromatography of carbonic anhydrase. FEBS. Letter, 24: 229 (1972).
- Feldstein, J.B., Silvarman D.N., Purufication and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. J. Biol. Chem, 259(9): 5447-53 (1984).
- Fiore, A., De Simone, G., Menchise, V., Pedone, C., Antel, J., Wurl, M., Casini A., Scozzafava, A., and Supuran, C. T., “Carbonic Anhydrase Inhibitors. Zonisamide is an e. ective Inhibitor of the Cytosolic Isozyme II and Mitochondrial Isozyme V Solution and X-Ray Crystallographhic Studies”, Elsevier Science, 15: 2315 (2005).
- Gordon, A., Price, H., Mood stabilization and weight loss with topiramate. Am J Psychiatry , 156: 968–969(1996).
- Gözükara, E., Enzimler. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 572-576(1997).
- Geers, C., and Gros, G., “Carbon Dioxide Transport and Carbonic Anhydrase in Blood and Muscle”, Physiological Reviews, 80: 681 (2000).
- Hall, G. E. and Schraer, R., Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *Salmo gairdneri*. Comp. Biochem. Phys, 75B:81-92 (1983).
- Hakansson, K., Carlsson, M., Svensson, L. A. and Liljas, A., Structure of native and apo carbonic anhydrase II. J. Mol. Biol, 227 : 1192-1204 (1992).
- Hayball , P. J., Chirality and nonsteroidal antiinflammatory drugs, Drugs, 52(Suppl.5), 47–58 (1996).
- Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J., Differentiation-dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. FASEB Journal, 10 (4): 481-490(1996).
- Henry, R.P., Swenson, E.R., The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. Respiration Physiology, 121 (1): 1-12 (2000).



- Hewett-Emmett, D., and Tashian, R. E., Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 5: 50-77 (1996).
- Hewett-Emmett, D., In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 29: 78 (2000).
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., Characterization of CA XV, a new GPI-Anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, Part 1, 392:83-92 (2005).
- Holmes, R., S., "Purification, Molecular Properties and Ontogeny of Carbonic Anhydrase Isozymes Evidence for A, B and C Isozymes in Avian and Mammalian Tissues", *Eur. J. Biochem.*, 78: 511 (1997).
- Hunaiti, A.A., and Soud, M., Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *The Science of The Total Environment*, 248: 45-50 (2000).
- Jabusch, J. R., and Deutsch, H. F., "Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetate", *Arch. Biochem. Biophys.*, 238: 170 (1989).
- Kaiser, E. T., and Lo, K. W., "The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane", *J. Am. Chem. Soc.*, 91: 4912 (1969).
- Johansen, J.T., Isolation of human carbonic anhydrase B and C and apocarbonic anhydrase by affinity chromatography. *Carlsberg Res. Commun*, 41: 73 (1976).
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö. "Biyokimya",Aktif Yayınevi,Erzurum, 85-95 (2010).
- Keha, E. E., Ve Küfrevioğlu, Ö. İ., *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, 642 (2010)
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., *Biyokimya*, Muhtelif kısımlar. Şafak Yayınevi, Erzurum, (2005).

- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2008. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, İstanbul ,91-118 (2008).
- Keilin, D., and Mann, T., Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature* 153: 107-108 (1944).
- Kisker, C., Schindelin, H., Albert, B. E., Ferry, J. G., and Rees, D. C., A left handed  $\beta$ -helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanasarcina thermophila*. *EMBO*, I 15: 2323-2330 (1996)
- Konukoglu, D., *Tus'a Hazırlık Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 435 (2000).
- Koolman, J., Klaus-Henrich, R., and Jürgen, W., *Renkli Biyokimya Atlası*, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr Özgül Alper., Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti, (2003).
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., and Krungkrai, J., Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31: 661-668 (2001).
- Kurt, H., Penisilinlerin farmakolojisi ve klinik farmakolojisi. Tulunay FC, Ergun H. eds. İn: *Antibiyotiklerin Klinik Farmakolojisi*. Turgut Yayıncılık, İstanbul, 17-26 (2000).
- Laemmli, D.K., Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 (1970).
- Lakkis, M.M., Oshea, K.S., Tashian, R.E., Differential expression of the carbonic anhydrase genes for ca VII (Car7) and CA-RP VIII (Car8) in mouse brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45 (5): 657-662 (1997).
- Lehninger A.L., *Principles of biochemistry*. Newyork: Worth, Publishers Inc, 2011. 587-665 (2011).
- Lehninger, A.L., *Trennung von Proteinen aufgrund von spezifiscl Liganden: Affinitats-Chromatographie*. Biochemie, Verlag Chemie, 134 (1983)
- Lehninger A.L., *Principles of biochemistry*. Newyork: Worth, Publishers Inc, 2011.

- Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivela, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S., Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 2719-2727 (2004).
- Lesburg, C. A., and Christianson, D. W., X – ray crystallographic studies of engineered hydrogen bond Networks in a protein – zinc binding site. *J. Am. Soc.*, 117:6368-6844 (1995).
- Liljas, A., Hakansson, K., Jonsson, B. H., and Xue, Y., Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 219: 1-10 (1994).
- Lindskog, S., Coleman, J.E., "The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70(9): 2505 (1973).
- Lindskog, S., Carbonic anhydrase. In *Advances in horganik Biochem*, 4. bs, 115-170 (1982).
- Lindskog, S., "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase", *vPharmacol. Ther*, 74 (1997).
- Lindskog, S., and Silverman, D.W. , The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. In *The Carbonic Anhydrases-New Horizons*, Chegwiddden W.R., Edwards, Y., and Carter, N., Eds., Birkhäuser Verlag, Basel, 175-196 (2000).
- Lineweaver, H., Burk, D., The determination of enzyme dissociation constant. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658 (1934).
- Lowe, N., Edwards, Y.H., Edwards, M., Butterworth, P.H., "Physical Mapping of the Human Carbonic Anhydrase Gene Cluster on Chromosome 8", *Genomics*, 10 (4): 882 (1991).
- Maa, J.S., Rodriguez, J.F., and Esteban, M., Structural and functional characterization of a cell surface binding protein of Vaccinia virus. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 1569-1577 (1990).

- Mangani, S., and Hakansson, K., 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 (1992).
- Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., Godman, D.F., Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280 (1): 98-104 (1997).
- Mauleon, D., Artigas, R., Garcia, M.L., Carganico, G., Preclinical and clinical development of dexketoprofen, *Drugs*, 52( Supp. 5), 24–46 (1996).
- Mc Intosh, J. E. A., “Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and uterus of the rabbit”, *J. Biochem.*, 120: 299 (1970).
- Meldrum, N.N., and Roughton, F.J.W., Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *Nature*, 80: 113-142 (1993).
- Mohanty, A. K., Kannan, K.K., Mahajan S.K., "Human Carbonic Anhydrase I: Effect of Specific Site Mutations on Its Function", *J. Biosci*, 23 (3): 235 (1998).
- Nelson, D.L., and Cox, M.M., *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, (2005).
- Neu, H.C., Antistaphylococcal penicillins. *Med Clin North Am*, 66-61 (1982).
- Nishimori, I., Acatalytic CAs, Carbonic anhydrase related proteins, in *Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators* (Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 24-43 (2004).
- O’carra, P., Barry, S., and Griffin, T., Spacer arms in affinity chromatography : the need for a more rigorous approach. *Biochem.Soc.Trans*, 1: 289-290 (1973).
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X.L., Sly, W.S., Carbonic-anhydrase .4. role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320 (2): 315-322 (1995).

- Özdemir, H.. Bazı Aktif Katyonların Değişik Orjinli Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Arastırılması (yüksek lisans tezi). Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, (1992).
- Özensoy, Ö., Arslan, O. and Oznur Sinan S., A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Biochemistry(Moscow)* , 69: 216 (2004).
- Özensoy, Ö., “Eritrositlerden Karbonik Anhidraz \_zoenzimlerinin Saflastırılması için Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması” Yüksek LisansTezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı, (2002).
- Philopot, F. J., and Philopot, J., “A modified colorimetric estimation of Carbonic anhydrase”, *J.Biochem.*, 30: 2191 (1936).
- Poulsen, S.A., Wilkinson, B.L., Innocenti, A., Vullo, D.,Supuran, C.T., Inhibition of human mitochondrial carbonic anhydrases VA and VB with para-(4-phenyltriazole-1-yl)-benzenesulfonamide derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18: 4624-4627 (2008).
- Pocker, Y., and Sarkanen, S., Carbonic anhydrase: structure, catalytic versatility and inhibition, *advances in enzymology*. New York, 149- 273 (1979).
- Prince, A.S., Neu, H.C., New penicillins and their use in pediatrics. *Pediatr Clin North Am* , 30- 33(1983).
- Ren, X.L., Lindskog, S., Buffer dependence of co<sub>2</sub> hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120 (1): 81-86 (1992).
- Roughton, F. J. W., and Booth, V. H., The Effect of substrate concentration, Ph and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J.* (40) : 319 (1946).
- Ryon, U.S., Whitney, P.L., and Ryen, J.W., “localization of Carbonic Anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture”, *J. Appl. Physiol.*, 53: 914 (1982)

- Sarikaya S.B.Ö. , Topal F., Şenturk M., Gulçin İ., Supuran C. T., *In vitro* inhibition of a-carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 4259–4262 (2011).
- Scozzafava, A., and Supuran, C.T., *Biorganic Medicinal Chemistry Letters* 12, With permission from Elsevier, 1177–1180 2002.
- Segel, I.H. , *Biochemical Calculations*, Inc, New York, 403 (1968).
- Senturk M., Gülçin İ., Daştan A., Küfrevioğlu Ö. İ., Supuran C. T., Carbonic anhydrase inhibitors Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. *Bioor Med Chem*, 17: 3207–3211 (2009).
- Simonsson, I., and Lindskog, S., The interaction of sulfate with carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem*, 123: 29-36 (1982).
- Sjoblom, B., Elleby, B., Wallgren, K., Jonsson, B.H., Lindskog, S., Two point mutations convert a catalytically inactive carbonic anhydrase-related protein (CARP) to an active enzyme. *FEBS Letters*, 398 (2-3): 322-325 (1996).
- Sly, W.S., Hu, P.Y., Human carbonic-anhydrases and carbonic-anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 375-401 (1995).
- Sugrue, M. F., “The Preclinical Pharmacology of Dorzolamide hydrochloride, a Topical Carbonic Anhydrase Inhibitor”, *J. Ocular Pharmacol. Ther*, 12. bs., 363 (1996).
- Sugrue, M.F., Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research* 19 (1): 87-112 (2000).
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., *Eur. J. Med. Chem*, 35: 867 (2000).
- Supuran, C.T., and Scozzafava, A., Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1.bs., 61-97 (2001).
- Supuran, C.T., Indisulam: An anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*, 12.bs., 283,287 (2003).

- Supuran, C.T., Innocenti, A., Mastrolorenzo, A., Scozzafava, A., Antiviral sulfonamide derivatives. *Mini Rev Med Chem*, 4. bs., 189-200 (2004).
- Supuran, C.T., "Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications cfor inhibitors and activators" *Rev.7, February*, 1: 14 (2008).
- Svastova, E., Hulikova, A., Casini A., Rafajova, M., Scozzafava, A., and Supuran, C., T., "Hypoxia Activates the Capacity of Tumor-Associated Carbonic Anhydrase IX to Acidify Extracellular pH", *FEBS*, 577: 439 (2004).
- Scozzafava, A. and Supuran, C.T., *Biorganic Medicinal Chemistry*, 2002. *Letters* 12, 1177–1180. With permission from Elsevier, 2002.
- Tekman, Ş., Öner, N., *Genel Kimya*, I. Cilt, Fatih yayınevi matbaası, İstanbul, 335-367 (1986).
- Tozlu, İ., *Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin \_ncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi)*. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Van, (1997).
- Türeci, O., Sahin, U., Vollmar, E., et al. "Human Carbonic anhydrase XII: cDNA Cloning, Expression and Chromosomal Localization of a Carbonic Anhydrase Gene that is Overexpressed in Some Renal Cell Cancers" *Proc. \_atl Acad. Sci. USA*, 95: 7608 (1998).
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T., Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J.Biol. Chem*, 242: 4221 (1967).
- Veys, EM., 20 years experience of ketoprofen, *Scand J Rheumatol Suppl*, 90: 1–44 (1991).
- Warburg, O., and Christian, W., "Isolierung und Kristallization des Gärungsferuients Enolase". *Biochem.* 310- 384 (1941).
- Wechter, W.J., Bigornia, A.E., Murray, E.D., Levine, B.H., Joung, J.W., Racflurbiprofen is more ulserogenic than its(S)-enantiomer, *Chirality*, 5: 492–494 (1993).

- Whitney, P.I., Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Anal. Biochem*, 64: 267 (1974)
- Wilbur, K.M., and Anderson, N.G.,. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase, *Journal of Biological Chemistry*, 176: 147-154 (1948).
- Winum, J., Y., Innocenti, A., Nasr, Montero, J., L., Scozzafava, A., Vulloa, D., and Supuran, C., T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis and Inhibition of Cytosolic/tumor-associated Carbonic Anhydrase Isozymes I, II, IX, V and XII with N-hydroxysulfomides a New Zinc-Binding Function In the Desing Inhibitors" Elsevier Science, 15: 2353 (2005).
- Winum, J., Y., Innocenti, A., Montero, J., L., Scozzafava, A., Vulloa, D., Gagnard, V., and Supuran, C., T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors. Interaction of Isozymes I, II, IV, V and IX with Organic Phosphates and Phosphonates" Elsevier Science, 15: 1683 (2005).
- Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.*, 57: 189 (1975).
- Wistrand, P.J., "Solubilization and preliminary characterization of membrane bound Carbonic anhydrase", *J. Med. Sci.*, 75-85 (1980).
- Wistrand, P. J., "The Importance of Carbonic Anhydrase B and C fort he Unloading of CO<sub>2</sub> by the Human Erythrocyte ", *Acta Physiol. Scand.*, 343 (1981).
- Zimmerman, S. A., Ferry, J.G., Supuran, C.T., "Inhibition of the Archaeal Beta- Class (Cab) and Gamma-Class (Cam) Carbonic Anhydrases." *Curr Top Med. Chem.*,. 7 (9): 901 (2007).



## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Konya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ereğli’de tamamladıktan sonra 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Biyoteknoloji opsiyonundan mezun oldu. 2009 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Biyoloji A.B.D.’a yüksek lisansa başladı. Halen Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji A.B.D.’da Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.