

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

BAZI KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI
İÇİN YENİ BİR AFİNİTE JELİNİN SENTEZİ VE UYGULANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül ŞAHİN

Balıkesir, Eylül – 2008

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**BAZI KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI
İÇİN YENİ BİR AFİNİTE JELİNİN SENTEZİ VE UYGULANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül ŞAHİN

Balıkesir, Eylül – 2008

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

BAZI KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI
İÇİN YENİ BİR AFİNİTE JELİNİN SENTEZİ VE UYGULANMASI

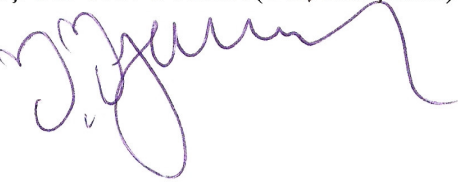
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sınav Tarihi : 08.09.2008

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Ö.Ö. GÜLER (Tez danışmanı)



Balıkesir, Eylül - 2008

“Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar
Projeleri Birimi tarafından BAP 2008 / 01 Kod’lu Proje ile
desteklenmiştir.Teşekkür ederiz.”

ÖZET

BAZI KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR AFİNİTE JELİNİN SENTEZİ VE UYGULANMASI

Ayşegül ŞAHİN

**Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya Anabilim Dalı**

**(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı :
Yrd. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER)**

Balıkesir, 2008

Afinite kromatografisi, proteinlerin saflaştırılmasında, kullanışlı ve uygun bir tekniktir. Bu teknik ile ligand olarak daha önceden orijinal olarak sentezlenmiş bir CA inhibitörü 4-izosiyonatbenzenesülfonamit, çalışmada matriks olarak kullanılan Eupergit C-250L 'ye etilendiamin uzantı koluyla bağlanarak yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir.

Bu reaksiyonda, matriks ile ligand arasındaki reaksiyon mekanizması için gerekli olan ve sterik etkileşmenin kontrolü amacıyla etilendiamin kullanılmıştır. Eupergit C-250L' nin taşıdığı reaktif oksiran grupları, ligandın matrikse bağlanması için uyumlu şartları sağlamaktadır. Eupergit C-250 L- etilendiamin- 4-izosiyonatbenzenesülfonamit kimyasal yapısına sahip afinite jelinin kullanımıyla BCA (sığır eritrosit CA) ve hCA I ve hCA II (insan eritrosit CA) izoenzimlerinin her ikisi de direkt olarak hemolizattan, saflaştırılmıştır.

Afinite kolonundan, saflaştırılmış CA izoenzimlerinin elüsyonu için çeşitli tampon çözeltiler kullanılmış, en uygun elüsyon çözeltilerinin, BCA ve hCA-II izoenzimleri için; 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6) ve hCA-I izoenzimi için; 1 M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH 6.3) olarak belirlenmiştir. Saflaştırma dereceleri sırasıyla, BCA, hCA I, hCA II için 181 ve 184 kat olarak elde edilmiştir. Bu yeni afinite jelinin en uygun pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değerleri her bir CA izoenzimleri için tesbit edilmiştir. hCA-I, hCA-II ve BCA izoenzimlerinin her biri için uygun koşulları; 15⁰C, pH 8.5, ve 0.3 iyonik şiddeti olarak bulunmuştur.

Her bir izoenzimin saflaştırılması, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yardımıyla kontrol edilmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: karbonik anhidraz / izoenzim / afinite kromatografi/Eupergit C-250 L

ABSTRACT

A NEW AFFINITY GEL SYNTHESIS FOR PURIFICATION OF SOME OF CARBONIC ANHYDRASE ISOZYMES AND APPLICATIONS

Ayşegül ŞAHİN

Balikesir University , Institute of Science, Department of Chemistry

(MSc. Thesis / Supervisor : Assist. Prof. Dr. Ozen OZENSOY GULER)

Balikesir-Turkey, 2008

Affinity chromatography is a suitable technique which is easily applicable for the rapid purification of a substance from a complex mixture of proteins, according to this advantage of this technique, this present work describes an original affinity gel synthesis was prepared using Eupergit C 250 L derivatized with 4-isocyanatobenzenesulfonamide, an inhibitor of carbonic anhydrase, which is also originally synthesized as well.

In this reaction, ethylenediamine was used as a spacer arm for controlling the steric effects between the matrix and ligand. The reactive oxirane groups that Eupergit C-250 L contains, provide the binding of the ligand to the matrix in mild conditions. Both bovine erythrocyte carbonic anhydrase BCA and human erythrocyte carbonic anhydrase I,II (hCA I and hCA II) isozymes have been purified from the hemolysate, directly by using the affinity gel, which has a chemical structure of Eupergit C-250L-ethylenediamine-4-isocyanatobenzenesulfonamide.

Different solution buffers were used for obtaining the purified CA isozymes from the affinity column. And 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6) for BCA and hCA-II isozymes and 1 M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH 6.3) for hCA-I isozyme were determined as most suitable elution buffers. The greatest purification fold for BCA and hCA I, hCAII have been obtained as 181 and 184 folds, respectively. The optimum pH, temperature and ionic strength values of the new affinity gel have been determined for each isozyme of CA. Maximum binding was achieved at 15⁰C, pH 8,5, and 0.3 ionic strength for both hCA-I, hCA-II and BCA isozymes .

The purification of an each isozyme has been controlled by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

KEY WORDS: carbonic anhydrase / isozymes / affinity chromatography / Eupergit C-250 L

İÇİNDEKİLER	Sayfa
ÖZ, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOL LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖNSÖZ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 Karbonik Anhidraz Enzimi Sınıflandırılması, Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	4
1.1.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları	7
1.1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Kataliz Reaksiyonları	8
1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	10
1.1.4 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	13
1.1.5 Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Önemi	17
1.2 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodları	19
1.2.1 CO ₂ - Hidrataz Aktivitesi	19
1.2.2 Esteraz Aktivitesi	20
1.3 Enzimlerin Saflaştırılmasının Önemi	21
1.4 Afinite Kromatografisi	22
1.4.1 Çalışmada Kullanılan Eupergit C-250L Matriksi	27
1.4.2 Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması	28

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	32
2.1 Materyaller	32
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
2.1.2 Kullanılan Aletlet ve Cihazlar	32
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	33
2.2 Yöntemler	38
2.2.1 Protein Tayini	38
2.2.1.1 Kalitatif Protein Tayini	38
2.2.1.2 Bradford Yöntemiyle Protein tayini	38
2.2.2 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini	39
2.2.2.1 CO ₂ – Hidrataz Aktivitesi	39
2.2.3 Afinite Jelinin Hazırlanması	39
2.2.4 Sığır Eritrosit Karbonik Anhidraz Enziminin (BCA) Saflaştırılması	42
2.2.4.1 Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizat Eldesi	42
2.2.4.2 Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu	42
2.2.5 İnsan Eritrosit İzoenzimlerinin Ayrılması	43
2.2.5.1 Kan Numunelerinin Alınması, Hemolizat Eldesi ve Afinite Kolonuna Uygulanması	43
2.2.5.2 İzoenzimleri Ayırma Deneyleri	44
2.2.6 Diyaliz	46
2.2.7 Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	46
3. BULGULAR	48
3.1 Kantatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	48
3.2 CA İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	49

3.2.1 Sığır Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimi (BCA)	49
3.2.2 İnsan Eritrosit Karbonik anhidraz Enzimi (hCA-I ve hCA-II)	51
3.3 BCA, hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Farklı Elüsyon Tamponları ile Afinite Kolonundan Saflaştırılması	54
3.3.1 BCA İzoenziminin Afinite Kolonundan Elüsyonu	54
3.3.1.1 NaCH ₃ COO / NaClO ₄ Çözelti Çifti ile Elüsyon	54
3.3.1.2 Na ₂ HPO ₄ / KSCN Çözelti Çifti ile Elüsyon	55
3.3.1.3 NaN ₃ / Tris-SO ₄ Çözelti Çifti ile Elüsyon	56
3.3.2 hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Afinite Kolonundan Elüsyonu	57
3.3.2.1 İzoenzimlerin Cl ⁻ ve N ₃ ⁻ İyonları ile Elüsyonu (A)	57
3.3.2.2 İzoenzimlerin Cl ⁻ ve SCN ⁻ İyonları ile Elüsyonu (B)	59
3.3.2.3 İzoenzimlerin I ⁻ ve CH ₃ COO ⁻ / ClO ₄ ⁻ İyonları ile Elüsyonu (C)	60
3.3.2.4 İzoenzimlerin I ⁻ ve N ₃ ⁻ İyonları İle Elüsyonu (D)	61
3.3.2.5 İzoenzimlerin I ⁻ ve SCN ⁻ İyonları ile Elüsyonu (E)	62
3.3.2.6 İzoenzimlerin Cl ⁻ ve CH ₃ COO ⁻ / ClO ₄ ⁻ İyonları ile Elüsyonu (F)	64
3.4 Sığır ve İnsan Eritrosit Karbonik anhidraz Enzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	65
3.5 Tarafımızdan Sentezlenen Afinite Jelinin (Eupergit C-250 L – Etilendiamin -4-izosiyonatbenzenesülfonamit) FT-IR Spektrumu	66
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
5. KAYNAKLAR	83

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
CA	Karbonik anhidraz enzimi
BCA	Sığır (Bovin)Eritrosit Karbonik anhidraz izoenzimi
hCA-I	İnsan (human)Eritrosit Karbonik anhidraz izoenzimi-I
hCA-II	İnsan Eritrosit Karbonik anhidraz izoenzimi-II
E.C.	Enzim kod numarası
U	Enzim ünitesi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N', N',-tetrametil etilendiamin
IR	Infrared spektrofotometresi
PET	Pozitron emisyon tomografisi
MRI	Manyetik rezonans
Hb	Hemoglobin
CNBr	Siyanojenbromür

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa No
Şekil 1.1	Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri	6
Şekil 1.2	Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri	8
Şekil 1.3	CA enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi	11
Şekil 1.4	hCAII aktif kısmı. Zn(II) iyonu(merkez) ve 3 histidin ligandı	12
Şekil 1.5	Sülfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzimine Bağlanması	16
Şekil 1.6	Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamid ve Anyonlarla İnhibisyonu	16
Şekil 1.7	Afinite kromotografisinin şematik gösterilişi	23
Şekil 1.8	Uzantı Kolu Kullanımının.gösterimi	24
Şekil 1.9	Hedef proteinin matriks ile teması ve istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması işleminin şematik gösterimi	26
Şekil 1.10	Hedef Proteinin Afinite Ligandına Adsorpsiyon ve Desorpsiyonunun	26
Şekil 2.1	Eupergit C-250 L-sülfonamid yapısına sahip afinite jelinin kimyasal reaksiyonu	41
Şekil 3.1	Bradford yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik	51
Şekil 3.2	Farklı pH değerlerinde kolona tutunan, Sığır karbonik enzimi için, toplam CO ₂ –hidrataz aktivite değerleri	
Şekil 3.3	Farklı sıcaklık değerlerinde kolona tutunan, Sığır karbonik anhidraz enzimi için, toplam CO ₂ -hidrataz aktivite değerleri.	53
Şekil 3.4	Farklı iyonik şiddet değerlerinde kolona tutunan, Sığır karbonik anhidraz enzimi için, toplam CO ₂ -hidrataz aktivite değerleri.	53

Şekil 3.5	Farklı elüsyon tamponlarıyla kolona tutunan, Sığır karbonik Anhidraz enzimi için, toplam CO ₂ -hidrataz aktivite değerleri.	54
Şekil 3.6	Farklı pH değerlerinde kolona tutunan, İnsan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO ₂ -hidrataz aktivite değerleri	55
Şekil 3.7	Farklı sıcaklık değerlerinde kolona tutunan, İnsan karbonik anhidraz İzoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO ₂ -hidrataz aktivite değerleri.	55
Şekil 3.8	Farklı iyonik şiddet değerlerinde kolona tutunan, İnsan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO ₂ -hidrataz aktivitedeğerleri	56
Şekil 3.9	Farklı elüsyon tamponlarıyla kolona tutunan, İnsan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO ₂ -hidrataz aktivite değerleri.	56
Şekil 3.10	BCA enziminin 0.1 M NaCH ₃ COO / 0.5 M NaClO ₄ (pH = 5.6) tamponu ile afinite kolonundan elüsyonu.	58
Şekil 3.11	Afinite kolonundan BCA enziminin 50mM Na ₂ HPO ₄ / 0.2 M KSCN, pH=6.3 tamponu ile elüsyonu.	59
Şekil 3.12	Afinite kolonundan BCA enziminin 0.4 M NaN ₃ / 0.1 M Tris-SO ₄ , pH=6.3 tamponu ile elüsyonu.	60
Şekil 3.13	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla, Cl ⁻ ve N ₃ ⁻ anyonlarıyla afinite kolonundan elüsyonu.	62
Şekil 3.14	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla, Cl ⁻ ve SCN ⁻ tamponlarıyla afinite kolonundan elüsyonu	63
Şekil 3.15	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla, I ⁻ ve ClO ₄ ⁻ anyonlarıyla afinite kolonundan elüsyonu.	64
Şekil 3.16	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla, I ⁻ ve N ₃ ⁻ anyonlarıyla afinite kolonundan elüsyonu.	65
Şekil 3.17	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla I ⁻ ve SCN ⁻ anyonlarıyla afinite kolonundan elüsyonu.	66
Şekil 3.18	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Cl ⁻ ve ClO ₄ ⁻ anyonlarıyla afinite kolonundan elüsyonu.	67
Şekil 3.19	Afinite kolonundan saflaştırılan hCA-I ve BCA izoenzimlerinin SDS-PAGE elektroforezi	68

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa No
Çizelge 1.1	Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	9
Çizelge 1.2	Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Hücre içi Yerleşimleri ve Sülfonamidlere İlgisi	14
Çizelge 1.3	CA enziminin saflaştırılması için daha önceki araştırmacılar tarafından sentezlenen afinite jelleri	31
Çizelge 2.1	SDS-elektroforezinde kullanılan jel karışım miktarları	36
Çizelge 3.1	NaCH ₃ COO / NaClO ₄ çözelti çifti ile kolondan alınan BCA İzoenzimiminin Saflaştırma Tablosu	58
Çizelge 3.2	Na ₂ HPO ₄ / KSCN çözelti çifti ile kolondan alınan BCA izoenziminin Saflaştırma Tablosu	59
Çizelge 3.3	NaN ₃ / Tris-SO ₄ çözelti çifti ile kolondan alınan BCA izoenziminin Saflaştırma Tablosu	60
Çizelge 3.4	Cl ⁻ ve N ₃ ⁻ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) izoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu	62
Çizelge 3.6	I ⁻ ve CH ₃ COO ⁻ / ClO ₄ ⁻ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) izoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu	64
Çizelge 3.7	I ⁻ ve N ₃ ⁻ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) izoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu	65
Çizelge 3.8	I ⁻ ve SCN ⁻ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) İzoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu	66
Çizelge 3.9	Cl ⁻ ve CH ₃ COO ⁻ / ClO ₄ ⁻ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) izoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu	67

Çizelge 4.1	4-izosiyanatbenzensülfonamit'in inhibisyon verileri	71
Çizelge 4.2	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerini ayırmak için tarafımızdan kullanılan elüsyon çözeltileri	77
Çizelge 4.3	BCA izoenzimini ayırmak için tarafımızdan kullanılan elüsyon çözeltileri	80

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmamın deneysel kısmı, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya laboratuvarlarında, Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Özen Özensoy GÜLER yönetiminde gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın tamamlanmasında engin bilgilerinden yararlandığım, çalışmam süresince beni yönlendiren, benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocalarım Yrd.Doç.Dr.Özen Özensoy GÜLER ve Prof.Dr.Oktay ARSLAN'a ,

Çalışmalarımın esnasında ve tezimin yazım aşamasında bana hep destek olan değerli bilgi ve yorumları ile bizleri yönlendiren çok kıymetli hocam Semra IŞIK'a, yardımlarını desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım Serap BEYAZTAŞ'a, Nahit GENCER'e ve değerli çalışma arkadaşlarım Nurcan DEDEOĞLU'na, Murat SAYIN'a ve Meltem AYDIN'a,

Çalışmalarımda daima moral ve motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini aldığım, her zaman yanımda olan ve bana olan güvenlerini hiçbir zaman kaybetmeyen değerli aileme,

En içten saygı ve sevgilerimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım,
iyi ki varsınız.

Balıkesir, Eylül 2008

Ayşegül ŞAHİN

1. GİRİŞ

İlk olarak, 1933 yılında sığır eritrositlerinde tanımlanan karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1), bu tarihten sonra tüm memeli dokularında, prokaryot, ökaryot ve *archaeada* yaygın olarak bulunan ve yapısında Zn^{+2} iyonu bulunduran bir metaloenzimdir[1,2]. Karbonik Anhidraz izoenzimleri α -, β -, γ -, δ - ve ϵ - CA olmak üzere evrimsel olarak bağımsız beş ayrı gen ailesi tarafından kodlanır. Memelilerde farklı doku dağılımları gösteren α -CA gen ailesine bağlı 16 farklı CA izoenzimi ve CA bağlantılı protein (CARP) tanımlanmıştır[3]. CA izoenzimlerinin hücre içindeki yerleşimleri de oldukça farklıdır, CA I-III, CA VII sitozolik, CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV membrana bağlı, CAVA - CAVB mitokondride, CA VI tükürük ve süt salgılarında ve NonO/p54^{nb} nükleusta bulunmaktadır[4,5-11]. Karbonik anhidraz izoenzimleri kinetik özellikleri ve inhibisyon profilleri açısından farklılık göstermektedirler[3].

Aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran CA enzimi genel olarak metabolik CO_2 transportunu yanı sıra birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- iyonlarının birikiminde de önemli rol oynamaktadır. Böylece vücuttaki birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- iyonlarının birikimini sağlayarak, vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında da son derece önemlidir[1,12-14]. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi sayılabilir. Bu dokuların dışında histokimyasal yöntemlerle tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA enzimine rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde ve enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır[14,15-17].

hCA II, 29,3 kDa büyüklüğünde olan bir proteindir. hCA II diğer izoenzimlere göre katalitik aktivitesi oldukça yüksektir, insan doku ve organlarında yaygın olarak rastlanmaktadır[18,19]. hCA I, 30 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Eritrositlerde,

kolon epitelinde, göz lensi ve korneal epitelyumda bulunur. Hücre içinde sitozolde yer alan hCA I çözünebilir karakterdedir ve eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir. Eritrositlerde hCA II 'ye göre beş kat daha fazla bulunmasına rağmen katalitik aktivitesi hCA II 'nin sadece %15 'i kadardır[20-25].

Yüksek göz içi basıncı ile (IOP) ortaya çıkan glokom en ciddi göz hastalıklarından birisidir. Glokom göz hastalıkları içinde % 15 – 20 oranı ile körlüğe neden olan bir göz hastalığıdır[3]. Göz retinasında bulunan CAII göz içi basıncı oluşumunun başlıca sorumlusudur. Glokomlu hastalarda IOP'yu düşürmenin etkili yolu CAII aktivitesini bloke etmektir. Bu amaçla başta asetazolamid olmak üzere heteroaromatik sülfonamidler uzun yıllardan beri kullanılmaktadır[2,50]. Ancak oral yolla verilen söz konusu bileşiklerin CAII yanında diğer izoenzimleride inhibe etmesi önemli yan etkiler ortaya çıkarmaktadır. Bu amaçla CAII enzimine spesifik diğer sülfonamid türevleri sentezlenmiş ve inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Ancak yapılan çalışmalar sonucu klinikte kullanılan asetazolamid bileşiğinden yan etkileri daha az daha güçlü bir inhibitör sentezi başarılamamıştır[26,27].

Karbonik anhidraz izoenzimleri, şeker hastalığı, yağ, üre, tümör oluşumuna yol açan etkenler ve çok zehirli çeşitli patojenlerin gelişmesini içine alan fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilgili olan geniş bir enzim ailesidir. Diüretikler ve antiglokom ilaçlarının yanı sıra, CA inhibitörlerinin, yeni anti-obezite, anti-kanser ve anti-enfeksiyon ilaçları olarak kullanımındaki önemi son yıllarda yaygın bir biçimde vurgulanmaktadır[3]. Bunlara ek olarak, yeni çalışmalar CA aktivasyonunun Alzheimer hastalığı için yeni bir tedavi olanağı sağlayabileceği ileri sürmektedir[3]. Bu durum, CA etkinliği kapsamındaki inhibitörler ve aktivatörlerin yaygın bir hastalık grubuna karşı yeni kullanımlara olanak sağlamasıyla bugün bazıları klinik denemelerde değerlendirilmekte olan CA izoformlarıyla ilgili özgül düzenleyicilerin gelişme sürecini ön plana çıkarmıştır[3].

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidrasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir. Bu nedenle, CA enziminin

saflaştırılmasında daha etkili ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır[28].

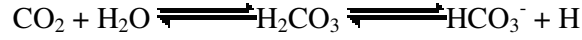
Günümüzde enzim saflaştırılması için, çok çeşitli kromatografik teknikler bulunmaktadır. Bu teknikler göz önüne alındığında, yüksek ayırma avantajı ile birlikte, saflaştırma stratejisinin planlanmasındaki adım sayısının azlığından dolayı afinite kromatografisi birçok proteinin ya da enzimin saflaştırılması için ideal bir yöntem olarak kullanılmaktadır[29].

CA enziminin saflaştırılması için literatürde, farklı uzantı kolları ve ligandlar kullanılarak değişik afinite jelleri sentezlenmiştir[30,34]. Araştırmamızda insan eritrositlerinden insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin (hCAI ve hCAII) ve ayrıca sığır eritrositlerinde CA (BCA) enziminin saflaştırılması için önceki araştırmacılardan farklı bir metotla, yüksek verimli bir afinite jeli sentezi planlanmıştır. Sentezi düşünülen afinite jelinin reaksiyon süresinin kısa oluşu ve reaksiyonunu ılıman koşullarda gerçekleşmesi, büyük bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca katı destek materyali olarak kullanılan Eupergit C - 250 L'nin polar organik çözücüler tarafından değişikliğe uğramaması, ısı artışına karşı göstermiş olduğu yüksek termal kararlılık ve immobilizasyon kapasitesini oldukça yüksek oranda artırdığı literatürdeki çalışmalarda belirtilmiştir(%92 lik immobilizasyon kazanımı: 11 ünite/g desteğiyle)[35]. Eupergit C-250L bu özellikleri nedeniyle, ekonomik yönden uygun, endüstriyel işlemlerde enzimlerin geri kazanım ve enzim immobilizasyon çalışmaları üzerinde en geniş kapsamlı kullanılan ticari matrikslerdir[36].

Eupergit C-250 L bileşiğinin kimyasal yapısındaki oksiran gruplarının yüksek yoğunluğu ile birçok noktadan reaktif olarak etkileşme olanağı sağlaması ile çalışmada matriks olarak seçilmiştir[37]. Bu reaktif matriks ile sentez reaksiyonunu herhangi bir aktivasyon metoduna gerek kalmadan destekleyebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, ligand olarak tasarlanan karbonik anhidraz enziminin spesifik inhibitörü 4-izotiyosiyanatobenzen-sülfonamid uzantı kolu vasıtasıyla matrikse bağlanmasının son derece avantajlı olacağı kanaati vardır[37-41].

1.1 Karbonik Anhidraz Enzimi Sınıflandırılması, Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz enzimi, genel olarak metabolik CO₂ transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokularda H ve HCO₃⁻ birikiminde de rol almaktadır[1,42].



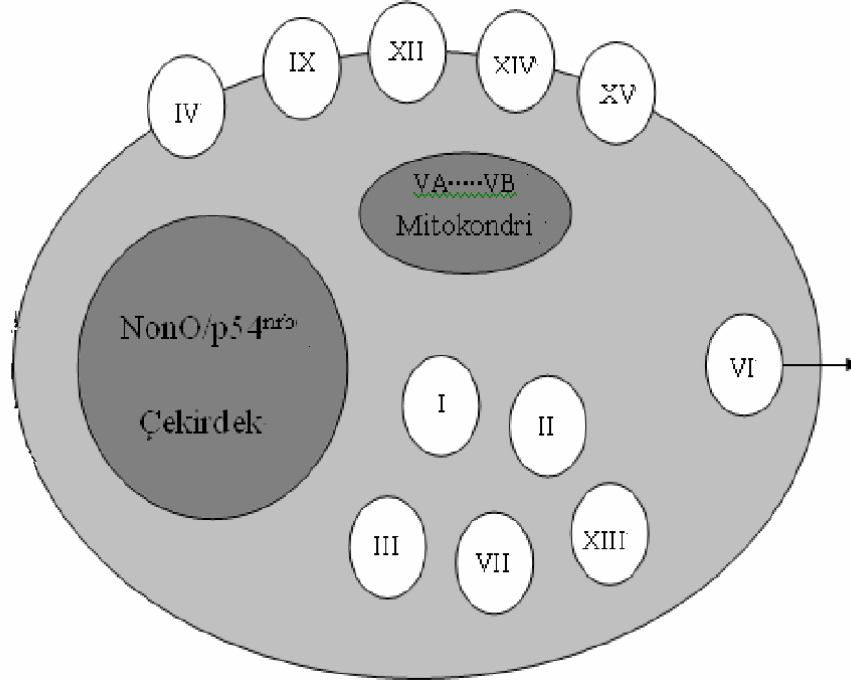
CA enzimi vücuttaki birçok bölgede H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarının birikimini sağlayarak, akışkan dengelerinin kurulmasında da önemli rol oynamaktadır. Göz içi sıvısı (humor aköz) yüksek miktarda Na⁺, Cl⁻, laktat ve askorbat ile birlikte HCO₃⁻ iyonlarını da içerir. Göz içi sıvısının salgılanmasında CA enzimi, HCO₃⁻ iyonu birikimini sağladığından, uyarıcı bir etki oluşturur. Bu enzimin inhibisyonu sonucu göz içi sıvısının salgılanma oranı yaklaşık yarı yarıya azalmakta ve glokom durumunda göz içi basıncını düşürmektedir. Bu bilgiler ışığında glokom tedavisinde CA enziminin inhibitörleri yıllardan beri kullanılmaktadır[3].

Günümüzde hCA II ve hCA I olarak bilinen formları ilk saflaştırıldığında CA C ve CA B olarak isimlendirilmiştir. Bu formlardan CA C (CA II) 'nin eritrositlerde az miktarda bulunup, yüksek aktivite gösterdiği CA B (CA I) 'nin ise çok miktarda olmasına rağmen daha düşük aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. İlerleyen yıllarda bu iki izoenzimin aminoasit dizilimi ve X- Işını kristal yapıları aydınlatılmıştır[43].

Karbonik anhidrazlar, prokaryotlar ve ökaryotlar'da çok yaygın olarak bulunan CA izoenzimleri α -, β -, γ -, δ -, ϵ - olmak üzere evrimsel olarak birbirinden bağımsız beş ayrı gen ailesi altında sınıflandırılmaktadır[3]. Bu gen aileleri aminoasit dizilişleri açısından önemli sayılabilecek bir benzerlik göstermemektedir. Bunlar, omurgalılar, bakteriler, algler ve sitoplazmalı yeşil bitkilerde bulunan α -CA'lar, çoğunlukla bakteriler, algler ile tek ve iki kotiledon'lu bitkilerin kloroplastlarında bulunan β -CA'lar başlıca archea ve bazı bakterilerde bulunan γ -CA'lar, bazı deniz diatomlarında bulunan δ -CA'lardır. Memelilerde, değişik katalitik aktiviteleri, hücre içi yerleşim ve organ üretim şekilleri olan α -CA izosimlerinden Zn²⁺ iyonu taşıyanlar dikkate alınmalıdır[11]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, yüksek omurgalılarda, çok

farklı hücresel içi yerleşimler, doku dağılımları ile önemli fizyolojik roller sergileyen ve çinko enzimleri taşıyan değişik katalitik aktiviteleri olan 16 adet α CA izoenzimi tanımlanmış bulunmaktadır[3,44]. CA'ın, beş adet sitozolik formu vardır (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII) beş adet hücre membranına bağlı izoenzimi vardır(CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV, CA XV), iki tane mitokondriyal formu vardır(CA VA, CA VB), bir adet salgılanan CA izozimi(CA VI) vardır[3-11]. Ayrıca, henüz sınıflandırılmamış formu olan NonO/p54^{nrB} tanımlanmıştır[45-48]. CA ilişkili proteinlerin, CARP'lar olarak adlandırılan 3 akatalitik formu daha bulunmaktadır[49]. Bunlar; CA VIII, CA X, CA XI 'dir. β ve γ CA ailesinin tipik örnekleri bitkiler, bakteriler ve archaea' larda bulunur. Bu enzimler, karbondioksitin bikarbonata tersinir hidrasyonu için çok etkili katalizörlerdir ve α karbonik anhidrazlar, değişik hidrolitik prosesleri katalize etme yetenekleri ile yüksek kullanıma sahiptirler. Bu kullanımlara örnek olarak siyanat'ın karbamik asit'e ya da siyanamid'in üre'ye hidrasyonu, geminal aldehit hidrasyonu, karboksilik veya sülfonik asit esterlerinin hidrolizleri ve halojen türevlerinin ve arilsülfonil tuzlarının hidrolizleri gibi yeni yeni araştırılmakta olan hidrolitik süreçler verilmektedir[43].

CA III' ün fosfataz aktivitesinin gerçek şekli günümüzde yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır[50]. CO₂ hidrasyonundan başka α -CA'lar katalizli hidrasyonların fizyolojik öneme sahip olmalarına rağmen bu konudaki bilgilerde açıklık yoktur. Günümüze kadar, X-ray kristalografi yapılar olarak, β - CA ve γ -CA familyalarının örneklerinin[51] yanında 6 α -CA tanımlanmıştır (CA I'den CA V ve CA XII' ye kadar)[51].



Şekil 1.1 Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri[52]

Şekil 1.1’ de CA ailesinin değişik izoenzimlerinin farklı dokulara dağılmış olarak bulunduğu görülmektedir. Bazı izoenzimler aynı dokuda birlikte bulunduğu gibi (eritrosit CA-I ve CA-II), diğer bazı dokularda tek bir izoenzim bulunmaktadır (membrana bağlı CA-IV).

α CA’ların katalitik mekanizması geniş bir detayla tespit edilmiştir[53]. Aktif kısım 3 histidin rezidüsü ve bir su molekül/hidroksit iyonu tarafından koordine edilmiş bir Zn(II) iyonu bulundurmaktadır ve bu özelliği güçlü bir nükleofil davranışı sergileyen aktif bir türü temsil etmektedir. Metal iyona doğrudan koordine olmuş su bulundurmayan bazı β -tipi enzimler olmasına rağmen, çinko hidroksit mekanizmasının β ve γ CA’lar için de geçerli olduğu tesbit edilmiştir[54]. Karbonik anhidrazlar, iki ana tip inhibitör tarafından inhibe edilmektedir. Bunlar, metal kompleksi inorganik anyonlar (siyanit, siyanat, tiyosyanat, azid ve hidrojen sülfid gibi) ve RSO_2NH_2 genel formülüne (R: aril, hetaril, perhaloalkil) sahip olan sülfonamidlerdir. CA izoenzimleri, filogenetik yapının her seviyesindeki fizyolojik ve patolojik fonksiyonu sergilemektedir. Solunum ve akciğerler ile metabolize

dokular arasındaki CO₂ / bikarbonat dönüşümü, pH ve CO₂ hemeostasi, çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması, glukoneogenez ve üre sentezi(hayvanlarda) ve CO₂ bağımlılığı(bazı bitkilerde ve alglerde) gibi biosentetik reaksiyonlar, bu fonksiyonlar arasındadır. Bu özellikleri, CA bu enzimlerini biyomedikal uygulamaları olan inhibitör ve aktivatörlerin dizaynında etkili kılmaktadır[43].

Karbonik anhidraz enziminin son derece önemli olan hidrataz aktivitesi fonksiyonu bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehytlerin hidrasyonunu katalizlemesi ile organik sentezlerde kullanımını çekici kılmaktadır. Bu yüzden, CA enzimin saflaştırılmasında daha etkili ve ekonomik metotların geliştirilmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır[34]. Günümüzde enzim saflaştırılması için, çok çeşitli kromotografik teknikler bulunmaktadır. Bu teknikler göz önüne alındığında, yüksek ayırma avantajı ile birlikte, saflaştırma stratejisinin planlanmasındaki adım sayısının azlığından dolayı afinite kromatografisi birçok proteinin ya da enzimin saflaştırılması için idealdir[34].

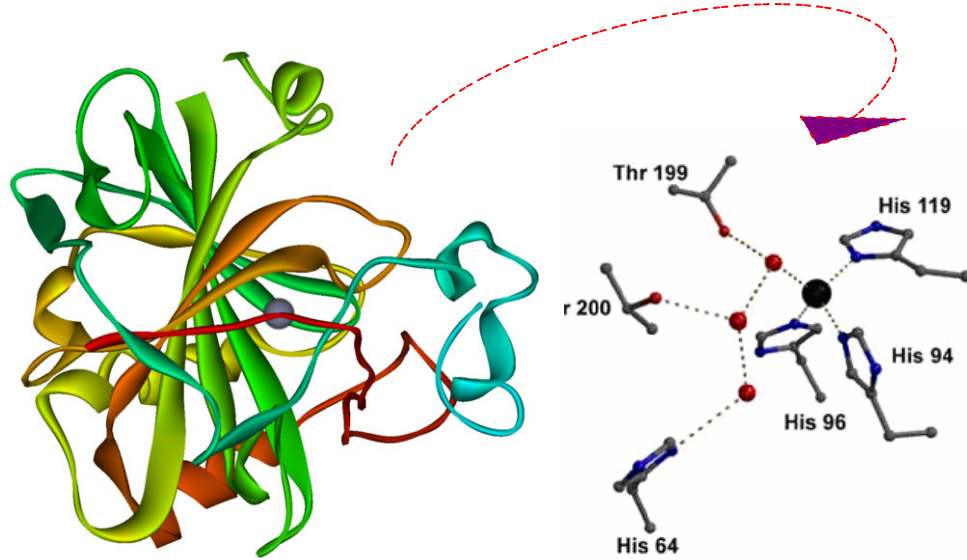
1.1.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarında büyük farklılıklar gözlenmektedir. İzoenzimlerinin üç boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına karşın, aktif bölgelerindeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. Şekil 1.2’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[43,45,55,56].

İnsan eritrosit CA-I ve CA-II (hCA-I ve hCA-II) izoenzimlerinin aminoasit dizilişlerinin tespiti, bu konudaki çalışmaların başlangıcı olmuştur. Daha sonraki yıllarda sığır, at, şempanze ve rhesus maymunlarına ait CA-I izoenzimleri ve yine sığır, at, koyun ve tavşan kaynaklı CA-II izoenzimlerinin aminoasit dizilişleri tam olarak tayin edilmiştir. Kas izoenzimi olarak da bilinen CA-III izoenziminin

aminoasit dizilişi ise, insan için belirlendiği gibi sığır ve atlarda da araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, üç izoenzimin aminoasit dizilişleri ve üç boyutlu yapıları yönünden büyük ölçüde benzerliğe sahip olduğu gösterilmiştir [57,58].

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 izoenzimidir ve CO₂-hidrataz aktivitesi CA-I izoenziminin %5 kadardır [59,60].



Şekil 1.2 Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119) (Büyük küre Zn⁺² iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir.)[61].

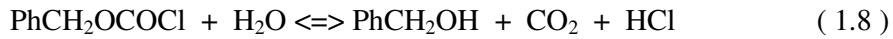
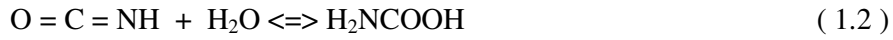
1.1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Kataliz Reaksiyonları

Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri CA enzimi tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında(1),

Çizelge 1.1’de gösterildiği gibi elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil piruvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir[62].

CA’ların kataliz mekanizması için Zn(II) iyonunun, fizyolojik süreçte temel olduğu yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır[53].

Çizelge 1.1 Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar[28]

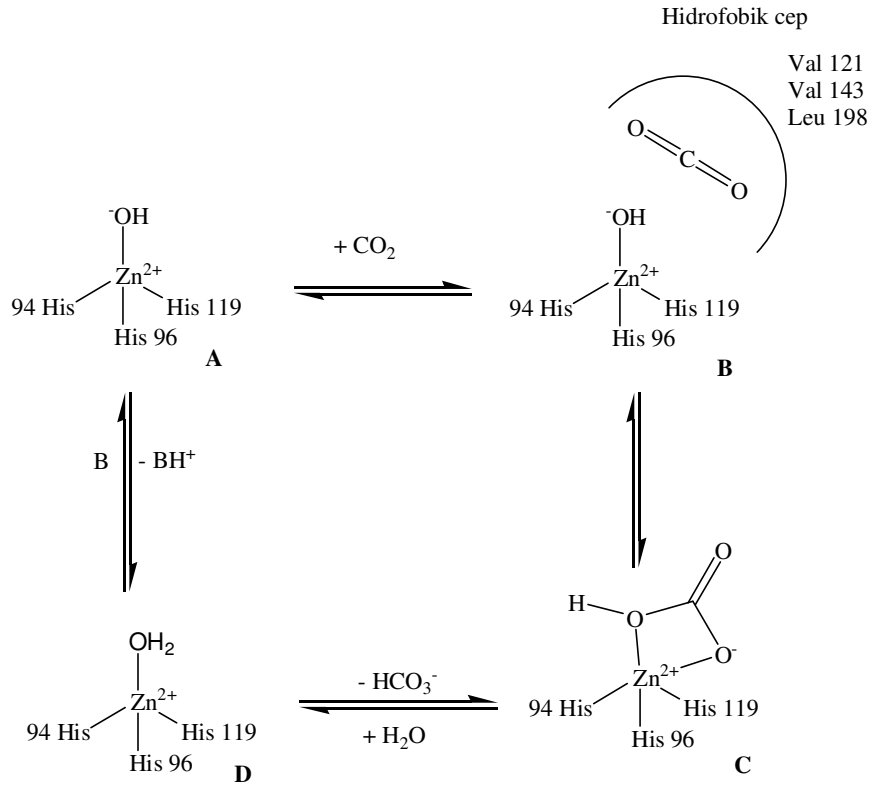


Karbonik Anhidraz izoenzimleri CO_2 ’nin HCO_3^- e (Çizelge 1.2, 1. reaksiyon), siyanatın karbamik asite, siyanamidin üreye, (Çizelge 1.2, 2.ve 3. reaksiyonlar), aldehitlerin gem-diollere hidratasyonunu (Çizelge 1.1, 4. reaksiyon) geri dönüşümlü olarak katalizler. Ayrıca karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizini ve hidrolitik reaksiyonları geri dönüşümlü olarak katalizler(Çizelge 1.1, 5-10. reaksiyonlar)[43].

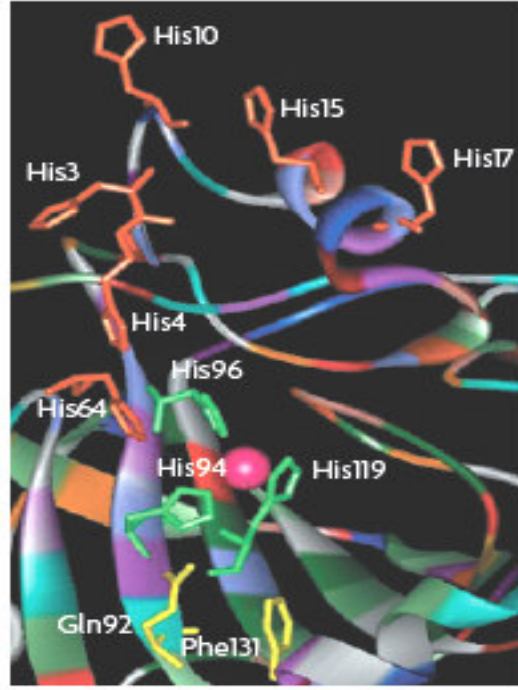
1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son 20 yıldır CA enzimini katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır[53]. 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[53].

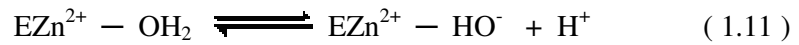
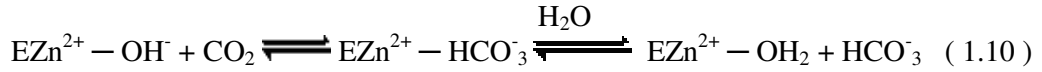
CA enziminin reaksiyonları katalizinde, Zn^{+2} iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-ray kristalografi sonuçları, metal iyonunun bir H_2O veya OH^- iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96, His 119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 \AA derinliğindeki bir yarığın tabanında yer alandığını 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 ' e doğru hareket etmektedir[63]. Zn^{+2} iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur (Şekil 1.3-A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne saldırır (Şekil 1.3-B). Bu da, Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 1.3-C). Daha sonra, HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Bunun sonucunda, Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da Şekil 1.3-D 'de görüldüğü gibi enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar[43]. Ana form A' nin rejenerasyonu için aktif kısımdan çevreye bir proton transferi reaksiyonu oluşur, buna da ya çözeltilinin aktif kısmı(His64 gibi – diğerleri arasında, izoenzim I, II, IV, VII ve IX daki proton mekiği, Şekil 1.4) ya da ortamda mevcut tampon yardımcı olur. Reaksiyon mekanizması, şematik olarak Denklem1.10 ve 1.11 de sunulmuştur[64].



Şekil 1.3 CA enziminin CO₂-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi[43].



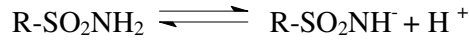
Şekil 1.4 hCAII aktif kısmı. Zn(II) iyonu(merkez) ve 3 histidin ligandı (His94, His 96, His119) görülmektedir. Anyon değiş-tokuşunun karboksiterminal kısmında gerçekleşmektedir[64].



Katalizdeki hız sınırlaması ikinci reaksiyondur. Enzimin hidroksit kısımlarını rejenere eden proton transferidir[65]. CAII, CAIV, CAV, CAVII ve CAIX gibi kataliz özellikli çok aktif izoenzimlerde süreç, bir histidin rezidüsü (His64) tarafından, (Şekil1.4) en etkili CA izoenzimi CAII 'ye yönelik oldukça etkili proton transferi sürecini takiben aktif kısmın girişinde konuşlanır [3]. Bu durum, ayrıca CA II' nin, bilinen en aktif enzim olduğunu açıklar ($k_{\text{cat}} / K_m = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ değeri ile), difüzyon kontrolünün limitine yaklaşan[3] ve aynı zamanda klinik uygulamaları olan inhibitörlerin dizaynı için önemli sonuçlar veren bir durum olmaktadır.

1.1.4 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler R-SO₂NH₂ kimyasal yapısına sahiptir. Bu formüldeki R grupları, genellikle aromatik veya heteroaromatik halka sistemleridir. hCA-II için K_i sabitleri 10⁻⁵ ile 10⁻¹⁰ arasında değişmektedir. Sülfonamidlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi,



denklemine göre kolaylıkla iyonik yapı kazanmaktadırlar. Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidlerin bu hidrofilik bölgesine ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere sahiptir. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle R-SO₂NH⁻ bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn⁺² ile iyonik bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur[66,67].

Sülfonamidlerin CA enzime güçlü bir şekilde bağlanması bu iki etkinin toplamının bir sonucudur. Nitekim substitüe ya da alkil sülfonamidlerin enzime bağlanmasında yalnızca hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heterosiklik yan grubu taşıyanlara göre daha zayıf inhibitör olma özelliği gösterirler[43].

Karbonik anhidraz izoenzimleri katalitik aktivitelerindeki farklılıkları gibi inhibitörlere olan ilgileri de farklılık göstermektedir (Çizelge 1.2.).

Hastalıkların tedavi ve teşhisinde, CA inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarlarıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış, bunun sonucunda da CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta Glokom tedavisinde ilaç,

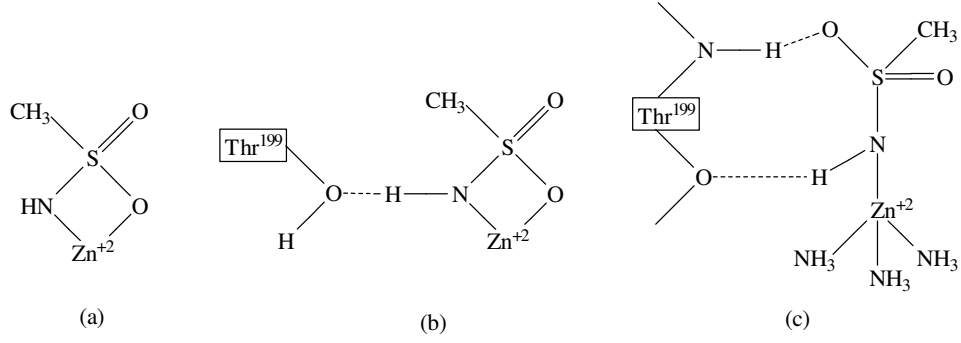
antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans (MRI) belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların geliştirilmesinde yol gösterici olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple, farklı CA izoenzimlerinin aktivitelerinin temel işlevleri, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine fırsat vermektedir [68,69].

Çizelge 1.2 Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Hücre içi Yerleşimleri ve Sülfona - midlere İlgisi[43]

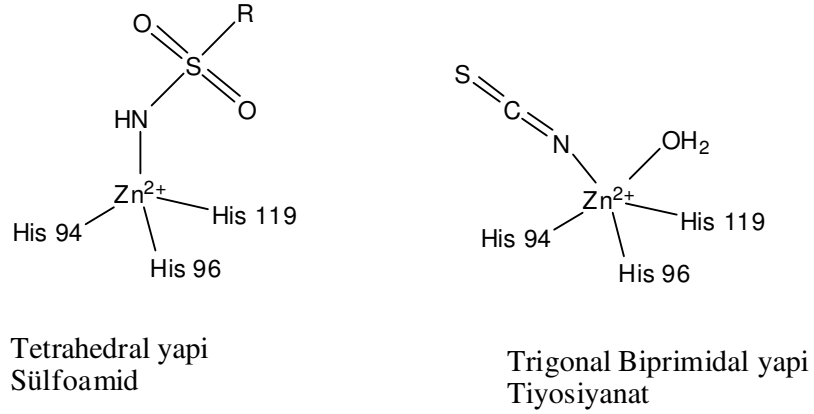
İzoenzim	Kataliz Aktivitesi (CO ₂ hidrasyonu)	Sülfonamidler için Afinite	Hücre içi Yerleşim
CA I	Düşük (CAII'nin %10'u)	Orta	Sitozol
CA II	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük (CAII'nin %0.3'ü)	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CA VA	Orta-Yüksek*	Yüksek	Mitokondri
CA VB	Yüksek*	Yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Yüksek	Salgı halinde
CA VII	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CARP 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

CA izoenzimlerinin sülfonamidlere ilgisi Çizelge 1.2’de gösterilmektedir. *pH 7.4 de orta, pH 8.2 veya daha yüksek pH da yüksek $\frac{1}{2}$, Ana CARP izoenzimlerinde Zn(II) bulunmaz, bu yüzden sülfonamid inhibitörleri için afiniteleri ölçülemez. Kısmi yönlendirilmiş mutageniz ile bu proteinlerin modifikasyonu mümkün olur ve bu şekilde CA benzeri aktivitesi olan enzimler haline dönüşmektedirler. Günümüzde bu konuyla ilgili detaylı çalışmalar yoktur. Ancak sülfonamidler tarafından bir engellenme olduğu tespit edilmiştir[1].

İnorganik anyonlarda yalnızca hidrofilik bağlanma söz konusu olduğundan CA enzimi üzerine sülfonamidler kadar güçlü inhibitör görevi üstlenemezler. Sülfonamidlerin CA enzimine bağlanması konusundaki teorik bir çalışmada, ilk olarak Zn⁺² tek başına azot ve oksijen atomların ile koordine olabildiği gösterilmektedir (Şekil 1.5 a). İkinci olarak, aktif bölgede bulunan tirozin (Thr-199) ile sülfonamid molekülündeki –NH grubu arasında oluşan hidrojen bağı yapıyı daha kararlı hale getirmektedir (Şekil 1.5 b). Üçüncü olarak sülfonamidin oksijeni, Thr-199 ’un –NH grubu ile hidrojen bağı yaparak yapıyı en kararlı hale getirmektedir (Şekil 1.5 c). Elde edilen sonuçlar, sülfonamid türevlerinin enzim ile farklı bir şekilde Van der Waals etkileşmelerinden dolayı Ki değerlerinde önemli fark oluşturduğunu göstermiştir. Zn⁺² iyonuna koordine olmuş sülfonamid bileşiğinin N atomuyla, protonu ayrılmış Zn⁺² iyonunun etrafında bulunan His94, His96, His119 rezidülerinin tetrahedral bir yapıda bağlanması sülfonamidler için çok önemlidir (Şekil 1.6). Anyonlar ise hem metal iyonun tetrahedral geometrisinde, hem de siyanat örneğinde görüldüğü gibi trigonal-bipiramidal yapıda bağlanabilirler (Şekil 1.6) [28].



Şekil 1.5 Sülfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzimine Bağlanması[28]



Şekil 1.6 Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamid ve Anyonlarla İnhibisyonu[51]

1.1.5 Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Önemi

CA enzim ailesi, CO_2 ve bikarbonat iyonunun iç dönüşümü gibi çok basit bir reaksiyonu katalize eder ve böylece solunum ve metabolize dokular ile akciğerler arasında CO_2 /bikarbonat iletimi ile ilişkili çok önemli fonksiyonlara ve ayrıca pH ve

CO₂ hemeostasi, çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması, biosentetik reaksiyonlar (glukoneogenez, lipid ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kireçlenme, tümörleşme ve pek çok diğer fizyolojik ve patolojik fonksiyonlarda rol oynarlar[43].

CO₂ hidrasyonu/bikarbonat dehidrasyonu fonksiyonu yanında, CA'lar tarafından katalizlenen (Çizelge 1.1) reaksiyonların, fizyolojik yapı ile bir ilişkisi olduğuna ait bir açıklık yoktur[70]. Bu yüzden, günümüzde ilgilenilen bu tip enzimler içinde, yalnızca denklem 1.1'deki (Çizelge 1.1) reaksiyonun bir fizyolojik örnek olduğu düşünülmektedir. Prokaryotlarda, CA'ların genel olarak iki fonksiyonu vardır;

- (1) Organizma dokuları arasında CO₂/bikarbonat taşınması
- (2) Enzimatik reaksiyonlar için CO₂/bikarbonat sağlanması[71].

Suda yaşayan fotosentetik organizmalarda, ek bir rol olarak da CO₂ konsantrasyon mekanizması bulunmaktadır. Bu özellikle, çevredeki CO₂ artışını önlemektedir. Fotosentez özelliği olmayan pek çok prokaryot, aktif bölge ortamına CO₂/ bikarbonat sağlaması veya reaksiyon enerjisini geliştiren böyle bileşikleri ortadan kaldırması beklenen CA için reaksiyonları kataliz eder[71]. Smith ve Ferry, prokaryotik CA'larının içinde, böylesine bir fizyolojik fonksiyon icra edebileceği pek çok karboksilasyon/ dekarboksilasyon süreçlerini incelemiştir[72]. Bu süreçler, hem, metabolizma oluşturan dokular ve salgı organları arasındaki CO₂/bikarbonat dönüşümü ile ve hem, kılcal damarlar ve akciğer ağtabakasından CO₂ giderme, böbreklerdeki bikarbonatın tekrar absorplanmasına karıştıkları gibi, böbrek tüpleri ve toplama kanalları içinden H⁺ iyonlarını yok etme işlemlerini kolaylaştırma ile de ilgilenmektedirler[72]. Çoğunlukla izoenzim I, II ve IV, bu süreçlere katılmaktadırlar. Gözün içinde bikarbonatça zengin salgılara (sinüs salgı proseslerinin izoenzimleri: CA II ve CA IV) neden olan CA'lar, görme ve göz tansiyonu ve glokoma yol açan görme bozuklukları konusu ile de ilgili olmaktadır. hCA II ayrıca kemik tümörlerinin bir birinden ayrılması ve ya kemik tümörlerinde kemik erimesi gibi kemik gelişimi ve kemik fonksiyonları ile de ilgilidir[51]. CA'lar, kalp-damar formasyonu gibi, pek çok doku ve organda, gözün damar tabakası ve göz sinirlerindeki pH' ı düzenleyerek ve bikarbonat sağlayarak, elektrolit salgılama işini

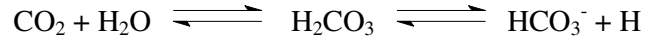
de görür[51]. Oluk ve kanal hücrelerinde salgı üretimi[48], mide cidarında gastrik asit üretimi ve safra üretimi, pankreas özsuyu, bağırsak iyonu nakli[51] ile de ilgilidirler. CA'lar, tad ve koku alma duyusu, mide-bağırsak yolunu aşırı pH şartlarından korunması, prostat sıvısının pH ve bikarbonat konsantrasyonu, kas fonksiyonları ve hücre basıncının uyarlanması gibi birçok fonksiyonların çalışımıyla da bağlantılıdır[51]. CA V pankreas β hücrelerine insülin salgısı iletimi gibi molekül sinyalizasyonu ile ilişkilidir[70]. hCA II ve CA V bikarbonat sağlayarak, glukoneogenez, yağ asitleri de-novo biosentezi veya pirimidin baz sentezinde rol oynarlar[28]. Yapılan son çalışmalarda hCAIX, hCAXII, CARP VIII izoenzimlerinin tümörlerde fazlaca bulunduğu tespit edilmiştir[19]. Günümüzde, bu enzimlerin inhibitörleri, glokom ajanı, diürik, antiepileptik amaçlı olarak mide-bağırsak ülserlerinin, sinirsel bozuklukların ya da kemik yıkımları gibi hastalık gruplarının denetimini kontrol etmekte, geniş şekilde klinik olarak kullanılmaktadır.

CA izoenzimleri ve inhibitörlerinin, klinik biyokimya ve tıptaki araştırmalarla yeni ilaçlar geliştirmeye ve yeni teşhis araçları ya da yaşamın bilim sahalarının uçsuz bucaksız derinliklerindeki temel süreçleri, hala yoğun bir şekilde devam etmektedir[3].

1.2 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodları

1.2.1 CO₂ - Hidrataz Aktivitesi

Reaksiyonunda görüldüğü gibi, ortama göre (1) CO₂ gazı açığa çıkmakta veya haracanmakta, (2) H⁺ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. (1) olayı kantitatif olarak monometrik yollarla tespit edilebilir.



Fakat manometrik metodun, reaksiyon pH'sının değişken olması, CO₂ molekülünün suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır. (2) olayından yararlanılarak, belirli bir pH düşmesi veya yükselmesi için geçen süre potansiyometrik yolla veya indikatörle belirlenebilir. Fakat bu metodun kısa zaman alması gibi bir avantajının yanı sıra, reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması, CO₂ molekülünün suda sınırlı çözülmesi ve kullanılan indikatörün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da vardır[73-77]. Bu dezavantajları en az düzeye indirmek için sabit bir pH'da titrasyon veya 0.02–0.05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu gibi metodlarla enzimin Km ve Vmax gibi parametrelerinin bulunmasında kullanılmaktadır. Fakat enzimin saflaştırma basamaklarında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından, *Wilbur-Anderson* metoduyla yapılmaktadır.

Bu yöntemle göre pH değerinin 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom-timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi, enzimsiz CO₂ hidrasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süreleri (t_c) arasındaki farkın (t_c)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir. Buna göre;

$$\text{Enzim Aktivitesi} = [(t_0) - (t_c)] / (t_c) \quad \text{Formüllerinden hesaplanabilir[78].}$$

1.2.2 Esteraz Aktivitesi

Kinetik çalışmalarda, CA aktivitesi ölçümleri bu yöntemle yapılmaktadır. Bu yöntem, CA'nın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır[79]. Prensipte olarak, karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitro fenol ve p-nitro fenolata hidroliz etmekte ve bu da 348 nm dalga boyunda absorpsiyon vermektedir. Reaksiyon denklemi şöyledir;



Ölçümü yapılan 348 nm'deki dalga boyu, p-nitro fenol ve p-nitro fenolat 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⁺ iyonlarına ayrışır. 348 nm dalga boyunda p-nitro fenol ve p-nitro fenolat iyonunun absorpsiyonları aynı anda okunabildiği için bu durum absorpsiyon ölçümünü etkilemez. p-nitro fenol bileşiğinin molar ekstiriksiyon katsayısı, $\epsilon_{348} = 5.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ 'dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil asetatın çok az bir absorpsiyonu vardır ve $\epsilon_{348} = 0,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ molar ekstiriksiyon katsayısına sahiptir.

1.3 Enzimlerin Saflaştırılmasının Önemi

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, biyokatalizörlerin diğer bir deyişle enzimlerin kullanım alanlarının artmasına neden olmuş ve yeni uygulama alanlarının da ortaya çıkması ile enzimlerin saf olarak elde edilmesi daha büyük önem kazanmıştır[80].

Proteinlerin saf olarak eldesi kendisi için bir son nokta değildir, saflaştırılması istenen protein eldesi daha sonraki çalışmalar için gereklidir. Bu çalışmalar proteinin aktivitesi, yapısı ya da işlev ilişkileri üzerinde olabilmektedir.

Protein fonksiyonlarının anlaşılmasında ilk temel adım bize, onları gözleme ve kullanma kolaylığı sağlayacak olan saflaştırma işlemidir. Proteinlerin saflaştırılmasıyla proteinlerin, aminoasit dizilerini, proteinler arasındaki evrimsel ilişkileri belirleyebilir ve farklı organizmalardaki bir proteinin biyokimyasal fonksiyonlarını inceleyebilmekteyiz.

Bir saflaştırma tekniğinin hedefi proteini en düşük maliyet, yüksek derecede saflık ve verimle elde etmektir. Bunu başarabilmek için saflaştırma tekniğinin ve adımlarının seçimi akıllıca yapılmalı ve adım sayısını en aza indirecek şekilde sıralanmalıdır.

Hedef proteinimiz için saflaştırma tekniğinin seçimi çalışmamızın amacı doğrultusunda değişmektedir. Seçilecek teknik için proteinlerin farklı yapısal özelliklerinden yararlanılmaktadır. Eğer saflaştırılacak protein, molekül büyüklüğü esasına göre saflaştırılacaksa jel filtrasyonu, elektriksel yük esasına göre saflaştırma işlemi yapılacaksa iyon değişimi kromatografisi kullanılmaktadır. Ayrıca hedef enzim ya da reseptör ise bunun aktivitesini bir substratı, çalışmamızda olduğu gibi ligandı ya da bir substrat analogu üzerinde yönlendirerek kromatografik saflaştırma tekniği olan afinite kromatografisi ile saflaştırma gerçekleştirilebilir. Seçilen teknik için uygun matriks ve koşulların belirlenmesiyle hedef proteinimiz karışımdan saflaştırılabilmektedir.

1.4 Afinite Kromatografisi

Bir biyolojik ligand veya onun sentetik bir analogu ile saflaştırılmak istenen molekül üzerindeki komplementer bağlama bölgesindeki spesifik etkileşimi esas alan, güçlü bir protein saflaştırma tekniğidir[81]. Biyolojik ligandlar arasında substrat, koenzim, hormon, antikor, nükleik asit gibi yapılar örnek olarak verilebilir [82].

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[83].

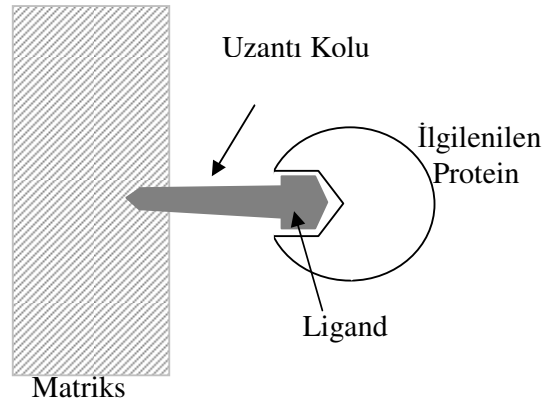
Afinite kromatografisinin ve son zamanlarda da hidrofobik adsorpsiyon kromatografisinin biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında ve izolasyonunda güçlü teknikler olduğu ispatlanmıştır. Afinite kromatografisi ilk defa 1910 yılında amilazın çözünmeyen nişastaya adsorpsiyonu sonucu izolasyonunda kullanılmıştır. 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[83].

Ayrıca literatürde, afinite jelleri için kullanılan matrikslerin aktivasyonu için, oksiran aktifleştirilmesi, karbodiimid aktifleştirilmesi gibi değişik aktifleştirilme yöntemleri de kullanılmıştır[83]. 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[83]. Literatürde afinite jelleri için kullanılan matrikslerin aktivasyonu için, CNBr aktifleştirilmesi dışında, oksiran ve karbodiimid aktifleştirilmesi gibi değişik aktifleştirme yöntemleri de bulunmaktadır[83].

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.

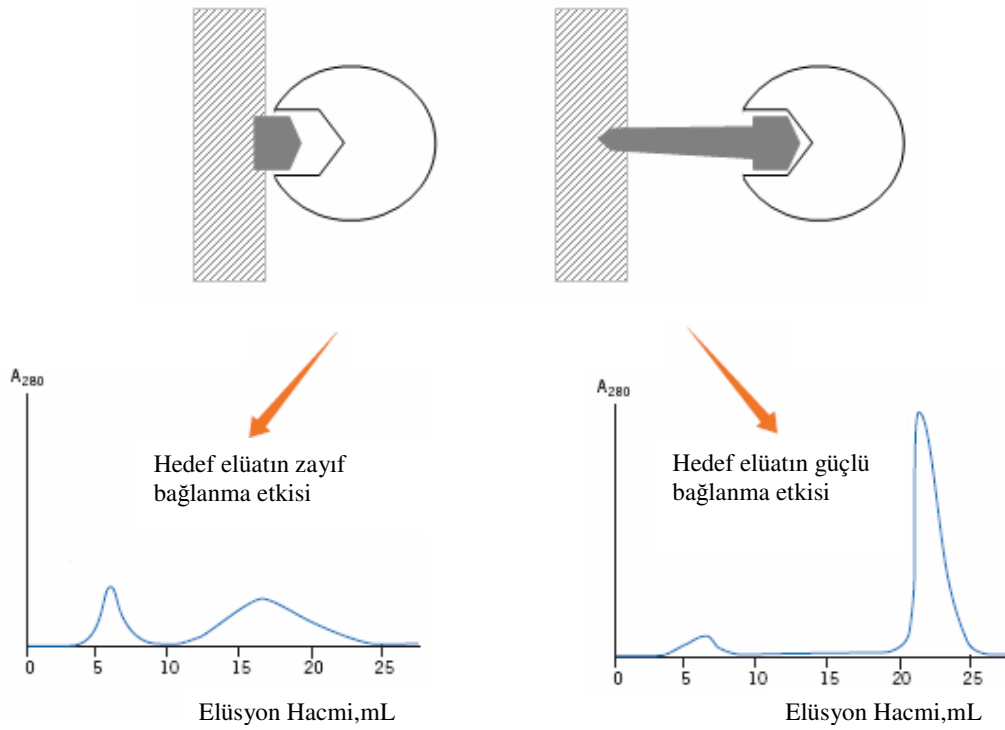
Afinite kromatografisinde, katı destek materyaline “ligand” adı verilen özel bir molekül immobilize edilir. Bu molekül saflaştırılmak istenen materyale karşı spesifik bir biyolojik ilgi duyarak onu belirli bir kuvvette dönüşümlü bir şekilde bağlamalıdır[84].



Şekil 1.7 Afinite kromatografisinin şematik gösterilişi.

Sephadex veya Sepharose gibi katı destek materyallerinden birine, uygun yöntemlerle ligandın bağlanarak hazırlanması sonucu oluşturulan bir afinite kolonundan saflaştırılması düşünülen bir molekül karışımı geçirildiğinde, sadece saflaştırılması istenilen molekül ligandla etkileşerek kolonda tutulur. İstenmeyen bütün safsızlıklar kolondan uygun bir tampon (yıkama tamponu) geçirilerek uzaklaştırılır. Kolonda tutulan ilgili molekül spesifik elüsyon tamponuyla kolondan alınır. Spesifik elüsyon, ilgili moleküle ligandan daha fazla afiniteye sahip madde içeren bu tampon çözelti ile gerçekleştirilir. Bu yöntemle tek basamakta yüzlerce kat saflaştırma yapılabilir (Şekil 1.7 - 1.10).

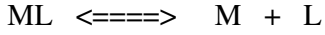
Afinite kromatografisi yönteminde, saflaştırılacak molekülün liganda bağlanması konusunda önemli bir sorun yaşanmaktadır. Çoğu durumda matriks ile saflaştırılacak molekül arasında, sterik engellerden dolayı ilgili molekülün bağlanma sorunu oluşabilir ve kolon verimi azalabilir. Bu sorunun önüne geçmek için ligand ile matriks arasına uygun bir uzantı kolu takılır. Uzantı kolu adı verilen bu molekülün 6-8 karbonlu bir yapıdan oluşması kolon verimini en yüksek seviyede tutmaktadır. Eğer uzantı kolu gereğinden daha uzun olursa, kol üzerine istenmeyen moleküller bağlanır ve bu moleküller yıkama ile giderilemeyebilir. Uzantı kolunun gereğinden kısa olması durumunda ise, sterik engellerden dolayı molekülün bağlanma sorunu devam edebilir[28].



Şekil 1.8 Uzantı Kolu Kullanımının gösterimi[85];

- Ligand doğrudan matrikse bağlı.
- Ligand uzantı kolu ile matrikse bağlı

Afinite Kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisinin özel bir çeşididir. Bu teknikte matriks denilen katı destek materyaline ligand adı verilen özel bir molekül immobilize edilir. Bu spesifik molekül, saflaştırılmak istenen materyale karşı biyolojik ilgi duyarak onu belirli bir kuvvette dönüşümlü bir şekilde bağlamalıdır.

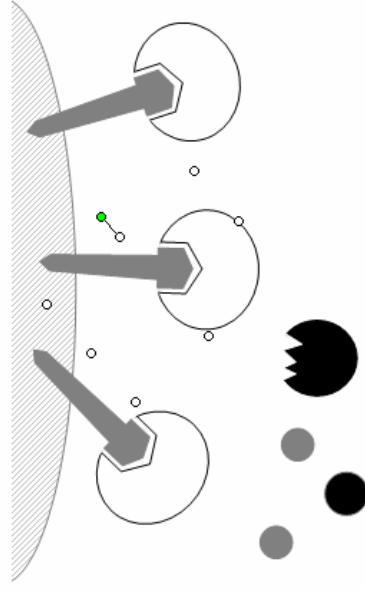


M= Makromolekül

L = Ligand

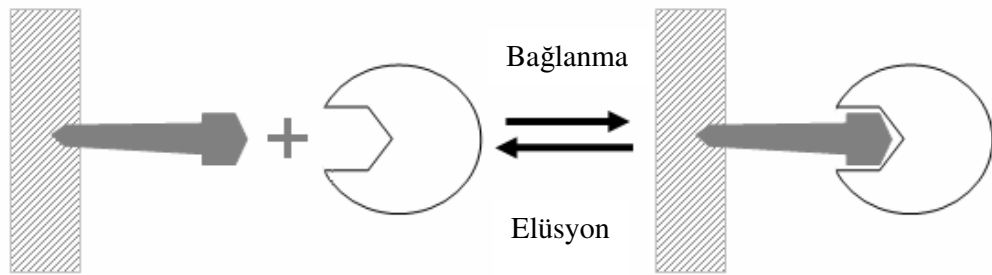
$$K = \frac{[M][L]}{[ML]} = 10^{-4} - 10^{-8} \text{ M arasında olmalıdır.}$$

Ligandın, uygun yöntemlerle suda çözülmeven Sephadex ve Sepharose gibi katı destek materyaline (matriks) bağlanarak hazırlanması sonucu oluşturulan bir afinite kolonundan, saflaştırılması düşünülen bir molekül karışımı geçirilirse sadece istenilen molekül ligant tarafından kolonda tutulur. İstenmeyen bütün safsızlıklar, kolondan uygun bir tampon geçirilerek uzaklaştırılır. Kolonda tutunan ilgili molekül, spesifik elüsyonla kolondan alınır. Spesifik elüsyon, ilgili moleküle liganttan daha yüksek afiniteye sahip madde içeren tampon çözelti ile gerçekleştirilir. Bu metotla, tek basamakta yüzlerce kat saflaştırma yapılır[84].



Şekil 1.9 Hedef proteinin matris ile teması ve istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması işleminin şematik gösterimi

Buna göre bir afinite kromotografi işlemi; uygun bir ligandın seçimi, taşıyıcı matris üzerine ligand immobilizasyonu (Şekil 1.8), protein karışımının matris ile temas ettirilmesi, istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması (Şekil 1.9) ve ilgilenilen proteinin saf olarak elüsyonu (Şekil 1.10) olmak üzere alt basamakları içerir.



Şekil 1.10 Hedef Proteinin Afinite Ligandına Adsorpsiyon ve Desorpsiyonunun şematik gösterimi

Bu bilgilere göre, bir afinite kromatografi işlemi şu alt basakları içermektedir :

1. Uygun bir ligandın seçimi
2. Ligandın taşıyıcı matriks üzerine immobilizasyonu
3. Protein karışımının matriks ile temas ettirilmesi
4. İstenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması
5. İlgilenilen proteinin saf olarak elüsyonu

Sonuç olarak, proteinlerin aktive edilmiş matrikslere bağlanmasındaki koşullar proteinin denatürasyonuna ya da inaktivasyonuna neden olmamalıdır. Genelde bağlanma protein molekülünün dış yüzeyindeki lizin rezidüleri, ya da başka bir amin grubu ile olur. Bu grup nükleofilik yani protonlanmamış halde bulunacağı yüksek bir değerde olmalı fakat inaktivasyona neden olacak kadar da yüksek olmamalıdır. Tüm bu özellikler göz önüne alınırsa, bir afinite kolonunun verimli olabilmesi için matriksin iyi akış özelliklerine sahip, ligandı bağlama ve elüsyon işlemlerine dayanıklı ve akan bileşiklerle etkileşme yapmayan bir yapıda olması, ligandın ise adsorbe edeceği bileşiklerle 10^{-4} – 10^{-8} M arasında değişen bir afinitesi olmalıdır. Bu sağlandığı zaman kolonun kapasitesi artar ve istenilen protein yüksek derecede saflaştırılmış olarak elde edilir[86].

1.4.1 Çalışmada Kullanılan Eupergit C-250L Matriksi

Ticari ürünler olan Eupergit C ve Eupergit C-250L matriksleri farklı enzimlerin immobilizasyonu, enzim geri kazanım işlemlerinde, reaksiyonların farklı türlerinde ve sağlam destekler olmaları nedeniyle kromatografik işlemlerde de kullanılmaktadır[36]. Her ikisinde 100–250 µm/g çapında küçük gözenekli, aktif oksiran grupları içeren akrilik boncuklar şeklindedir. Bu iki matriks gözeneklilik ve oksiran grupları içerme bakımından birbirlerinden ayrılırlar. Eupergit C-250L, Eupergit C den daha geniş porlara ve ($r=100$ nm) ve daha düşük oksiran yoğunluğuna sahiptir[36].

Çalışmamızda matriks olarak seçtiğimiz Eupergit C-250L' nin

- Yapısının yüksek bir kimyasal kararlılık göstermesi ve polar organik çözücülerin denatürasyonuna karşı gelişmiş bir kararlılık göstermesi,
- Isı artışına karşı gösterdiği termal kararlılık,
- Mekaniksel kararlılığı ile karıştırma ve filtrasyon işlemlerinde fiziksel özelliklerini koruması,
- Proteinlerin iç yüzeylere ulaşması için gözenek büyüklüğünün yeteri kadar fazla olması,
- Reaktif oksiran gruplarının yüksek yoğunluğu ile reaksiyonun ılıman koşullarda gerçekleşmesi,
- Aktif oksiran gruplarının yüksek yoğunluğu birçok noktadan reaktif olarak etkileşme olanağı sağlamasıyla reaksiyon kapasitesini yüksek oranda arttırması gibi özelliklere sahip olması nedeniyle çalışmada matriks olarak seçilmiştir[36].

1.4.2 Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması

Karbonik anhidrazın memeli türlerinden izolasyonunda kaynak ve izoenzimlerine göre farklı yöntemler uygulanmaktadır[34]. Üzerinde en fazla çalışma durulan olan izoenzimler sitoplazmik karbonik anhidraz I ve karbonik anhidraz II dir. Bu iki izoenzimin en kolay elde edilebilir kaynağı eritrositlerdir. Yapılan çalışmalarda eritrositlerde fazla miktarda bulunan hemoglobin, kloroform – etanol çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi ya da ısı ile denatürasyon yöntemleriyle uzaklaştırılabilmektedir. Bunların yanında üç-faz ayrışma yönteminde bir alternatif olmuştur[34].

Karbonik anhidraz I ve II'nin izolasyonunda en çok kullanılan yöntem afinite kromatografisidir[34]. İlk defa 1970 lerde uygulanmaya başlamış olan bu yöntemle sonraları karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir. Bu yöntemlerde destek maddesi olan jelle enzimin güçlü bir şekilde bağlandığı inhibitörleri takılmakta ve enzimin bu moleküller aracılığıyla kolonda tutulması sağlanmaktadır. Bu anlamda en çok kullanılan inhibitörler de sülfanilamidlerdir.[34].

Ancak özellikle karbonik anhidraz II fraksiyonlarında bir miktar hemoglobin kirlenmesinin olabildiği tespit edilmiş ve bunun nedeninin karbonik anhidraz II ve hemoglobin arasında spesifik bir etkileşimin bulunmasının olabileceği bildirilmiştir [87].

Bu türden etkileşimden kurtulmak için karbonik anhidraz II gen transferiyle *E. coli*'den sentezlenebilir. Ancak bu durumda enzimin amino ucundaki asetillenmelerin olmayacağına dikkat edilmelidir. Mutasyon teknikleriyle hazırlanan inaktif karbonik anhidraz II'nin izolasyonunda inhibitörlerle bağlanmanın olmadığı durumlarda alternatif yöntemler uygulanmıştır. Önce %40 doygunlukta amonyum sülfat ile diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış sonra %90 amonyum sülfat doygunluğunda insan karbonik anhidraz II çöktürülmüştür. Diyalizi takiben DEAE-Sephacel kolonundan geçirme ve sonra S-Sepharose ile kromatografi uygulanarak enzim %98 saflıkta elde edilmiştir. Bir grup araştırmacı da mutant enzim izolasyonunda S-Sepharose ile anyon değişimini, sonra fenil-Sepharose ile hidrofobik etkileşim kromatografisini ve son olarak da Sephacryl S-100 ile jel filtrasyonunu kullanmışlardır[88].

Karbonik anhidraz III'ün afinite kromatografisinde kullanılan inhibitörlere bağlanmasının çok zayıf olmasından dolayı bu izoenzim önceleri farklı yöntemlerle izole edilmiştir. Sonraları bu izoenzimin p-aminobenzensülfonamid'e yeteri derecede bağlandığı gösterilmiş ve bu inhibitör kullanılarak enzim afinite kromatografisi ile izole edilebilmiştir. Benzer şekilde membrana bağlı bir izoform olan karbonik anhidraz IV'ün de izole edilmesi, p-aminobenzensülfonamid'li afinite kolonu kullanılarak sağlanmıştır [88].

Mitokondriyel bir enzim olan karbonik anhidraz V izolasyonunda, mitokondrilerin bütün sitozolik bileşenlerden ayrılmasını takiben dondurucuda bekletilip santrifüjlenmesi ve elde edilen tamamen çözünür durumdaki mitokondriyel matriks, p-aminobenzensülfonamid'in CM Biogel A'ya takılmasıyla hazırlanmış jelin bulunduğu kolondan geçirilmiştir. Daha sonra enzim sodyum azidür (NaN_3) ile elüe edilerek başarılı bir şekilde izole edilmiştir [89].

Salgılanan bir enzim olan karbonik anhidraz VI, inhibitörlerle karbonik anhidraz II'ye benzer şekilde etkileşmektedir ve bu nedenle afinite kromatografisi

izolasyon amacıyla rahatlıkla kullanılabilmiştir[90]. Bu maksatla p-aminobenzen-sülfonamid kolonlu afinite kromatografisi uygulanmıştır.

Memeli izoenzimlerinin haricinde diğer karbonik anhidraz izoformları da özellikle p-aminobenzen-sülfonamid kullanılarak afinite kromatografisiyle izole edilebilmektedir. Bu izoenzimlerin izolasyonunda birçok farklı yöntem de uygulanmıştır. Bunlar arasında Sephadex G-75 ile jel-permeasyon kromatografisi, CM-selüloz katyon değişimi kromatografisi, DEAE Sephadex A-50 anyon değişimi kromatografisi, DEAE-selüloz kromatografisi, DEAE-hidroksilapatit kromatografisi sayılabilir. Bu yöntemler tek başlarına değil genellikle birkaç tanesi ardışık olarak uygulanmıştır. Bu yöntemlerin uygulandığı çalışmalarda istenmeyen proteinlerden kurtulmak için birinci basamakta etanol-kloroform çöktürmesi sıklıkla uygulanmaktadır [91].

Afinite kromatografisi ile, hedef protein kısa zamanda ve tek basamakta yüksek bir verimle saflaştırma elde edilebildiği için[93] CA enziminin saflaştırılması için, en çok uygulanan kromatografik metot, afinite kromatografi yöntemidir.

Literatürde, Eupergit C-250 L polimer bileşiği kullanılarak afinite kromatografisi üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır[29-33]. Ozensoy ve arkadaşları 2004 yılında Eupergit C-250 L polimer materyalinin aktif oksiran gruplarına, karbonik anhidrazın güçlü inhibitörü olan p-aminobenzen-sülfonamidi herhangi bir aktivasyon metodu ve uzantı kolu bağlamadan kullanmışlardır[28].

Çizelge 1.3’de gösterildiği üzere, bitki CA enzimi dışında ligand olarak benzen sülfonamid türevleri kullanılmıştır. Bunun nedeni, bitki CA enziminin benzen sülfonamidler tarafından çok az inhibe edilmesiyle açıklanmaktadır. Bu tabloda gösterilen uzantı kolonuna sahip afinite jellerinin yüksek bir kapasiteye sahip olduklarını vurgulamaktadır. Ayrıca matrikse takılan uzantı kollarının farklılığı da, kolon verimi üzerindeki değişik sonuçları, beraberinde getirmektedir.

Çizelge 1.3 CA enziminin saflaştırılması için daha önceki araştırmacılar tarafından sentezlenen afinite jelleri[28].

<i>Matriks</i>	<i>Ligand</i>	<i>Uzantı Kolu</i>	<i>CA kapasite -si (mg / mL jel)</i>	<i>Ligand'ın bağlanma reaksiyonu</i>	<i>Uygulandığı canlılar ve dokular</i>
Sephadex G-150 Sepharose 2B, 4B, 6B	p-aminobenzen sülfonamid	----	3 - 4	CNBr Aktifleşmesi	İnsan eritrositleri Bakteri
Sepharose 4B	p-aminobenzen sülfonamid	----	<5	CNBr Aktifleşmesi	İnsan eritrosit izoenzimleri
Sepharose 6B	p-aminobenzen sülfonamid	CH ₂ CH(OH)CH ₂ O(CH ₂) ₄ OCH ₂ - (H ₂ CHCOH)	----	Oksiran Aktifleşmesi	İnsan böbreği
CM Sephadex C-50	p-aminobenzen sülfonamid	m-NH ₂ (C ₆ H ₄)NHCOCH ₂	17-23	Karbodiimid Aktifleşmesi	İnsan ve maymun eritrositleri
Sepharose 4B	2-amino-1,3,4-tiyadiazol-5 sülfonamid	NH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₄ COOH NH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₉ COOH	----	Karbodiimid Aktifleş-mesi	Bitki fotosentetik hücreleri
CM-Bio-Gel A	p-aminometil sülfonamid	-CH ₂ CONHCH ₂ -	15-20	Karbodiimid Aktifleşmesi	İnsan eritrositleri
Sepharose 6B	p-aminobenzen sülfonamid	CH ₂ CH(OH)CH ₂ O(CH ₂) ₄ OCH ₂ - (H ₂ CHCOH)	----	CNBr Aktifleşmesi	Sığır göz lensi
Sepharose 4B	p-aminobenzen sülfonamid	L-tirozin	260-301-317 mg(g)	CNBr Aktifleşmesi	İnsan eritrositleri
CM Sephadex C-50	p-aminobenzen sülfonamid	L-tirozin	509 mg/g	EEDQ Aktifleşmesi	İnsan eritrositleri
Eupergit C-250 L	p-aminobenzen sülfonamid	----	----	Oksiran Reaksiyonu	İnsan eritrositleri Sığır eritrosit

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyaller

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan, metakrilamid ve N,N'-metilen-bis-(metakrilamid) monomerlerinin bir kopolimeri olan Eupergit-C 250 L polimer materyali Röhm-Pharma Polymers (GmbH & Co. KG.) firmasından temin edilmiştir. Standart serum albumin, N, N, N', N'- tetra metil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, akrilamid, coomassie brillant blue G-250, Coomassie brillant blue R-250, fenol-red, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timol mavisi, SDS, β - merkapto etanol, glisin Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, sodyum karbonat, trihidroksi metil aminometan (Tris), sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, amonyum sülfat, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, hidroklorik asit, asetik asit, sülfürik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, sodyum nitrat, sodyum tiyosiyanat, sodyum siyanür, Merck A.G'den; sodyum mono hidrojen fosfat, sodyum di hidrojen fosfat, metanol, etanol, amonyum per sülfat, potasyum iyodür, dekstroz Riel de Haen A.G'den, ve karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmalar esnasında, aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

IR spektrometresi	: Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX 1234
UV-Spektrometresi	: CARY 1E, UV-Visible Spectrophotometer-VARIAN
Masa Santrifüjü	: Hettich zentrifugen EBA 12 R
Soğutmalı santrifüj	: Sigma Laborzentrifugen 3K 15 / 10706 / 10707
PH-metre	: Orion- model 920A

Kullanılan alet ve cihazların devamıdır

Elektroforez tankı	: Hoefer, HSI
Peristaltik pompa	: Pharmacia Fine Chemicals (Chromatograph Attd.S1211)
Hassas terazi	: Libror, AEG-220 (Shimadzu)
Kromatografi kolonu	: Pharmacia Fine Chemicals
Kronometre	: Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr
Otomatik pipetler	: Eppendorf, Medisis
Magnetik karıştırıcı	: ARE magnetic, heating stirrer IKA Combimag RCO
Çalkalayıcı	: Biolab 1575-2B shaker
Otoklav	: Hirayama (Hıclave HV-85)
Buz makinesi	: Fiocchetti Scotsman Automatic ice machine AF 10
Vorteks	: Fisons Whirli Mixer
Etüv	: Elektromag
Sabit sıcaklık sirkülatörü	: Techne-Tempette Junior TE-8J

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere, aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

1. 0.05 M Tris-SO₄, pH=7.4 (diyalizde kullanılan tampon) : 6.055 g (0.05 mol) Tris-HCl, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N H₂SO₄ ile pH=7.4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

2. 0.15 M Na₂CO₃ / 0.1 M NaHCO₃, pH=10.0 (CO₂-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon) : 15.9 g (0.15 mol) Na₂CO₃ ve 8.4 g (0.1 mol) NaHCO₃'ın 1 litre destile suda çözülmesi ile hazırlandı.

3. 25 mM Tris-HCl / 0.1 M Na₂SO₄, pH=9.5, 9.0, 8.5, 8.0, 7.5, 7.0, 6.5 (afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon çözeltiler) : 3.0275 g (25 mmol) Tris ve 14.2 g (0.1 mol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile ayrı ayrı söz konusu pH'lara getirildi ve daha sonra son hacimler 1 litreye tamamlandı.

4. 25 mM Tris-HCl / 0.05 M Na₂SO₄, pH=8.5 (afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon çözelti) : 3.0275 g (25 mmol) Tris ve 7.1 g (0.05 mol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile ayrı ayrı söz konusu pH'ya getirildi ve daha sonra son hacim 1 litreye tamamlandı.

5. 25 mM Tris-HCl / 0.15 M Na₂SO₄, pH=8.5 (afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon çözelti) : 3.0275 g (25 mmol) Tris ve 21.3 g (0.15mol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile ayrı ayrı söz konusu pH'ya getirildi ve daha sonra son hacim 1 litreye tamamlandı.

6. 25 mM Tris-HCl / 0.2 M Na₂SO₄, pH=8.5 (afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon çözelti) : 3.0275 g (25 mmol) Tris ve 28.4 g (0.2 mol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile ayrı ayrı söz konusu pH'ya getirildi ve daha sonra son hacim 1 litreye tamamlandı.

7. Hemolizat tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄, (pH=9.5, 9.0, 8.5, 8.0, 7.5, 7.0, 6.5) tampon çözeltiler : 3.0275 g (25 mmol) Tris ve 3.124 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile ayrı ayrı söz konusu pH'lara getirildi ve daha sonra son hacimler 1 litreye tamamlandı.

8. 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH=6.3 (kolona tutunmuş hCA-I izoenziminin elüsyonu için kullanılan çözelti) : 3.55 g (25 mmol) Na₂HPO₄ ve 29.25 g NaCl alınıp, pH=6.3'e titre edildikten sonra toplam hacim 500 mL' ye tamamlandı.

9. 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄, pH=5.6 (afinite jeline adsorbe olan BCA ve hCA-II izoenzimlerinin elüsyonu için kullanılan çözelti) : 9.187 g (0.075 mol) NaClO₄ ve 2.04 g (0.15 mol) NaCH₃COO.3H₂O, 120 mL destile su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5.6'ya kadar titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

10. 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, pH=6,3 (afinite jeline tutunmuş BCA ve hCA-II izoenzimlerinin elüsyonu için kullanılan çözelti) : 13 g (0.2 mol) NaN₃ ve 6.05 g (0.05 mol) Tris, 450 mL destile suda çözüldü ve 1 N H₂SO₄ ile pH=6,3'e titre edildikten sonra, son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

11. 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄, pH=7.0 (hCA-I izoenzimi için kullanılan elüsyon çözeltisi) : 33.2 g (0.2 mol) KI ve 6.05 g (0.05 mol) Tris, 450 mL destile suda çözüldü ve 1 N H₂SO₄ ile pH=7.0'ye titre edildikten sonra, son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

12. 50mM Na₂HPO₄ / 0,2 M KSCN, pH=6.3 (kolondaki BCA ve hCA-II'nin elüsyonu için kullanılan çözelti) : 3.55 g (25 mmol) Na₂HPO₄ ve 9.7 g (0.1 mol) KSCN alınıp, pH 6.3'e titre edildikten sonra toplam hacim 500 mL'ye tamamlanır.

13. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu : 1.5 g Tris ve 7.2 g glisin, 50 mL suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL'lik % 0.1'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

14. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu :

0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)	2.5 mL
% 10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β-merkapt etanol	1.0 mL
Brom timol mavisi	0.01 g
Destile su	0.5 mL

15. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu :

Tris-HCl	3.0 g
Glisin	14.4 g
SDS	1.0 g
Destile su ile son hacim 1Lt'ye tamamlanır	

16. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı : SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları, Çizelge 2.2’de verilmektedir.

Çizelge 2.1 SDS-elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığma Jeli
	<u>% 10</u>	<u>% 3</u>
<u>Akril amid/Bis (% 30)</u> <u>Akril amid</u> <u>15 g</u> <u>Bis</u> <u>0.4 g</u> <u>Son hacim destile su ile 50 mL’ye</u> <u>tamamlanır.</u>	<u>16.65 mL</u>	<u>2.6 mL</u>
<u>Destile su</u>	<u>20.1 mL</u>	<u>12.2 mL</u>
<u>1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)</u> <u>Tris-HCl</u> <u>11.82 g</u> <u>pH:8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH</u> <u>ilave edilerek son hacim destile su ile</u> <u>50 mL’ye tamamlanır.</u>	<u>12.5 mL</u>	-
<u>0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)</u> <u>Tris-HCl</u> <u>3.94 g</u> <u>pH:6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH</u> <u>ilave edilerek son hacim destile su ile</u> <u>50 mL’ye tamamlanır.</u>	-	<u>5 mL</u>
<u>% 10’luk SDS</u> <u>SDS</u> <u>1 g</u> <u>Son hacim destile su ile 10 mL’ye</u> <u>tamamlanır.</u>	<u>0.5 mL</u>	<u>200 µL</u>
<u>TEMED</u>	<u>25 µL</u>	<u>20 µL</u>
<u>% 10’luk amonyum persülfat</u> <u>Amonyum persülfat</u> <u>1 g</u> <u>Son hacim destile su ile 10 mL olur</u>	<u>750 µL</u>	<u>400 µL</u>

17. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan boyama çözeltisi :
0.66 gr Coomassie brilliant blue R-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL destile su ilave edildi.

18. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi :
% 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

19. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi :
0.66 g Coomassie brilliant blue R-250 120 mL etanolde çözüldü ve bunun üzerine, 24 mL saf asetik asit ile 120 mL destile suyun ilavesiyle hazırlandı.

20. Protein tayininde kullanılan standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL) : 25 mg standart serum albumin 25 mL saf suda çözüldü.

21. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti : 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 100 mL % 95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi destile su ile 1 litreye tamamlandı.

22. Kan numuneleri için antikoagulant Asit-sitrat dekstroz çözeltisi (ACD) : 22 g sodyum sitrat dihidrat, 8 g sitrik asit, 24 g dekstroz bir miktar destile suda çözümlenerek son hacim 1 litreye tamamlandı.

2.2 Yöntemler

2.2.1 Protein Tayini

2.2.1.1 Kalitatif Protein Tayini

Kromotografi işlemleri sonunda, eluatlar eşit hacimde alınarak bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı[92]. Bu metotun esası, 280 nm dalga boyunda proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi prensibine dayanmaktadır. Kolon fraksiyonları eşit hacimde kuvars küvetlere alınarak, absorbandsları UV-spektrofotometrede köre karşı okundu.

2.2.1.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Bu yöntemle, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltileri ve hemolizatlardaki protein miktarları belirlendi. Bu yöntem, Coomassie brilliant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanma esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm dalga boyunda maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması, 2 dakika gibi çok hızlı bir zamanda gerçekleşir. Bu yöntemin hassasiyeti, 1-100 µg arasındadır[93].

Tayin işlemlerinde; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltilisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alındı ve destile su ile tüm tüplerin hacmi 0.1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie reaktifi her bir tüpe ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm dalga boyunda 3 mL'lik kuvars küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Köre olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri, standart grafik olarak elde edildi (Şekil 3.1).

2.2.2 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

2.2.2.1 CO₂-Hidrat az Aktivitesi

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması esnasındaki aktivite ölçümleri, CO₂-hidrat az aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Maren ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları bu yöntem, CA enziminin saflaştırılması esnasında hemen hemen tüm araştırmacılar tarafından uygulanmıştır. Bu yöntem, CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH değerinin 10.0'dan 7.4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi prensibindedir. Burada indikatör olarak, pH=7.4'de renk değiştiren fenol kırmızısı kullanıldı. Tampon olarak da pH değeri 10.0 olan karbonat tamponundan (0.15 M Na₂CO₃ + 0.1 M NaHCO₃) yararlanıldı[75].

Deney prosedürü, şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Reaksiyon tüpüne önce 2 mL indikatör ve 1.5 mL doymuş CO₂ çözeltileri konuldu. Bu karışımın üzerine, kolondan alınmış enzim çözeltisinden 0.1 mL ilave edildikten hemen sonra aynı anda 0.4 mL karbonat tamponu katılarak, kırmızı rengin sarıya dönmesi için geçen süre, kronometre ile belirlendi (tc). Aynı işlemler, her numunenin çalışılmasından önce enzim çözeltisi yerine 0.1 mL destile su konularak, yapıldı (to). Bu yöntemle göre, CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Buna göre;

$$EU = (to - tc) / tc$$

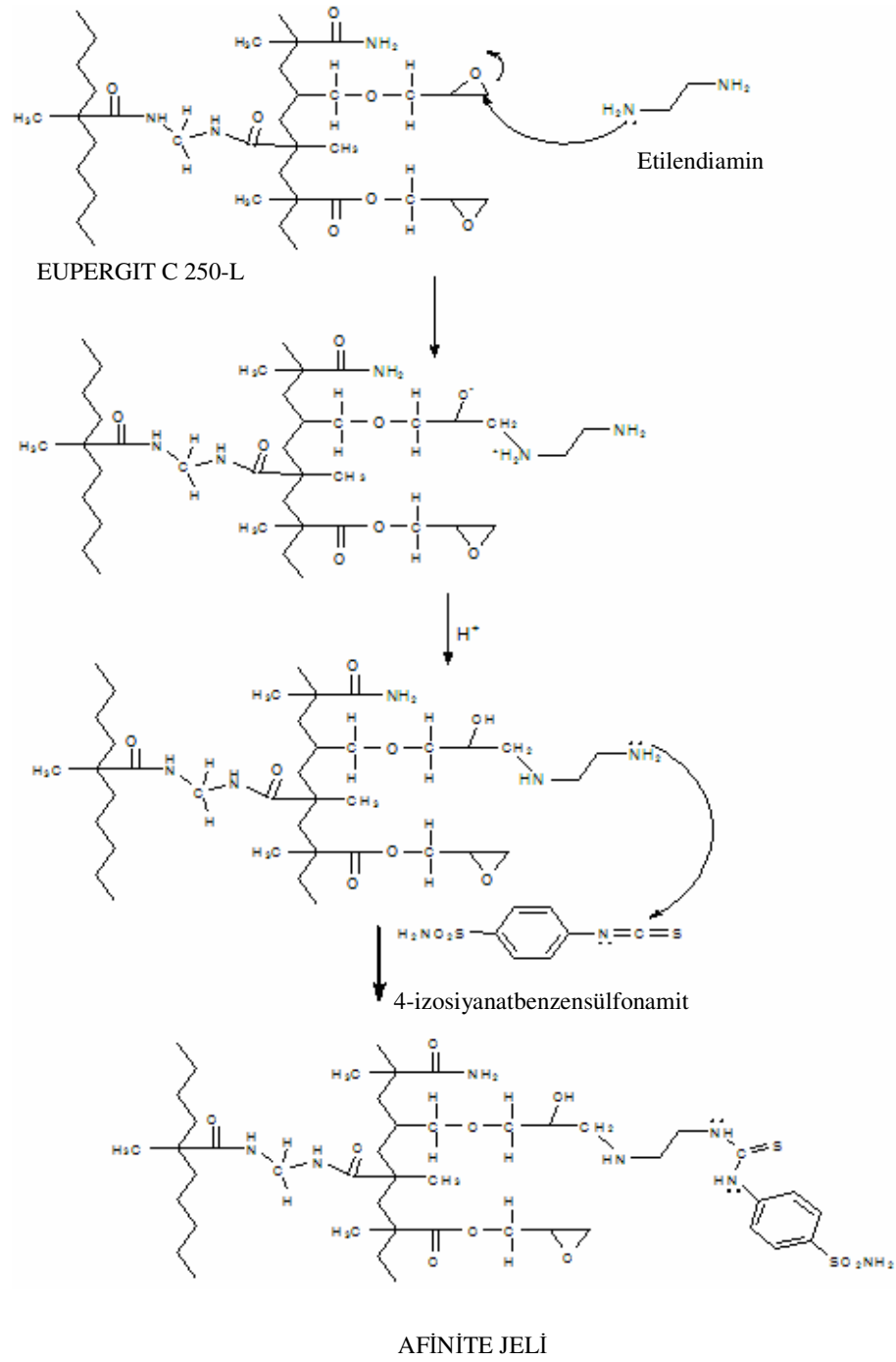
formülüne göre, kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplanır.

2.2.3 Afinite Jelinin Hazırlanması

Eupergit C-250 L'nin süspansiyonu ve sülfonamidin kenetlendirilmesi:

1 gram Eupergit C-250 L, 100 mL 0.1 M pH=7.5 fosfat tamponu içinde süspansiyon edildi ve süspansiyon çalkalama banyosunda 90 rpm' de, 24⁰ C sıcaklıkta

72 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 7 ml etilendiamin ortama katılarak 24 saat inkübe edildi. 25 mg sülfonilamid, 0° C' de, 5 mL dimetilsülfoksit içerisinde çözüldü. Süspanse edilen matriksin, inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, sülfonamid bu süspansiyona eklenerek aynı pH'da sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1litre soğuk destile su ve 0.05 M Tris-SO₄ (pH=7.5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içinde muhafaza edildi[33,94,95]. Reaksiyonların açık formülleri aşağıda gösterilmiştir:



Şekil 2.1 Eupergit C-250 L-sülfonamid yapısına sahip afinite jelinin kimyasal reaksiyonu

2.2.4 Sığır Eritrosit Karbonik Anhidraz Enziminin (BCA) Saflaştırılması

2.2.4.1 Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizat Eldesi

Deneyleer için sığır kanı, Balıkesir Belediyesi mezbahasından kesim esnasında temin edildi. Antikoagülant olarak, asit-sitrat dekstroz (ACD) çözeltilisinden 100 mL kan numunesi için 15 mL kullanıldı. Bu çözeltili sayesinde, pıhtılaşma önlenerek eritrositler içinde bir beslenme ortamı sağlandı. Kan numuneleri alındıktan sonra, 4° C sıcaklıkta muhafaza edildi ve en çok 2 gün içerisinde kullanıldı[96].

Eritrositleri ayırmak için, kan 25 mL'lik tüplere konuldu ve 20 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi. Daha sonra, tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde ayrılarak, altta kalan eritrositler % 0.9'luk NaCl çözeltilisi ile 2 defa yıkanıp üstteki kısımlar atıldı. Bu işlemler sonucunda, 100 mL kandan 40-50 mL eritrosit elde edildi. Elde edilen eritrositler, hacimlerinin 5 misli soğuk destile su ile hemoliz edildi[63]. Hemoliz edilen tüpler bir araya getirilip, hemolizin tam olarak sağlanması için yarım saat süre ile 0°C sıcaklıkta çalkalandı. Hazırlanan hemolizattan hücre zarlarını ayırmak için, 4° C'de 15.000 rpm devirde 40 dakika santrifüjleme yapıldı. Daha sonra tüplerin dibine çöken hücre zarları atılarak, üstte kalan hemolizat dikkatli bir şekilde alındı. Böylelikle, hücre zarlarından ayrılmış olan hemolizatın pH'sı, katı Tris-baz ile ayarlanarak hemolizat afinite kolonuna tatbik edilecek duruma getirildi.

2.2.4.2 Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli, 1.8 cm x 12 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 25 mM Tris-HCl / 0.1 M Na₂SO₄ (pH=8.5) tampon çözeltilisi ile dengelendi. Önceden hazırlanan hemolizat kolona tatbik edilerek, 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ (pH=8.5) tampon çözeltilisi ile yıkandı. Böylece, karbonik anhidrazın büyük kısmı afinite kolonuna tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. BCA izoenziminin afinite kolonundan enzim elüsyonu için, aşağıdaki elüsyon çözeltileri kullanılmıştır;

- (i) 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄, (pH=5.6)
- (ii) 50mM Na₂HPO₄ / 0,2 M KSCN, (pH=6.3)
- (iii) 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, (pH=6.3)

Bu elüsyon çözeltileri ile, kolonun akış hızı 20 mL / saat olarak ayarlanarak, 2'er mL fraksiyonlar şeklinde tüpler toplandı. Tüplere alınan her bir eluatta, 280 nm dalga boyunda kalitatif protein tayini ve CO₂-hidrataz aktivitesi tayini yapıldı [77,92]. Daha sonra aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek, saflaştırılan enzim çözeltisi önce destile suya karşı 6 saat kadar iki defa suyu değiştirilerek ve daha sonra da 0.05 M Tris-SO₄ (pH=7.4) çözeltisine karşı 3 saat kadar 1 defa tampon değiştirilerek diyaliz edildi[63]. Saf enzim ve hemolizatta Bradford yöntemiyle, kantitatif olarak protein miktarı belirlendi ve ayrı ayrı spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma oranı bulundu.

2.2.5 İnsan Eritrosit İzoenzimlerinin Ayrılması

2.2.5.1 Kan Numunelerinin Alınması, Hemolizat Eldesi ve Afinite Kolonuna Uygulanması

Deneyler için sığır kanı, Balıkesir Belediyesi Mezbahası'ndan temin edildi. Kan numunesi, en çok 3-4 gün içerisinde 4⁰C sıcaklıkta muhafaza edildikten hemen sonra kullanıldı. Eritrositleri ayırmak için kan, 5 mL'lik tüplere konuldu ve 5000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakaları, dikkatli bir şekilde alındı. Daha sonra eritrositler, % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile iki defa yıkanarak tüplerin üst kısımları atıldı ve elde edilen eritrositler hacimlerinin 5 misli soğuk destile su ile hemoliz edildi. Hemolizin tam olarak gerçekleşmesi için, 0⁰C'de hemolizat yarım saat süreyle karıştırıldı[63]. Bundan sonra, hemolizat hücre zarlarından ayrılmak üzere 16.000 rpm devirde 40 dakika, 4⁰C'de santrifüj edilerek, tüplerin altında kalan hücre zarları tabakası atıldı ve hücre zarlarından ayrılmış hemolizatın pH'sı katı Tris-baz ile 8.5'a ayarlandı.

İnsan eritrosit CA izoenzimlerinin saflaştırılmasında kullanılan kolon, 25 mM Tris-HCl / 0.1 M Na₂SO₄ (pH=8.5) tampon çözeltisi ile dengelendikten sonra, hazırlanan hemolizat kolona tatbik edilerek, 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ (pH=8.5) tampon çözeltisi ile yıkandı. Böylece, insan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin büyük kısmı kolona adsorbe olmuş şekilde diğer safsızlıklardan uzaklaştırılmıştır.

2.2.5.2 İzoenzimleri Ayırma Deneyleri

Afinite kolonuna adsorbe olmuş hCA-I ve hCA-II izoenzimlerini ayırmak için, diğer araştırmacılar ve tarafımızdan uygun bulunan elüsyon çözeltilerinin uygulama yöntemleri ve konsantrasyonları, afinite kolonuna aşağıdaki şekilde tatbik edildi :

(i) 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl (pH=6.3) ile hCA-I ve 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, (pH=6.3) hCA-II izoenzimlerinin elüsyonu : Burada önce pH 6.3 olan fosfat tamponu içerisinde 1 M NaCl çözeltisi, hCA-I izoenzimini elue etmek için kullanıldı. Ancak uzun süre, bu çözeltinin tatbik edilmesine rağmen hCA-I izoenzimi kolondan tam olarak alınamadı. İkinci olarak, pH=6.3 olan Tris sülfat tamponu içerisinde 0.4 M NaN₃ kullanılarak hCA-II ile birlikte hCA-I izoenziminin elüsyonu gerçekleştirildi. Kolonun akış hızı 20 ml/saat olarak ayarlanarak her bir tüp fraksiyonu 2'er ml olarak alındı. Her bir tüp eluatında, 280 nm dalga boyunda protein tayini ve enzim aktivitesi için, CO₂-hidrataz aktivitesi tayini yapılarak, bu değerler, grafikte gösterildi (Şekil 3.13).

(ii) 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl (pH=6.3) ile hCA-I ve 50mM Na₂HPO₄ / 0,2 M KSCN, (pH=6.3) hCA-II'nin elüsyonu : Bu çalışmada, ilk denemedeki hCA-I elüsyonu aynen kullanıldı. Farklı olan, kolona adsorbe olmuş hCA-II izoenzimini elue etmek için enzim inhibitörlerinden bir diğeri olan Na₂HPO₄'de çözümlenerek hazırlanmış KSCN çözeltisinin kullanılmasıdır. İlk denemedeki sistem aynen devam ettirildi. Bu çalışma içinde sonuçlar, absorbans ve % aktiviteler olarak grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.14)

(iii) **50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl (pH=6.3) ile hCA-I ve 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄, (pH=5.6) hCA-II izoenziminin elüsyonu** : hCA-I elüsyonu diğer iki denemede olduğu gibi sabit tutularak, hCA-II izoenziminin elüsyonu, asetat tamponu içerisinde çözünerek hazırlanmış 0.5 M NaClO₄, (pH=5.6) ile yapıldı. Diğer denemelerdeki şartlar aynen uygulanarak peristaltik pompanın akışı gene 20 ml / saat'e ayarlanarak elüsyon hacimleri 2'er ml fraksiyonlar şeklinde toplandı. Eluatlardan elde edilen sonuçlar, grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.15).

(iv) **0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄, (pH=7.0) ile hCA-I ve 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄, (pH=5.6) hCA-II izoenzimlerinin elüsyonu** : Bu denemede, Tris tamponu içerisinde 0.1 M KI (pH=7.0) çözeltisi kolona adsorbe olmuş hCA-I izoenzimini elue etmek için kullanıldı. Elüsyon işlemi, 280 nm'de absorban vermeyinceye kadar sürdürüldükten sonra, hCA-II izoenziminin elüsyonu, asetat tamponu içerisinde çözünerek hazırlanmış 0.5 M NaClO₄, (pH=5.6) ile yapıldı. Kolonun akış hızı ve elüsyon hacimleri yapılan diğer denemelerle aynıdır. Bu çalışma sonuçları, grafiğe aktarıldı (Şekil 3.16).

(v) **0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄, (pH=7.0) ile hCA-I ve 50mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN, (pH=6.3) hCA-II izoenzimlerinin elüsyonu** : Bu denemede de, kolondan alınmak istenen hCA-I izoenziminin elüsyon çözeltisi sabit tutulmuş sadece çalışma şartlarından hCA-II elüsyon çözeltisi, fosfat tamponu içerisinde çözünerek hazırlanmış KSCN ile değiştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.17).

(vi) **0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄, (pH=7.0) ile hCA-I ve 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, (pH=6.3) hCA-II izoenzimlerinin elüsyonu** : Bu denemede de, kolondan alınmak istenen hCA-I izoenziminin elüsyon çözeltisi aynen kullanılmış fakat hCA-II elüsyon çözeltisi, Tris tamponu içerisinde çözünerek hazırlanmış 0.4 M NaN₃ ile değiştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, grafikte gösterilmiştir (Şekil 3.18).

2.2.6 Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildi. Diyaliz torbası içindeki enzim çözeltisi önce, destile suya karşı 12 saat kadar üç defa suyu değiştirilerek diyaliz edildi [58]. Daha sonra, 0.05 M Tris-SO₄ (pH=7.4) diyaliz tamponuna karşı 3-4 saat kadar diyalize bırakıldı.

2.2.7 Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimlerin saflaştırılmasından sonra % 3-10 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), Laemmli tarafından belirtilen yöntemle yapıldı[97].

Bunun için, elektroferez plakaları önce su, sonra alkol ile yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara, vazelin ince bir tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka, birbiri üstüne konuldu ve kışkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu.

Ayırma jeli hazırlanarak, plakalar arasına enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için, % 0.1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar beklendi (30 dak.). Ayırma jelinin katılaşmasından sonra, jelin düzgünleştirilmesi için konan % 0.1'lik SDS döküldü ve daha sonra yığma jeli, tarağın yerleştirilmesine izin verecek bir şekilde plakaların üst yüzeyine kadar dolduruldu. Tarak, üzerine dikkatli bir şekilde yerleştirilerek bir süre tarağın kuyucuklarının oluşması için bekletildi ve daha sonra tarak dikkatlice çıkarılarak oluşan kuyucuklar işaretlendi. Jelin üstü önce saf su, daha sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroferez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Elektroferez kuyucuklarına uygulanacak numunelerin her biri, 20 µg protein ihtiva edecek şekilde hazırlandı. Toplam hacim, 50 µL olacak şekilde 1/1 oranında hazırlanan numunelere numune tamponu katıldı. Bu numuneler, üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra numuneler soğutulurken, elektroferez

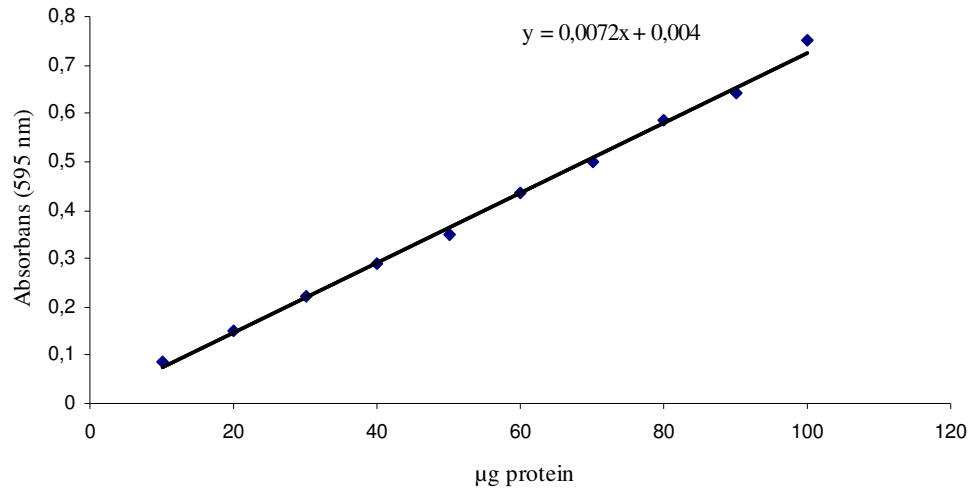
kuyucuklarına çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak, alt taraftan (+) kablo (anod), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Elektroforeze takılan güç kaynağı, önce 80 volt da yarım saat bekletildi ve daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu, tekrar kullanılmak üzere özel kabına konuldu. Jel de, özel kabına konularak renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar dolduruldu. 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renk açma çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı.

Renk açma çözeltisi aktif karbon üzerinden geçirilerek, tekrar tekrar kullanıldı. Jel, renk açma çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

3. BULGULAR

3.1 Kantatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayini, Bradford yöntemi ile yapıldı[93]. Bu yöntem için, önce standart bir eğri hazırlandı. Hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbsans değerleri, Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

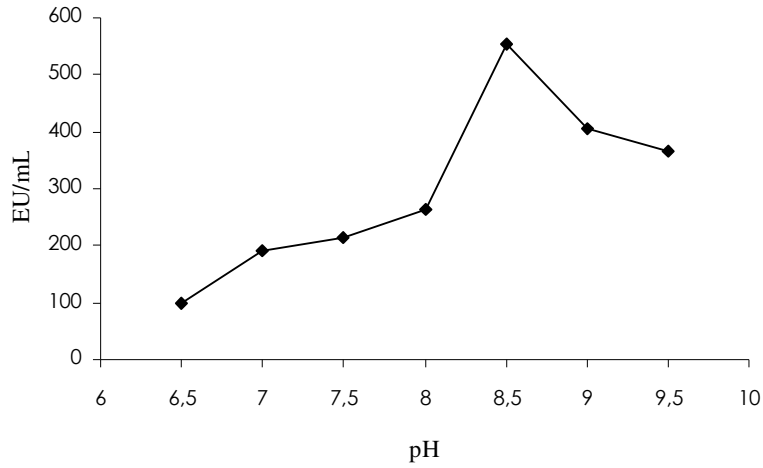


Şekil 3.1 Bradford yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik

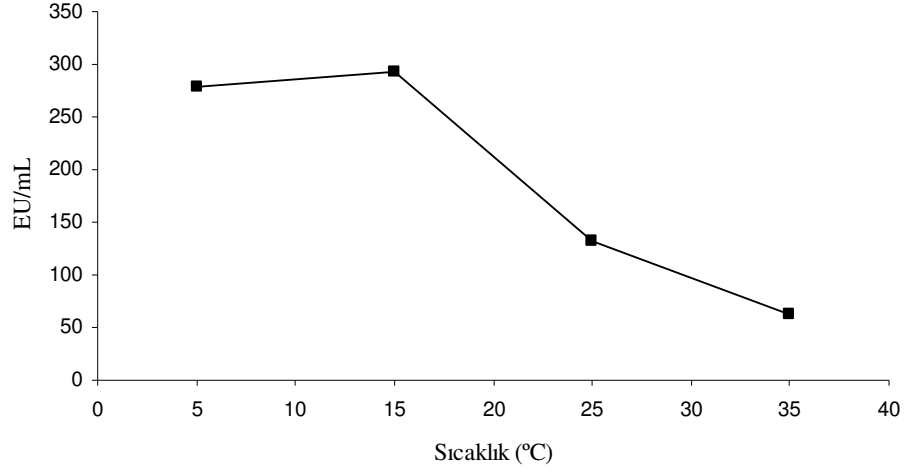
3.2 CA İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

3.2.1 Sığır Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimi (BCA)

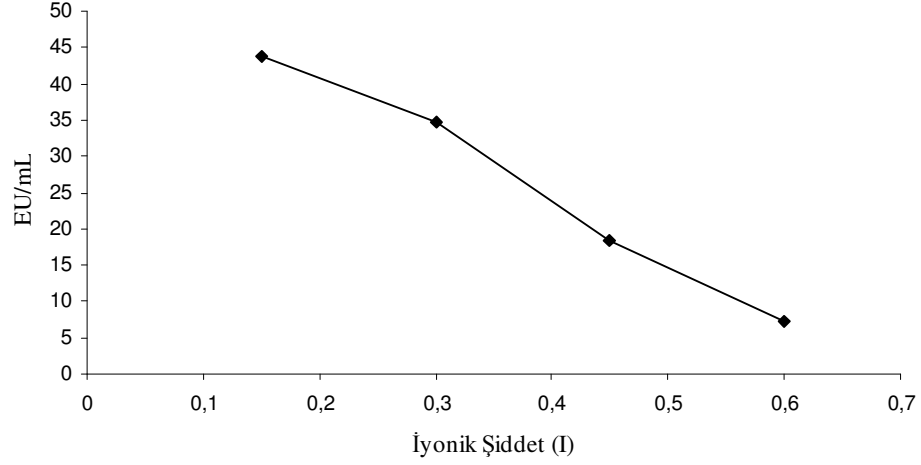
BCA enziminin saflaştırılması için, hemolizat direkt kolona tatbik edildi. Jelin kolona paketlenmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işlemleri, farklı pH değerleri (6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5); farklı sıcaklık (5, 15, 25, 35°C); farklı iyonik şiddet (0.15, 0.3, 0.45, 0.6) ve de farklı elüsyon tamponları (NaClO₄, NaN₃, KSCN) ile gerçekleştirildi. Kolon elüatlarında CO₂-hidrataz aktivite tayini yapıldı [77]. Elde edilen veriler, grafiklere aktarıldı (Şekil 3.2-3.5).



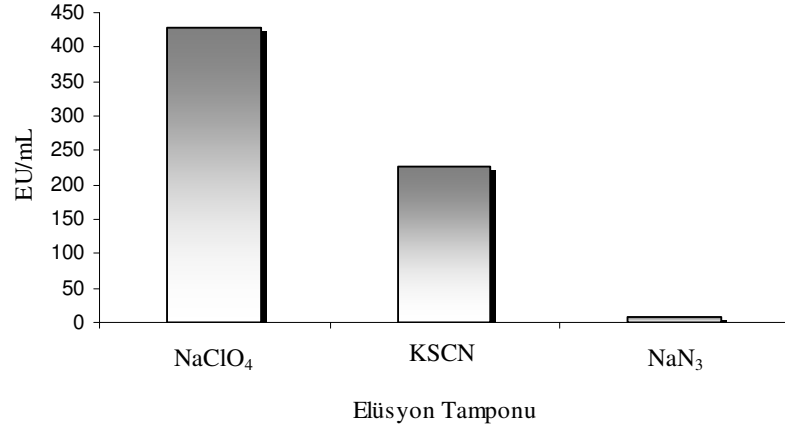
Şekil 3.2 Farklı pH değerlerinde kolona tutunan, Sığır karbonik anhidraz enzimi (BCA) için, toplam CO₂-hidrataz aktivite değerleri. Kolon 18 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.



Şekil 3.3 Farklı sıcaklık değerlerinde kolona tutunan, Sığır karbonik anhidraz enzimi için, toplam CO₂-hidrataz aktivite değerleri. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.



Şekil 3.4 Farklı iyonik şiddet değerlerinde kolona tutunan, Sığır karbonik anhidraz enzimi (BCA) için, toplam CO₂-hidrataz aktivite değerleri. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.



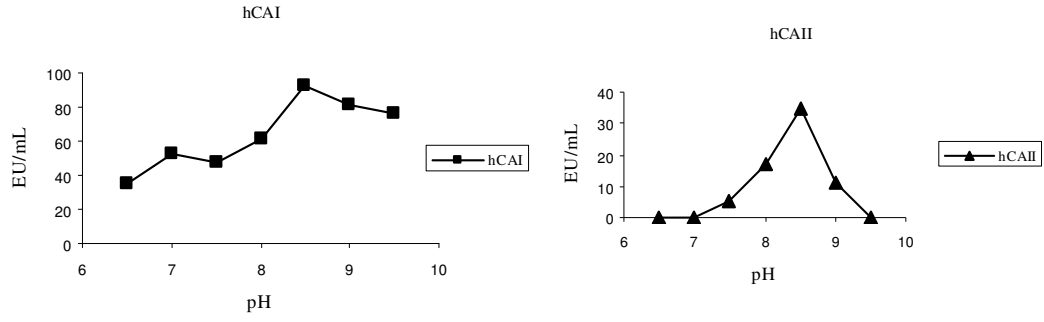
Şekil 3.5 Farklı elüsyon tamponlarıyla kolona tutunan, Sığır karbonik anhidraz enzimi (BCA) için, toplam CO₂-hidrataz aktivite değerleri. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.

3.2.2 İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimi (hCA-I ve hCA-II)

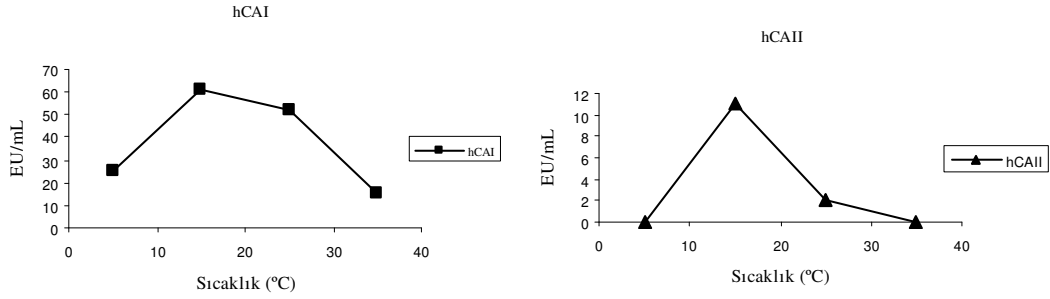
Hazırlanan afinite kolonu ile, insan eritrosit karbonik anhidraz (hCA-I ve hCA-II) izoenzimlerinin ayrılması deneylerinde, kolon şartları stabilize edilerek sadece her bir izoenzimin afinite kolonundan elüsyonu için, farklı pH değerleri (6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5); farklı sıcaklık (5, 15, 25, 35°C); farklı iyonik şiddet (0.15, 0.3, 0.45, 0.6) ve de farklı elüsyon tamponları, ile saflaştırma gerçekleştirildi.

- (A) : 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH=6.3 ve 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, pH=6.3
- (B) : 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH=6.3 hCA-I ve 50mM Na₂HPO₄ / 0,2 M KSCN, pH=6.3
- (C) : 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄, pH=7.0 ve 0.1 M NaCH₃COO/ 0.5 M NaClO₄, pH=5.6
- (D) : 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄, pH=7.0 ve 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, pH=6.3
- (E) : 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄, pH=7.0 ve 50mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN, pH=6.3
- (F) : 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH=6.3 hCA-I ve 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄, pH=5.6

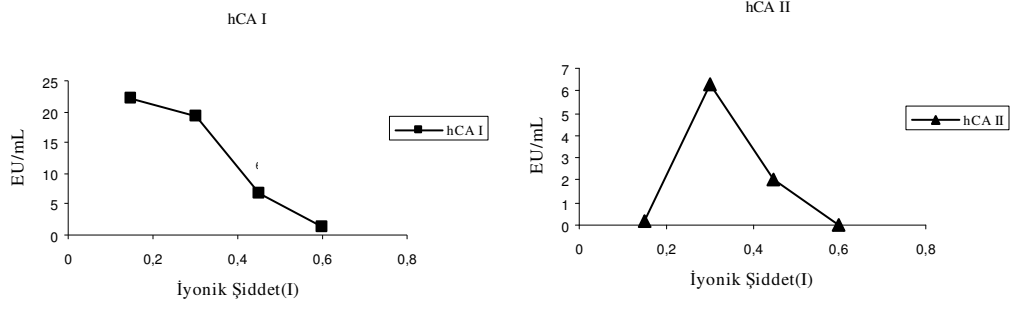
Tüm denemelerde her bir kolon fraksiyonu için, 280 nm dalga boyunda protein absorbans ve CO₂-hidrataz aktivite tayini yapıldı[77,92]. Elde edilen sonuçlar, grafiğe aktarılarak optimum şartlar belirlendi (Şekil 3.6, 3.7, 3.8, 3.9).



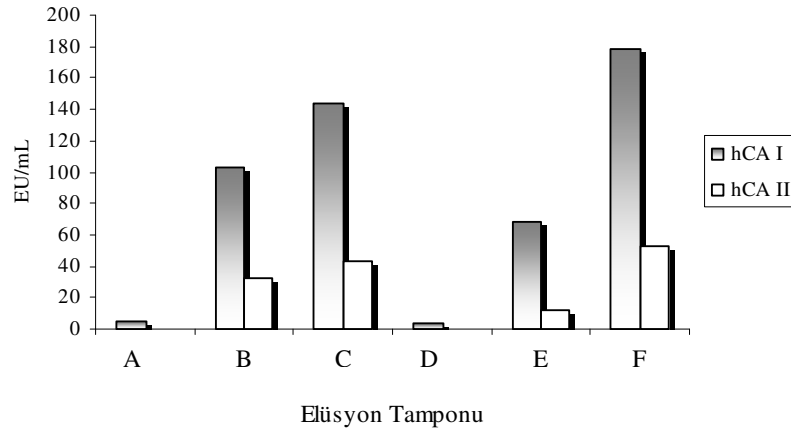
Şekil 3.6 Farklı pH değerlerinde kolona tutunan, İnsan karbonik anhidraz izoenzim-leri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO₂-hidrataz aktivite değerleri. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.



Şekil 3.7 Farklı sıcaklık değerlerinde kolona tutunan, İnsan karbonik anhidraz İzo-enzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO₂-hidrataz aktivite değerleri. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.



Şekil 3.8 Farklı iyonik şiddet değerlerinde kolona tutunan, İnsan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO₂-hidratase aktivite değerleri. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm., elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.



Şekil 3.9 Farklı elüsyon tamponlarıyla kolona tutunan, İnsan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO₂-hidratase aktivite değerleri. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm., elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.

3.3 BCA, hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Farklı Elüsyon Tamponları ile Afinite Kolonundan Saflaştırılması

3.3.1 BCA İzoenziminin Afinite Kolonundan Elüsyonu

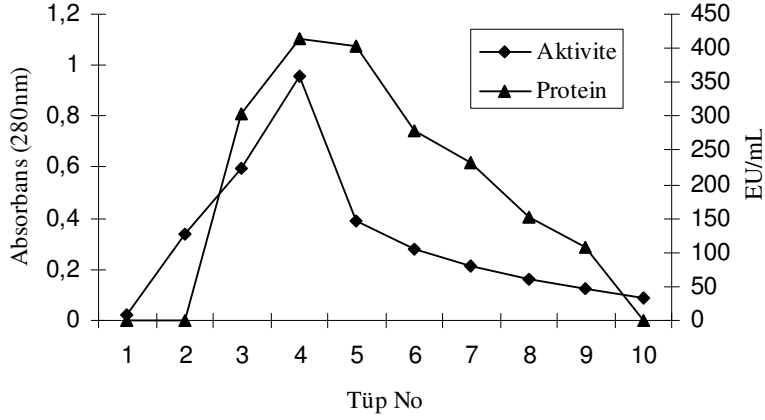
Sığır karbonik anhidraz izoenziminin afinite kolonundan elüsyonu için NaCH₃COO / NaClO₄, Na₂HPO₄ / KSCN ve NaN₃ / Tris-SO₄ gibi üç değişik elüsyon tamponu kullanıldı ve her bir denemenin sonuçları grafiğe aktararak, ayrı ayrı saflaştırma tabloları oluşturulmuştur (Şekil 3.10-3.12). Alınan verilere göre, sırasıyla her bir denemedeki kolon verimi ve saflaştırma dereceleri %21.07; 181, % 10.6; 78.7, % 0.37; 49.2 olarak tespit edilmiştir. Ve en güçlü saflaştırmanın, NaCH₃COO / NaClO₄ elüsyon çözeltisiyle olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.10).

Afinite kolonundan en güçlü şekilde saflaştırılan BCA izoenziminin saflığının kontrolü SDS-PAGE elektroforezi ile yapılmıştır[97].

3.3.1.1 NaCH₃COO / NaClO₄ Çözelti Çifti ile Elüsyon

Sığır eritrosit karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için hemolizat kolona direkt tatbik edildi. Jelin kolona paketlenmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işlemlerinden sonra 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH = 5.6) tamponu ile enzim kolondan elüe edildi. Elüatlar 2 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, her tüpteki numune için enzim aktivitesi ve 280 nm dalga boyunda kalitatif protein tayini yapıldı [77,92]. Sonuçlar, grafik halinde verildi (Şekil 3.10).

Absorpsiyon gösteren fraksiyonlar ve hemolizat için, CO₂-hidrataz aktivitesi ile enzim aktivitesi ve Bradford yöntemi ile de, protein tayini yapıldı[77,93]. Hemolizat için protein miktarı, 977 mg / mL ve CO₂-hidrataz aktivitesi 1015 U / mL olarak belirlendi. Buna göre, hemolizat ve kolondan alınan saf enzim için bir saflaştırma tablosu oluşturuldu. (Çizelge 3.1)



Şekil 3.10 BCA enziminin 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH = 5.6) tamponu ile afinite kolonundan elüsyonu. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.

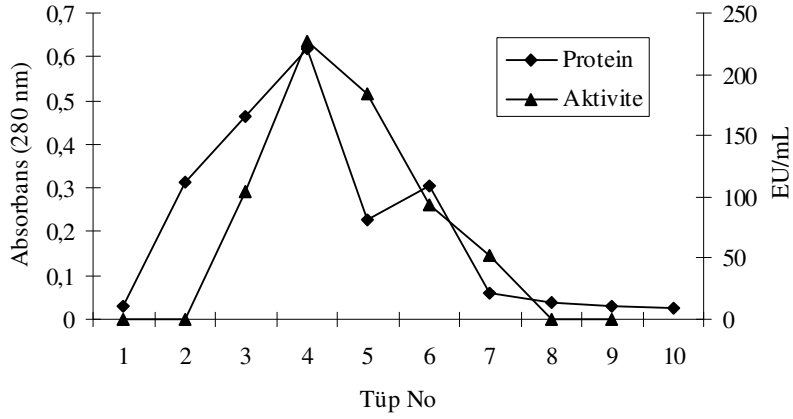
Çizelge 3.1 NaCH₃COO / NaClO₄ çözelti çifti ile kolondan alınan BCA İzoenziminin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
BCA	Hemolizat (20 mL)	20312	1015,6	977	1.039	100	-----
	Enzim (10 mL)	4280	428	2,27	188,5	21.07	181

3.3.1.2 Na₂HPO₄ / KSCN Çözelti Çifti ile Elüsyon

Kolon şartları stabilize edilerek, jelin kolona paketlenmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işlemlerinden sonra, sıgır eritrosit karbonik anhidraz BCA, diğer denemeden farklı olarak, 50mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN, pH=6.3 elüsyon tamponu ile kolondan elüe edildi. Bu deneme sonuçları, 2 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanan her tüpteki numunedeki 280 nm dalga boyunda kalitatif protein tayini

ve CO₂-hidrataz enzim aktivitesi tayin sonuçları şeklinde, grafiğe geçirildi (Şekil 3.11). Bu sonuçlara göre, bir saflaştırma tablosu oluşturuldu (Çizelge 3.2).



Şekil 3.11 Afinitye kolonundan BCA enziminin 50mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN, pH=6.3 tamponu ile elüsyonu. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.

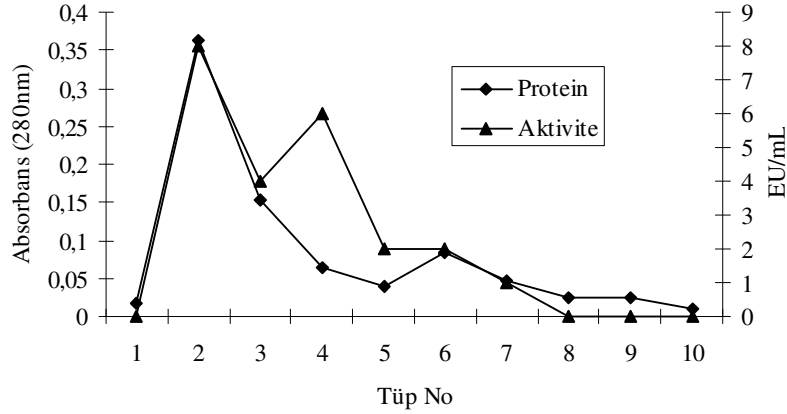
Çizelge 3.2 Na₂HPO₄ / KSCN çözelti çifti ile kolondan alınan BCA izoenziminin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
BCA	Hemolizat (20 mL)	21240	1062	1147	0,93	100	-----
	Enzim (10 mL)	2270	227	3,1	73,22	10.6	78,7

3.3.1.3 NaN₃ / Tris-SO₄ Çözelti Çifti ile Elüsyon

Afinitye kolon şartları tekrar sabit tutularak, sadece BCA enziminin kolondan elüe edilmesi için, elüsyon tamponu 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, pH=6.3 olarak değiştirildi. Diğer iki denemede olduğu gibi, her bir kolon fraksiyonunda, 280 nm dalga boyunda protein tayini ve CO₂-hidrataz enzim aktivitesi tayini yapıldı[77,92].

Sonuçlar grafiğe aktarıldı (Şekil 3.12). Elde edilen sonuçlara göre, hemolizat ve kolondan alınan saf enzim için yeni bir saflaştırma tablosu oluşturuldu (Çizelge 3.3).



Şekil 3.12 Afinite kolonundan BCA enziminin 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, pH=6.3 tamponu ile elüsyonu. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 5 mL.

Çizelge 3.3 NaN₃ / Tris-SO₄ çözelti çifti ile kolondan alınan BCA izoenziminin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
BCA	Hemolizat (20 mL)	21780	1089	1338,8	0,813	100	-----
	Enzim (10 mL)	80	8	0.2	40	0,37	49,2

3.3.2 hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Afinite Kolonundan Elüsyonu

Kolona adsorbe olmuş insan eritrosit karbonik anhidraz (hCA-I ve hCA-II) izoenzimlerini ayırmak için, optimum şartların belirlenmesinde, BCA enziminin elüsyonu için kullanılan kolon şartları stabilize edilerek, Cl⁻ / N₃⁻; Cl⁻ / SCN⁻; I⁻ ve

CH₃COO⁻ / ClO₄⁻; I⁻ / N₃⁻ , I⁻ / SCN⁻; Cl⁻ ve CH₃COO⁻ / ClO₄⁻ değişik elüsyon çözelti çiftleri ile, 6 farklı deneme yapılmıştır.

İzoenzim karışımları ise, kolona doğrudan doğruya hemolizattan bağlanmıştır. Her bir denemedeki kolon elüatları için, 280 nm dalga boyunda protein absorbans ve CO₂-hidrataz enzim aktivitesi tayini yapılarak elde edilen sonuçlar grafiğe aktarılarak, bu sonuçlar için ayrı ayrı saflaştırma tabloları oluşturulmuştur[77,92]. Saflaştırma tablo verilerine göre, kolon verimi ve saflaştırma dereceleri tespit edilmiştir. Buna göre, afinite kolonundan saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için yapılan denemelerde, en iyi saflaştırmanın gerçekleştirildiği elüsyon çiftleri gözlenmiştir. Bu elüsyon çiftleri ile afinite kolonundan elüe edilen hCA (I+II) izoenzimlerinin oluşturulan saflaştırma tablolarında, her bir denemedeki kolon verimi ve saflaştırma dereceleri sırasıyla,

(A) elüsyonu: % 0.27, 1.206

(B) elüsyonu: % 24.3, 5.76

(C) elüsyonu: % 7.52, 71.27

(D) elüsyonu: % 0.17, 28.07

(E) elüsyonu: % 3.93, 31.12

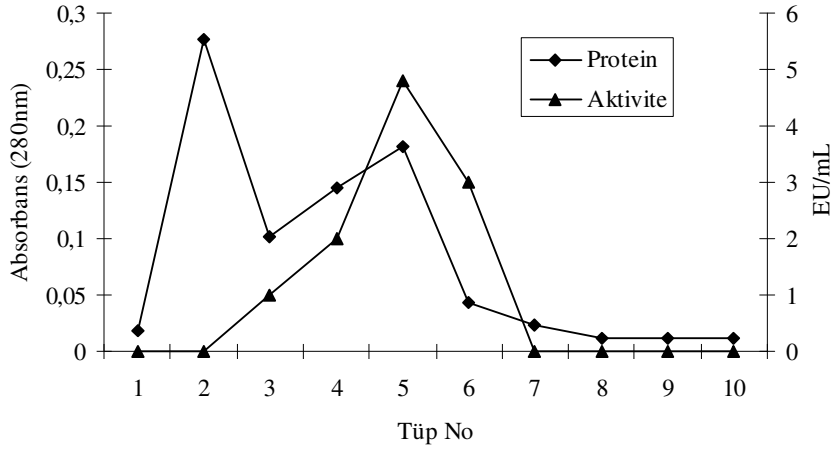
(F) elüsyonu: % 9.49, 184

kat olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.14-3.19, Çizelge 3.4-3.9). Bu değerlere göre en iyi ayırımın, (F) elüsyonu ile olduğu görülmektedir. Afinite kolonundan en güçlü şekilde saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin saflığının kontrolü, SDS-PAGE elektroforezi ile yapılmıştır[108]. Elde edilen bantların fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 3.19).

3.3.2.1 İzoenzimlerin Cl⁻ ve N₃⁻ İyonları ile Elüsyonu (A)

Bu denemede, hCA-I ve hCA-II izoenzimlerini afinite kolonundan elue etmek için sırasıyla, 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH=6.3 ve 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, pH=6.3 elüsyon tamponları kullanılmıştır. Afinite kolonundan alınan her bir

fraksiyon için 280 nm dalga boyunda protein absorbans ve her bir fraksiyonda enzim aktivite tayini yapılarak sonuçlar, Şekil 3.13’de grafik halinde verilmiştir. Ve elde edilen sonuçlara göre, bir saflaştırma tablosu oluşturulmuştur (Çizelge 3.4).



Şekil 3.13 hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla, Cl⁻ ve N₃⁻ anyonlarıyla afinite kolonundan elüsyonu. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.

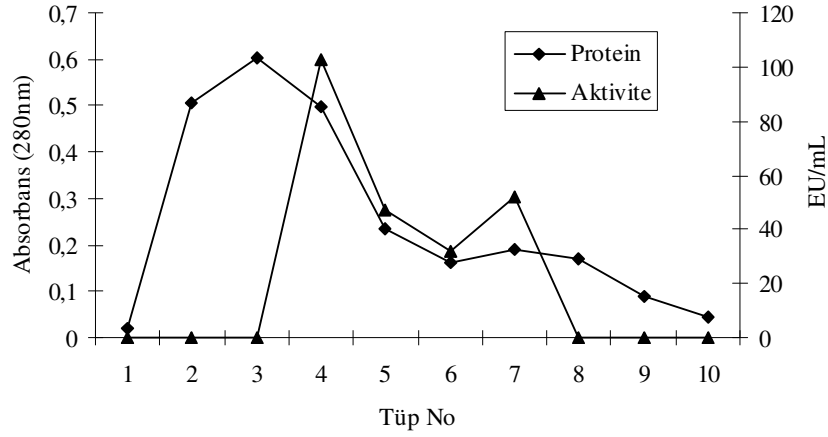
Çizelge 3.4 Cl⁻ ve N₃⁻ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) izoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
hCA	Hemolizat (20 mL)	18063	903	862,4	1,047	100	-----
	Enzim (10 mL)	48	4,8	3,8	1,26	0,27	1,206

3.3.2.2 İzoenzimlerin Cl⁻ ve SCN⁻ İyonları ile Elüsyonu (B)

Bu denemede de, hCA-I ve hCA-II izoenzimlerini afinite kolonundan elue etmek için sırasıyla, 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH=6.3 hCA-I ve 50mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN, pH=6.3 elüsyon tamponları kullanılmıştır. Kolon elüatların her birinde 280 nm dalga boyunda absorbans ve CO₂-hidrataz

aktivitelerine bakılmıştır. Bu değerler, tüp sırasına göre Şekil 3.14’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bir saflaştırma tablosu oluşturulmuştur (Çizelge 3.5).



Şekil 3.14 hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla, Cl⁻ ve SCN⁻ tamponlarıyla afinite kolonundan elüsyonu. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.

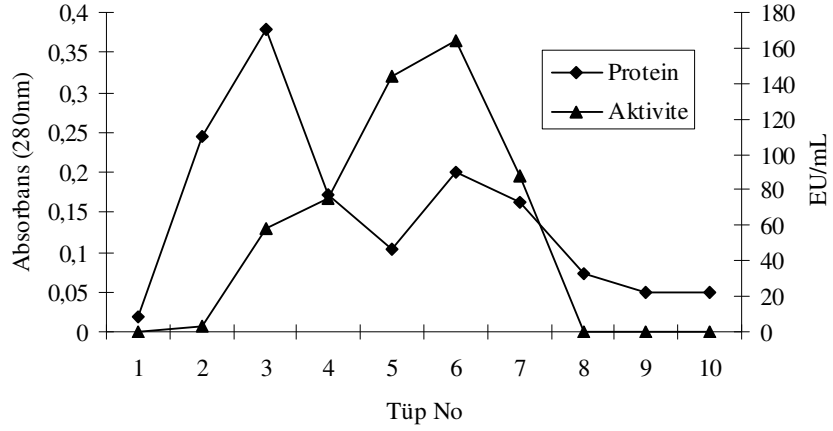
Çizelge 3.5 Cl⁻ ve SCN⁻ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) izoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
hCA	Hemolizat (20 mL)	17880	894	793	1,13	100	-----
	Enzim (10 mL)	1030	103	3,75	27,4	24,3	5,76

3.3.2.3 İzoenzimlerin I⁻ ve CH₃COO⁻ / ClO₄⁻ İyonları ile Elüsyonu (C)

Bu denemede ise, hCA-I 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄ pH=7.0, hCA-II ise 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄, pH=5.6 çözeltileri ile, elüe edilmeye çalışılmıştır.

Diğer denemelerdeki gibi eluatların aktivite ve protein değerleri, Şekil 3.15’da grafik halinde verilerek, bu sonuçlara göre bir de saflaştırma tablosu oluşturulmuştur (Çizelge 3.6).



Şekil 3.15 hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla, I⁻ ve ClO₄⁻ anyonlarıyla afinite kolonundan elüsyonu. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.

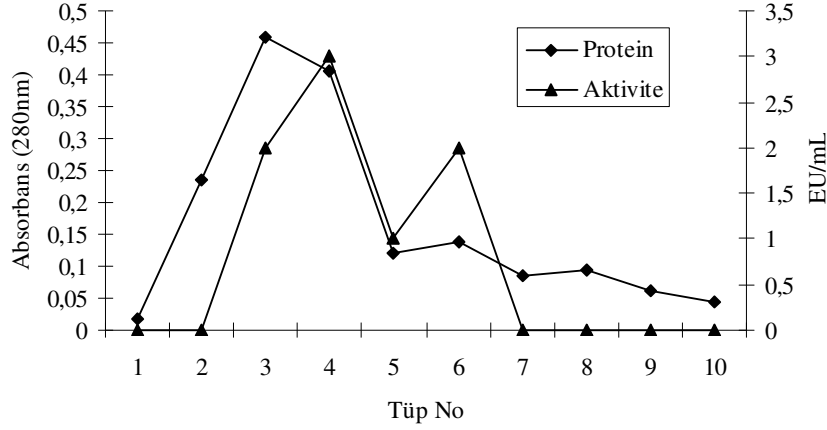
Çizelge 3.6 I⁻ ve CH₃COO⁻ / ClO₄⁻ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) izoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	%Verim	Saflaştırma Derecesi
hCA	Hemolizat (20 mL)	19160	958	857	1,11	100	-----
	Enzim (10 mL)	1440	144	1,82	79,12	7,52	71,27

3.3.2.4 İzoenzimlerin I⁻ ve N₃⁻ İyonları İle Elüsyonu (D)

Bu denemede, hCA-I ve hCA-II izoenzimleri sırasıyla, 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄, pH=7.0 ve 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, pH=6.3 tamponlarıyla afinite kolonundan elüe edilmeye çalışılmıştır. Kolon elüatların 280 nm dalga boyundaki

protein absorbans ve her bir fraksiyona uygulanan enzim aktivite ölçüm değerleri, Şekil 3.16'de grafik olarak verilmiştir. Ve elde edilen sonuçlara göre, bir saflaştırma tablosu oluşturularak, bu denemenin çok az bir kolon verimine sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.7).



Şekil 3.16 hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla, I⁻ ve N₃⁻ anyonlarıyla afinite kolonundan elüsyonu. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.

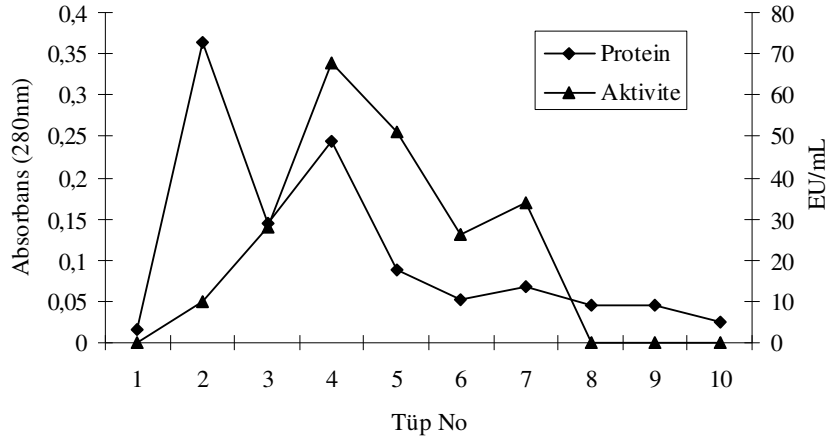
Çizelge 3.7 I⁻ ve N₃⁻ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) izoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	%Verim	Saflaştırma Derecesi
hCA	Hemolizat (20 mL)	18740	937	821	1.14	100	-----
	Enzim (10 mL)	32	3.2	0.1	32	0.17	28,07

3.3.2.5 İzoenzimlerin I⁻ ve SCN⁻ İyonları ile Elüsyonu (E)

Bu denemede de, hCA-I ve hCA-II izoenzimleri sırasıyla, 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄, pH=7.0 ve 50mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN, pH=6.3 elüsyon tamponlarıyla ayrılmaya çalışılmıştır. Afinite kolonundan alınan her bir fraksiyonda

diğer denemelerde olduğu gibi, 280 nm dalga boyunda protein absorbans ve spesifik aktivite tayinleri yapılarak bu değerler grafiğe geçirilmiştir (şekil 3.17). Bu denemedeki kolon verimi ve saflaştırma derecesini kontrol için, bir saflaştırma tablosu oluşturulmuştur (Çizelge 3.8).



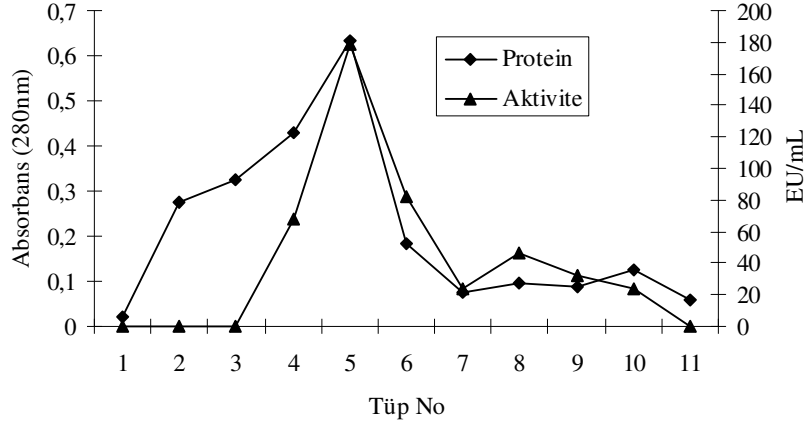
şekil 3.17 hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla I⁻ ve SCN⁻ anyonlarıyla afinite kolonundan elüsyonu. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.

Çizelge 3.8 I⁻ ve SCN⁻ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) izoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	%Verim	Saflaştırma Derecesi
hCA	Hemolizat (20 mL)	17280	864	804	1,07	100	-----
	Enzim (10 mL)	680	68.1	2.04	33.3	3.93	31.12

3.3.2.6 İzoenzimlerin Cl^- ve $\text{CH}_3\text{COO}^- / \text{ClO}_4^-$ İyonları ile Elüsyonu (F)

Bu denemede, hCA-I ve hCA-II izoenzimleri sırasıyla, 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / 1 \text{ M NaCl}$, pH=6.3 hCA-I ve 0.1 M $\text{NaCH}_3\text{COO} / 0.5 \text{ M NaClO}_4$ pH=5.6 elüsyon tamponlarıyla afinite kolonundan elüe edilmeye çalışılmıştır. Elüatların 280 nm dalga boyundaki protein absorbans ve enzim aktiviteleri, Şekil 3.18’da grafik halinde verilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi, hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için, en iyi ayırma işleminin bu elüsyon çiftleri ile gerçekleştirildiği tespit edilmiştir, bu sonuçlar için bir saflaştırma tablosu oluşturulmuştur (Çizelge 3.9)



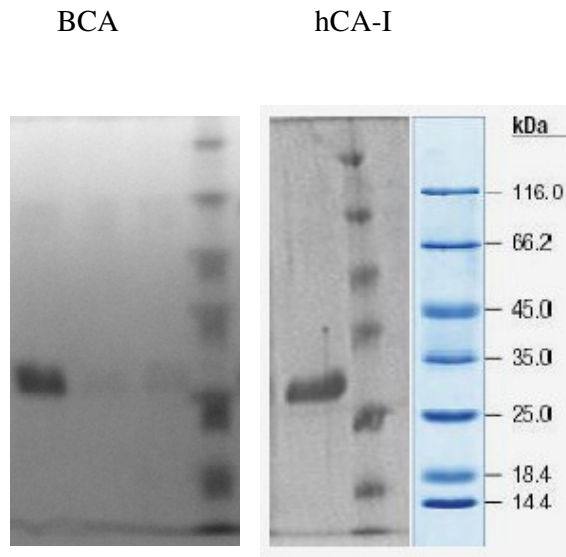
Şekil 3.18 hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Cl^- ve ClO_4^- anyonlarıyla afinite kolonundan elüsyonu. Kolon 1.8 cm x 12 cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20 mL / saat ve fraksiyon hacmi 2 mL.

Çizelge 3.9 Cl^- ve $\text{CH}_3\text{COO}^- / \text{ClO}_4^-$ İyon çifti ile kolondan alınan hCA (I+II) izoenzimlerinin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
hCA	Hemolizat (20 mL)	18740	937	1355	0,69	100	-----
	Enzim (10 mL)	1780	178	1,4	127	9,49	184

3.4 Sığır ve İnsan Eritrosit Karbonik anhidraz Enzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

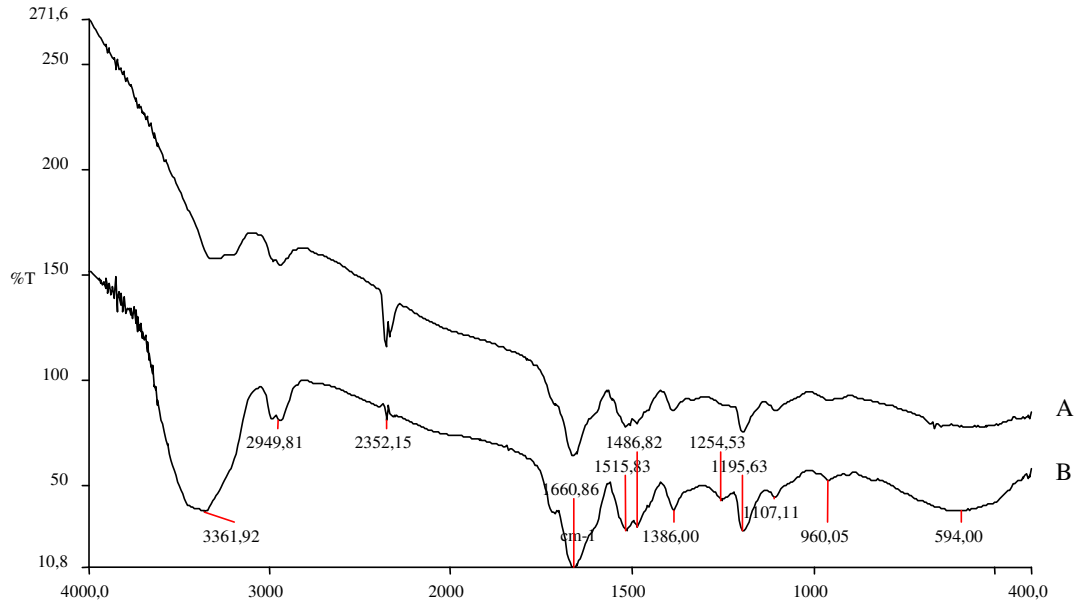
Afinite kolonundan en iyi elüsyon tamponları ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin (BCA, hCA-I) saflığını kontrol etmek için, bölüm 2.6.5’de anlatıldığı gibi hazırlanan slab jel SDS-PAGE elektroforezi ile, sığır ve insan eritrositlerinden saflaştırılan enzim numunelerinin protein bantları elde edildi. Elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 Afinite kolonundan saflaştırılan hCA-I ve BCA izoenzimlerinin SDS-PAGE elektroforezi

3.5 Tarafımızdan Sentezlenen Afinite Jelinin (Eupergit C-250 L – Etilendiamin -4-izosiyonatbensülfonamid) FT-IR Spektrumu

Eupergit C-250 L-sülfonamid yapısına sahip afinite jeli ve matrisi olarak kullanılan Eupergit C-250 L polimer bileşiminin FT-IR spektrumları alınarak, jel üzerinde yapılan modifikasyon gözlenmiştir (Şekil 3.20).



Şekil 3.20 (A) Eupergit C-250 L, (B) Eupergit C-250 L-sülfonamid afinite jelinin IR Spektrumu

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Protein saflaştırma teknikleri içerisinde tek basamakta yüzlerce kat saflaştırmayı mümkün kılan afinite kromatografi tekniği, biyoteknoloji, biyokimya ve tıp alanında saf enzim elde etmede tercih edilen önemli bir uygulama alanı oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, karbonik anhidraz izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması için, orijinal bir afinite jeli hazırlanmıştır. Araştırmamızda, daha önceden orijinal olarak sentezlenmiş bir CA inhibitörü 4-izosiyonatbenzen-sülfonamit, matriks olarak kullandığımız Eupergit C-250 L polimer materyalinin aktif oksiran gruplarına, etilendiamin uzantı koluyla bağlanmıştır. Çalışmamızdaki en önemli noktalardan biri, yeni bir afinite jeli sentezi ile insan eritrosit I ve II izoenzimleri ve sığır eritrosit enzimini saflaştırmaktır.

Araştırmamız boyunca, orijinal afinite jeli için denenen tüm koşulların kolon elüatları eşit hacimde alınıp bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metot, proteinlerin ihtiva ettikleri tirozin ile triptofan moleküllerinin 280 nm dalga boyundaki spesifik bir absorpsiyon göstermeleri prensibine dayanmaktadır[92]. Dolayısıyla her bir proteinin, tirozin ve triptofan içeriklerinin farklı olması, onların spesifik bir absorpsiyon katsayısına sahip olmalarını gerekli kılar, dolayısıyla bir protein zincirindeki tirozin ve triptofan amino asitlerinin sayısı biliniyorsa, o proteinin 280 nm dalga boyundaki absorpsiyonundan, protein miktarı da bulunabilir. Fakat, bu protein çözeltide saf halde olmalıdır. Amino asit oranları, bilinen proteinlerin, bu dalga boyunda ve 1 cm ışık yolunda yaptıkları absorpsiyon, ekstraksiyon katsayıları halinde verilir. Bu ya molar ekstraksiyon katsayısı (ϵ_{280} nm), ya da $A_{1cm}^{1\%}$ olarak belirtilir. $A_{1cm}^{1\%}$, 1 g proteinin 100 mL çözeltisindeki 1 cm ışık yolunda absorpsiyonudur.

Çalışmamızdaki insan karbonik anhidraz hCAI, hCA-II ve sığır enzimi için; $A_{1cm}^{%1}$ sırasıyla, 16.3, 18,7 ve 19.0 olduğundan, saf enzim çözeltilerinde bu ekstinksiyon katsayıları kullanılarak enzim miktarları tayin edildi[13]. Ancak, 280 nm dalga boyunda absorbans gösteren diğer moleküllerin varlığı da göz önünde bulundurulduğunda, UV-Absorpsiyonu metodunun, bir dezavantajı ortaya çıkmaktadır. Buna karşılık, metodun oldukça pratik oluşu ve numunenin tekrar geri kazanımına olanak sağlaması dolayısıyla kolon elüatlarının protein tayini için denemelerimizde bu metot kullanılmıştır.

Kantitatif olarak, protein miktarlarının belirlenmesi için, Folin-Lowry, Biüret, BCA, Bradford ve Kjeldalh gibi yöntemler kullanılmaktadır[98].

Bu yöntemler arasında Kjeldalh yöntemi fazla miktarda numune kullanımı gerektirdiği için araştırmacılar tarafından çok fazla tercih edilmesede protein içeriğinde azot miktarını belirleme esasına dayanır.

Kalitatif protein tayini için kullanılan diğer bir yöntem Biüret yöntemidir. Bu yöntemde proteinlerin bazik ortamda Cu^{+2} iyonu ile mor-mavi kompleks oluşturmaları prensibine dayanmaktadır. Oluşan kompleks reaksiyonu, iki peptid zincirindeki dört azot atomunun ortaklaşmamış elektronları ile Cu^{+2} iyonu arasında gerçekleşmektedir. Reaksiyon esnasında oluşan renk şiddetinden, protein miktarı belirlenebilir. Ayrıca nükleik asitlerin varlığı da bu ölçümü etkilemez. Ancak bu metot sonucunda, protein başka bir moleküle dönüşmemektedir, dolayısıyla protein molekülünün yeniden kazanmanın mümkün olmayışı metodun bir dezavantajıdır.

Söz konusu çalışmamızda, kantitatif protein tayini için, Bradford yöntemi kullanılmıştır. Protein miktarının belirlenmesinde bu yöntemin seçilmesinin sebebi, çalışma grubumuzda rutin olarak yapılan ve uygulanabilirliğinin daha kolay oluşundan kaynaklanmaktadır. Bu metodun esası, proteinlerin fosforik asitli ortamda, Coomassiebrilliant blue G-25 boyası ile kompleks yapma prensibine dayanmaktadır. Kullanılan boya, negatif yüklüdür ve pozitif yüklü proteinleri bağlayarak boya kırmızı renkli formdan ($A_{max}= 465$ nm), mavi renkli forma ($A_{max}=595$ nm) dönüşür. Çözelti içerisindeki boya, daha çok kırmızı renge hakimdir

fakat boyanın negatif uçları proteinin pozitif gruplarına bağlandıkça bu renk maviye döner ve reaksiyon hızlı bir şekilde gerçekleşir. Reaksiyon boyunca, söz konusu olan renk 1 saat kadar kararlı haldedir ve oluşan renk şiddeti ise pH'ya bağlı olarak değişmektedir.

Kullanılan bu metodun diğer metotlara üstün tarafı ise, az reaktif gerektirmesi ve her çalışmada ayrı bir standart hazırlamaya ihtiyaç duyulmamasıdır. Ancak bu yöntemde, standart eğriyi elde etmek biraz zordur, bunun da sebebi geniş bir konsantrasyon aralığında lineer olmasından kaynaklanmaktadır[93]. Ancak Folin Lowry metodu da literatürde araştırmacılar tarafından UV ve Biüret metodlarına göre daha hassas olması ve deterjanlardan etkilenmemesi açısından tercih edilmektedir. Ancak triptofan, tirozin, sistein, hidrojen peroksit gibi bir çok bileşik için problem teşkil etmektedir.

Çalışmamızda, matriks olarak Eupergit C-250 L tercih edilmiştir. Literatürde bu ticari matriks, geniş bir kullanım alanına sahiptir[102,103]. Eupergit C-250 L polimerinin matriks olarak seçilmesinin başlıca nedenleri;

- Yapısının yüksek bir kimyasal kararlılık göstermesi,
- Polar organik çözücülerin denatürasyonuna karşı gelişmiş bir kararlılık göstermesi,
- Isı artışına karşı gösterdiği termostabilitenin yüksek olması,
- Mekaniksel kararlılığı ile karıştırma ve filtrasyon işlemlerinde fiziksel özelliklerini koruması,
- Reaktif oksiran gruplarının yüksek yoğunluğu ile reaksiyonun ılıman koşullarda gerçekleşmesi,
- Aktif oksiran gruplarının yüksek yoğunluğu birçok noktadan bağlanmalara yol açtığı için reaksiyon kapasitesini yüksek oranda arttırması

gibi özelliklere sahip olmasıyla ifade edilebilir[35,36].

Eupergit C-250 L, içerdığı aktif oksiran gruplarından dolayı herhangi bir aktifleştirmeye gerek duyulmadan etilendiamin aracılığıyla liganda bağlanmıştır. Eupergit C-250L ticari matriksi reaktif oksiran gruplarının yüksek yoğunluğu sayesinde literatürde birçok amaçla kullanılmaktadır.

Afinite kromatografisi çalışmalarında literatürde değişik uzantı kolları farklı reaksiyonlarla matrikse bağlanmıştır[13,14,34-40]. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu etilendiamin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da sülfonilamid oluşturur. Sülfonilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır.

Özensoy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Eupergit C-250 L polimer materyalinin aktif oksiran gruplarına karbonik anhidrazın güçlü inhibitörü olan p-aminobenzensülfonamid bağlanarak yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir. Yapılan çalışmada bir uzantı koluna ihtiyaç duyulmamıştır. Çünkü, matriksin içerdığı oksiran gruplarının bir uzantı kolu görevi üstleneceği düşünülmüştür[28]. Özensoy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi araştırmamızda da matriksteki aktif oksiran gruplarının varlığı ile herhangi bir uzantı kolu kullanımına gerek duyulmamıştır. Ancak bizim çalışmamızda sentez reaksiyon mekanizması için gerekli olan etilendiamin' in kullanılması dört atomluk oldukça uygun bir mesafeyi sağlanmasının büyük bir avantaj olduğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda kullandığımız ligand; 4-izosiyanatbenzensülfonamid, Supuran ve grubu tarafından sentezlenen etkili bir CA inhibitörüdür. 2000 yılında glokom ve göz hipertansiyonu tedavisinde bir ajan olarak kullanılabilecek suda çözünür, güçlü CA inhibitörleri elde etmek için çalışmalar yapmışlardır[100]. Ligand sentezinde çıkış maddesi sülfonilamiddir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda CAI, CAII ve CAIV izoenzimlerine karşı çok yüksek CA inhibisyon özellikleri gösteren bileşikler sentezlemişlerdir. Sentezlenen bu bileşiğin saflaştırmayı düşündüğümüz izoenzimlere karşı gösterdiği inhibisyon özellikleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1 4-izosiyanatbenzensülfonamit'in inhibisyon verileri[100]

	K _i (nM)		
	hCA-I	hCA-II	bCA IV
4-izosiyanatbenzensülfonamit	5000	185	300

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi söz konusu ligandın hCAII' ye karşı ilgisi son derece düşüktür. Bu durum kolondan hCAI' in saflaştırılması için uygun olacağı düşünülmüştür. Literatürde bu amaçla en çok kullanılan ligand p-aminobenzen-sülfonamit' tir. Bu bileşiğin hCAI ve hCAII' ye karşı belirli ölçüde ilgisinin olması ve reaksiyon kabiliyetinin düşük olması büyük bir dezavantajdır. Çünkü sülfonamidi aktifleştirmek için genel olarak diazolama işlemi yapılmaktadır[63]. Bu işlem matriksi olumsuz yönde etkileyeceği gibi ligandın kendi arasında dimerleşmesinde neden olmaktadır.

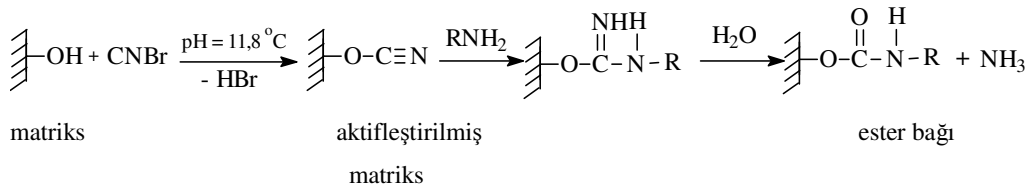
Deneylerimiz esnasında elde edilen enzim elüatlarındaki CO₂ hidrataz aktivite metodu için Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson metodu kullanılmıştır[77]. Bu metot da, CO₂'nin H₂O ile reaksiyonu sonucu oluşan H₂CO₃ molekülünün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak, ortamın pH'sını değiştirme süresi ölçülmektedir. Bu yöntem "Giriş" bölümünde de belirtildiği gibi, enzimin CO₂-hidrataz aktivitesi sabitlerinin tayininde yararlı olamamaktadır. Çünkü, reaksiyon süresince pH değişmekte ve aynı enzim tarafından dehidratasyonu katalize edilen HCO₃⁻ iyonu oluşmaktadır. Fakat çalışmamız esnasında, enzimin kinetik özellikleriyle ilgili deneyler yapılmadığı ve yalnız eluatlardaki bağıl aktivite artış ve azalışları belirlendiği için, Wilbur-Anderson metodu uygulanmıştır. Literatürde geçen bu tip çalışmalarda da, genellikle bu yöntemin kullanılmış olması , seçiminizi doğrulamaktadır [13,14,34,37-40].

Eupergit C-250 L – etilendiamin - 4-izosiyanatbenzen-sülfonamit yapısına sahip afinite jeli ile izole edilen enzimlerin saflık kontrolü, slab jel elektroforezi ile gerçekleştirildi[97]. Buna göre, kolonda az tutunan hCA-II izoenziminin protein bandı, elektroforez fotoğrafında net gözlenemedi (Şekil 3.19). hCA-I izoenzimi için

tek bant elde edilmiştir. Yaklaşık molekül ağırlıkları 30 kDa ağırlığında bulunmuştur. Bu değerlerin literatürle uyum halinde olduğu tespit edilmiştir[99].

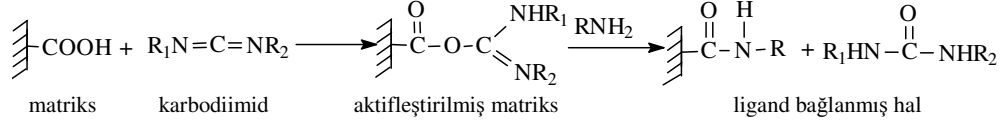
Yeni bir afinite jeli sentezini planlarken öncelikle aklımıza gelen herhangi bir aktivasyon metoduna gerek duyulmadan ligandı matrikse bağlama yöntemini kullanmaktı. Eupergit C-250 L, içerdiği aktif oksiran gruplarından dolayı, herhangi bir aktivasyon reaksiyonuna gerek duymadan ılıman koşullarda ligandı matrikse uzantı kolu aracılığıyla bağlama imkanı sağlamaktadır. Literatürde, iyi akış özelliğinden dolayı bu amaçla Sepharose-4B, matriks olarak çok fazla tercih edilmektedir [34,37,38,63]. Ancak bu amaçla, değişik aktivasyon metodları kullanılmaktadır. Bunlara göre, afinite jelinin sentezlenmesinde dekstran ve agaroz yapısında bulunan, Sephadex, Sepharose veya Biogel gibi matrikslerin aktifleştirilmesi, siyanobromür, karbodiimid ve epoksi bileşikler kullanılarak yapılmıştır. Bu matrikslerin içerdikleri –OH grupları siyanojenbromür (CNBr) ile aktifleştirilmekte ve bunlar primer amino grubuna sahip olan bileşiklerle reaksiyona girerek, sonuçta bir ester bağı oluşturmaktadırlar[13].

Bu bileşiklerle gerçekleştirilen aktifleştirme ve bağlanma reaksiyonları şöyledir:



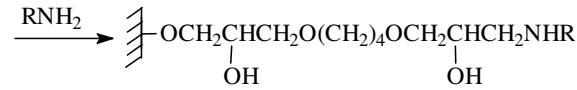
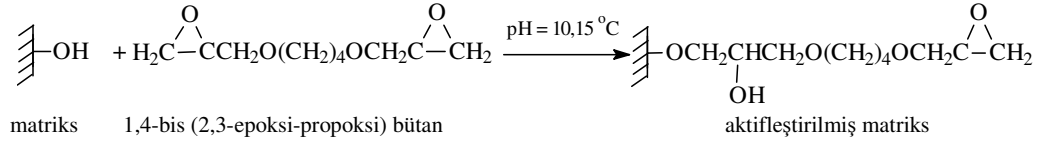
CNBr aktifleştirmesi ile hazırlanan jeller, karbonik anhidraz enziminin afinite kromotografisinde kullanıldığında, zamanla adsorpsiyon özelliklerini kaybetmektedir. Çünkü, karbonik anhidraz enzimi, özellikle pH 8.0'in üzerinde, yüksek esteraz aktivitesine sahiptir. Bundan dolayı kromotografi esnasında, ligandın matrikse bağlı olduğu ester bağı parçalamaktadır.

Karbodiimid bileşikleri, serbest karboksil grubuna sahip olan matrikslerin aktifleştirilmesinde kullanılmaktadır. Aktifleştirme ve primer aminlere bağlanma reaksiyonları şöyledir:



Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanmasıyla, amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ kromatografi işlemlerine dayanıklıdır. Fakat, aktifleştirme esnasında matriks jeli, pH=4.5'ta, 24 saat süreyle karıştırılmaktadır. Bu işlem, jelin kromatografi sırasındaki akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir.

Matriksin epoksi bileşiklerle aktifleştirilmesi (oksiran aktifleştirilmesi) de, Sephadex ve Sepharose yapılarındaki -OH grupları üzerinden olmaktadır. Reaksiyonlar 1,4-bis (2,3-epoksi propoksi) bütan epoksi bileşiği için şöyledir:



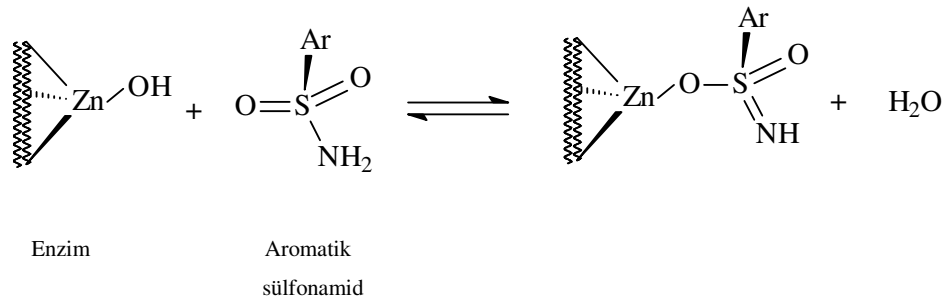
Yukarıdaki reaksiyonlarla, primer amino grubu ihtiva eden ligand, polar yapıda bir uzantı kolonun ardından, matrikse kovalent olarak bağlanmaktadır[13]. Kromatografi işlemlerine gayet dayanıklı olan bu yapı, 16 saat aktifleştirme ve 16 saat'te ligandın bağlanma süresi sonucu oluşmaktadır. pH'nın 10 civarında olması, jelin fiziksel yapısını fazla etkilememesine rağmen, uzun süre (yaklaşık 300 saat) karıştırma işlemleri polisakarit partiküllerin şekil bakımından deformasyonuna

sebeap olabilir. Sonuç olarak hazırlanacak afinite jelinin akış özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir.

Fakat araştırmamızdaki afinite jelinin sentezinde, herhangi bir aktivasyon metodunun kullanılmaması, aktivasyon esnasındaki bu muhtemel olumsuzlukları ortadan kaldırmıştır.

Araştırmamızda, tarafımızdan sentezlenen afinite jeli, Eupergit C-250 L katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Eupergit C-250 L, içerdiği aktif oksiran gruplarından dolayı herhangi bir aktifleştirmeye gerek duyulmadan uzantı kolu aracılığıyla liganda bağlanmıştır. Literatürde bu amaçla, değişik uzantı kolları farklı reaksiyonlarla matrikse bağlanmıştır[13,14,33,34,37-40]. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu Etilen diamin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da sülfonilamid oluşturur. Sülfonilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır[98]. Söz konusu jel kullanılarak hCA-I ve hCA-II izoenzimleri direkt hemolizattan saflaştırılmıştır. Bu amaçla hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 1 M NaCl / 22 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3), hCA-II için ise 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6) elüsyon tamponları kullanılmıştır. Enzimlerin saflığı SDS-PAGE uygulanarak kontrol edilmiştir[99].

Hazırladığımız afinite jeli, karbonik anhidraz enzimini, onun spesifik bir inhibitörü olan sülfonamid aracılığı ile tutmaktadır. Giriş bölümünde de anlatıldığı gibi, aromatik ve heterosiklik sülfonamidler karbonik anhidraz enzimlerinin çok kuvvetli inhibitörleridir. Bu bileşiklerin enzimin aktif bölgesine bağlanma mekanizmaları açıklanmıştır. Bu olay şematik olarak şöyle gösterilebilir:



Yukarıda görüldüğü gibi, sülfonamid (-SO₂NH₂) grubu enzime anyonik bir formda bağlanmaktadır. Burada, Zn⁺² iyonunun dördüncü koordinasyon orbitalini işgal eden OH⁻ iyonu asidik karakterdeki -SO₂NH₂'den bir proton alarak suya dönüşmekte, sülfonamid de -SO₂NH⁻ anyonu haline gelmektedir. Bu durum, yapılan rezonans, Raman ve UV incelemeleriyle de doğrulanmıştır. Fakat, aromatik halkanın bağlanmadaki rolü henüz bilinmemektedir. Yukarıda şematize edilen bağlanmanın, pH'ya son derece bağımlı olduğu açıktır. Çünkü, -SO₂NH₂ bileşiğinin anyona dönüşmesi ve Zn-OH ligand bağının ayrışması pH'dan etkilenen olaylardır[13].

Sülfonamidler enzime yalnız Zn⁺² aracılığı ile bağlanmamaktadırlar. Bunun yanı sıra, enzimin aktif bölgesinin iyonlaşabilir bazı gruplarla da etkileşme söz konusudur. Bunun en önemli delili, sülfonamidlerin Zn⁺² iyonu uzaklaştırılmış apo CA enzimine 10⁻³ M'lık bir afinite ile bağlanmasıdır.

Ayrıca tarafımızdan sentezlenen Eupergit C-250 L- sülfonamid yapısına sahip afinite jelinin FT-IR spektrumları alınmıştır. Şekil 3.20' de görüldüğü üzere, 1360 – 1250 cm⁻¹ C-N (aril) gerilme piki ve 3360 cm⁻¹ yayvan –OH piki olası yapının doğruluğunu kanıtlamaktadır.

Yukarıdaki bilgilerin ışığı altında, hazırlanan afinite jelinin enzimi bağlayabilmesinde, enzim çeşidinin, pH'nın, ortamın iyonik şiddetinin ve sıcaklığın etkili olabileceği görülmektedir. Çalışmamızda, söz konusu 4 faktör değişken olarak alınmıştır ve bunlara bağlı olarak da kapasite tayinleri yapılmıştır.

Hazırlanan afinite jelinin farklı pH'larda enzim tutma kapasitesini belirlemek için, her bir izoenzim için 7 farklı pH'da (pH= 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5) denemeler yapılmıştır. Her üç izoenzim (BCA, hCA-I ve hCA-II) için maksimum bağlanmanın pH=8,5'de gerçekleştiği tespit edilmiştir. pH=6.5'da bağlanmanın son derece düşük olduğu Şekil 3.2 ve 3.6'da görülmektedir. Bu durum, sülfonamidlerdeki -SO₂NH₂ grubunun anyonik bir formda enzimi kolonda tutması ile açıklanabilir[67,76,101].

Kolonun kapasitesine etki eden bir diğ er önemli parametre de sıcaklıktır. Bu amaçla her bir izoenzim için, 4 farklı sıcaklıkta (5, 15, 25, 35oC) kromatografik işlemler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Şekil 3.3 ve 3.7’de grafik halinde verilmiştir. Her üç izoenzimde de, sıcaklık yükseldikçe kolona bağlanma derecelerinde paralel bir azalma görülmektedir. Bu durum sebebinin, birinci derecede enzimin artan sıcaklıkla konformasyonunda meydana gelen değışmeleri ve daha sonra da bağlanmayı gerçekleştiren grupların iyonlaşmalarının sıcaklıktan etkilenmesi olarak gösterilebilir. Bu durumun, yüksek sıcaklıklarda enzimlerin kolona bağlanma derecesinin düşmesine neden olduğu söylenebilir. Benzer sonuçlar, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için hazırlanan afinite jellerinde de görülmektedir[13,14,34,35,37-40]

Afinite jelinin enzim tutma kapasitelerinin iyonik şiddetle değışimi Şekil 3.4 ve Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, iyonik şiddetteki artış, enzimin kolona adsorpsiyonunu bir dereceye kadar artırdığını göstermektedir. Bu durum, iyonik şiddetteki yükselmenin sülfonamid ile enzim arasındaki hidrofobik etkileşmeyi arttırmasıyla açıklanabilir. Ancak iyonik şiddetteki daha fazla artışın kolon verimini düşürdüğü Şekil 3.4 ve 3.8 ’den görülmektedir. Çünkü, ortamda iyon konsantrasyonu arttıkça, bağlanmada rol alan, iyon halindeki gruplar, zıt yüklü gruplar tarafından sarılmakta ve adsorpsiyon engellenmektedir. Her üç izoenzim de, I=0.3 iyonik şiddette kolona maksimum derecede bağlanmaktadır. Çünkü, bu değ erin üzerindeki iyon konsantrasyonları bağlanmayı azaltmaktadır. Keha ve arkadaşlarının yaptığı afinite kromatografisi çalışmalarında da, I=0.15 iyonik şiddete sahip çözeltiler kullanılmıştır[13].

Tarafımızdan hazırlanan afinite jelinden beklediğimiz bir başka özellik de, jelin insan eritrosit karbonik anhidraz (hCA-I, hCA-II) izoenzimlerini ayırabilmesidir. Takılan sülfonamid ligandı, özellikle hCA-I’e olan yüksek afinitesi ile bu açıdan uygun özelliklere sahiptir.

Tek değ erlikli anyonlar, karbonik anhidraz enzimini kuvvetli inhibe etmektedirler[13]. Enzime bağlanmaları, sülfonamidlerden çok farklı olup, düşük pH’larda artmakta ve hCA-I izoenzimi için, hCA-II izoenzimine göre daha yüksek

oranda gerçekleşmektedir. Bunlara örnek olarak; Cl⁻ iyonu için, pH=6.5'ta K_i değerleri, hCA-I izoenziminde 4 x 10⁻³ M, hCA-II izoenziminde 2.7 x 10⁻¹ M, pH=7.5'ta ise bu değerler, 18 x 10⁻³ M ve 7.3 x 10⁻¹ M, N₃⁻ iyonu için, pH=5.8'de 1.5 x 10⁻⁵ M ve 0.2 x 10⁻³ M, SCN⁻ iyonu için, pH=6.0'da 1.8 x 10⁻⁵ M ve 0.3 x 10⁻³ M, I⁻ iyonu için ise pH=7.5'da 0.7 x 10⁻⁶ M ve 8.7 x 10⁻³ M olmaktadır.

Bu değerler incelendiği zaman, bu iyonları içeren çözeltiler aracılığı ile, insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimlerinin seçimli olarak elüe edilebilecekleri görülmektedir. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda, benzen sülfonamid takılı jelden izoenzimlerin elüsyonu, farklı çözeltilerle gerçekleştirilmiştir[13,14,34,35,37-40].

Tek değerlikli anyonların K_i değerleri ve diğer araştırmacıların uyguladıkları metodlar gözönüne alınarak, BCA izoenziminin seçimli elüsyonunu sağlamak için 3, hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin seçimli elüsyonunu sağlamak için ise, 6 farklı deneme yapıldı.

Çizelge 4.2 hCA-I ve hCA-II izoenzimlerini ayırmak için tarafımızdan kullanılan elüsyon çözeltileri

hCA-I Elüsyonu Tampon	Anyon çözeltisi	hCA-II Elüsyonu Tampon	Anyon çözeltisi
pH=6.3 50mM Na ₂ HPO ₄	1 M NaCl	pH=6.3 0.1 M Tris-SO ₄ ,	0.4 M NaN ₃
pH=6.3 50mM Na ₂ HPO ₄	1 M NaCl	pH=6.3 50mM Na ₂ HPO ₄	0.2 M KSCN
pH=7.0 0.1 M Tris-SO ₄	0.1 M KI	pH=5.6 0.1 M NaCH ₃ COO	0.5 M NaClO ₄
pH=7.0 0.1 M Tris-SO ₄	0.1 M KI	pH=6.3 0.1 M Tris-SO ₄	0.4 M NaN ₃
pH=7.0 0.1 M Tris-SO ₄	0.1 M KI	pH=6.3 50mM Na ₂ HPO ₄	0.2 M KSCN
pH=6.3 50mM Na ₂ HPO ₄	1 M NaCl	pH=5.6 0.1 M NaCH ₃ COO	0.5 M NaClO ₄

İnsan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimlerini ayırmak için, ilk elüsyon denemesi, 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH=6.3 ve 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄ pH=6.3 elüsyon çözeltileriyle gerçekleştirildi. Şekil 3.13'de görüldüğü gibi hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin ayrımı tam olarak gerçekleştirilememiştir. Kolon verimi son derece düşük (% 0.27) ve saflaştırma derecesinin 1,206 kat olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.4). Ancak Falkbring ve arkadaşları hCA-I izoenzimini 1 M NaCl çözeltisi ile pH=6.3'te ayırmayı başarmıştır[37]. Özensoy aynı elüsyon çözeltileri ile, izoenzimleri ayıramadığını belirtmiştir[28]. Kolonun yapısının farklı olması bu olayın en önemli nedenlerinden birisidir.

Diğer bir deneme ise, hCA-I izoenzimi için 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH=6.3, hCA-II izoenzimi için ise 50mM Na₂HPO₄ / 0,2 M KSCN, pH=6,3 elüsyon tamponları ile gerçekleştirildi. Şekil 3.14 grafiğinden elde edilen sonuçlar, başarılı bir ayırımın olmadığını göstermektedir. Kolon veriminin ilk denemeye göre daha yüksek olması, hCA-II izoenziminin afinite kolonundan 50 mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN, pH=6.3 elüsyon tamponu ile daha iyi elüe edilebildiğini göstermektedir. Bu deneme sonucunda, kolon verimi % 24.3 ve saflaştırma derecesi ise 5,76 kat olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.5). Özensoy, Keha ve Arslan araştırmalarında hCA-II izoenzimini ayırmak için, aynı anyonu kullanmış ve benzer sonuçlar elde etmişlerdir[13,34,28].

Üçüncü denemede, hCA-I izoenziminin diğer iki denemeden farklı olarak 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄ pH=7.0 elüsyon tamponu, hCA-II izoenzimi ise, 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ pH=5.6 elüsyon tamponu ile kolondan elüe edilmeye çalışılmıştır. Bu denemenin sonuçları, Şekil 3.15 grafiğinden de anlaşılacağı üzere, izoenzimlerin ayrımının pek net olmadığını göstermektedir. Yalnızca, hCA-II izoenziminin bu denemede kullanılan 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ pH=5.6 elüsyon tamponu ile kolondan iyi elüe edilebildiği, deneme sonuçlarındaki % 7,52 kolon verimi ve saflaştırma derecesinin 71.27 kat olmasından anlaşılmaktadır (Çizelge 3.6). NaCH₃COO / NaClO₄ pH=5.6 elüsyon tamponunun kolona bağlı CA enzimlerini kolondan elüe etmek için, literatürlerde çok sık kullanılmaktadır[13,34,37-40]. Bunun en önemli nedeni, sodyum asetatın hem tampon özellik göstermesi, hem de CA izoenzimlerinin bir inhibitörü olmasıdır.

Dördüncü denemenin, diğer denemelere göre daha başarısız olduğu Şekil 3.16'den görülmektedir. Bu durum, hCA-I izoenziminin üçüncü denemedeki aynı elüsyon tamponu ile stabilizasyonu sonucu, hCA-II izoenziminin afinite kolonundan, 0.4 M NaN_3 / 0.1 M Tris-SO_4 pH=6.3 elüsyon tamponu ile çok net elüe edilemediği düşüncesini güçlendirmektedir. Burada, hCA-I izoenziminin 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO_4 pH=7.0 elüsyon tamponuyla bir nebze elüe edilmesi, kolon veriminin % 0,17 ve saflaştırma derecesinin 28 kat olması sonucunu doğurmuştur (Çizelge 3.7).

Khalifah ve arkadaşları, Sepharose 6-B matriksini oksiran aktifleştirmesi ile tarafımızdan kullanılan aynı ligandı bağlamak suretiyle elde edilen afinite jelinden, kolona bağlı karbonik anhidraz izoenzimini, 0.4 M NaN_3 elüsyon tamponu ile elüe ettiği anlaşılmaktadır[13].

Ancak tarafımızdan hazırlanan afinite jeline bağlı karbonik anhidraz II izoenziminin ayrılmasında, N_3^- 'in uygun bir anyon çözelti olmadığı saptanmıştır.

Beşinci denemede, hCA-I ve hCA-II izoenzimleri sırasıyla 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO_4 , pH=7.0 ve 50mM Na_2HPO_4 / 0.2 M KSCN , pH=6,3 elüsyon tamponlarıyla ayrılmaya çalışılmıştır. Şekil 3.17'den de görüldüğü gibi, bu deneme sonuçlarının diğer denemelerden daha başarılı olduğu anlaşılmaktadır. Osborne ve Tashian, CM-Sephadex C-50 matriksini karbodiimid aktifleştirilmesi ile tarafımızdan kullanılan aynı ligandın bağlanması sonucu elde edilen afinite jeli ile, kolona adsorbe olan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerini sırasıyla, 0.1 M Tris-SO_4 pH=7.0 ve 0.1 M Tris-SO_4 / 0.2 M KSCN + 0.2 M Na_2SO_4 pH=7.5 elüsyon tamponları ile elüe ettiği görülmektedir[39]. Buna bağlı olarak, tarafımızdan hazırlanan afinite jeline adsorbe olan hCA-II izoenziminin elüsyonu için, SCN^- anyonunun uygun olduğu saptanmıştır. Bu denemedeki kolon veriminin % 3,93 ve saflaştırma derecesinin 31.12 olması bu görüşü desteklemektedir (Çizelge 3.8). Ancak kolon veriminin düşük olması, SCN^- anyonuyla ayrılmak istenen hCA-II izoenziminin, üçüncü denemede bu izoenzimin ayrılması için kullanılan NaCH_3COO / NaClO_4 pH=5.6 elüsyon tamponuna kıyasla, afinite kolonundan en iyi şekilde elüe edilemediğinin, bir göstergesidir.

Tarafımızdan hazırlanan afinite kolonundan, hCA-I ve hCA-II izoenzimlerini ayırmak için yapılan bu son denemenin diğer beş denemeye göre çok başarılı olduğu Şekil 3.18 grafiğinden anlaşılmaktadır. Bu denemede, hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin elüsyonu için sırasıyla, 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH=6.3 ve 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ pH=5.6 elüsyon tamponları kullanılmıştır. Bu denemenin, insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimlerinin ayrılmasında % 9,49 bir kolon verimine ve 184 kat yüksek bir saflaştırma derecesine sahip olması, saflaştırmanın maksimum düzeyde seyrettiğini göstermektedir (Çizelge 3.9).

Özensoy'un Eupergit C-250L matriksi üzerine p-aminobenzen-sülfonamid ve Whitney'in Sepharose-4B matriksi üzerine, CNBr aktifleştirilmesi sonucu p-aminometilbenzen-sülfonamid ligandını kullanarak hazırladığı afinite kolonunda da aynı elüsyon tamponlarını kullandığı ve başarılı olduğu görülmektedir[38].

Tarafımızdan sentezlenen afinite kolonu ile, hCA (I+II) izoenzimlerinin ayrılmasının yanı sıra, BCA izoenzimini ayırmak için de, üç farklı deneme yapılarak, kolon verimi ve saflaştırma dereceleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 4.3 BCA izoenzimini ayırmak için tarafımızdan kullanılan elüsyon çözeltileri

BCA Elüsyonu Tampon	Anyon çözeltisi
pH = 5.6 1 M NaCH ₃ COO	0.5 M NaClO ₄
pH=6.3 50mM Na ₂ HPO ₄	0.2 M KSCN
pH=6.3 0.1 M Tris-SO ₄	0.4 M NaN ₃

İlk deneme, 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH = 5.6) elüsyon tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Bu denemede, BCA izoenzimi tarafımızdan hazırlanan

afinite kolonu ile yüksek bir ayrımla gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10). Bu deneme sonuçları, bir saflaştırma tablosuna aktarıldığında, Çizelge 3.1'den % 21.07 bir kolon verimi ve 181 kat saflaştırma derecesi elde edilmiştir.

BCA izoenziminin afinite kolonundan elüsyonu için ikinci deneme, 50mM Na₂HPO₄ / 0,2 M KSCN, pH=6.3 elüsyon tamponu ile yapılmıştır. İlk denemeye göre daha az bir ayırım gerçekleştirildiği Şekil 3.11 grafiğinden anlaşılmaktadır. Saflaştırma tablosuna bakıldığında (Çizelge 3.2), %10,6'lık bir kolon veriminin yanında 78.7 kat saflaştırma derecesinin elde edildiği de görülmektedir. Bu deneme sonucunun ilk denemeye göre, daha az bir saflaştırma derecesine sahip olduğu gözlenmektedir.

BCA izoenziminin ayırımı için son deneme, 0.4 M NaN₃ / 0.1 M Tris-SO₄, pH=6.3 elüsyon tamponuyla gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.12 grafiğinden elde edilen sonuçlar bu denemenin diğer iki denemeden daha başarısız olduğunu göstermektedir. Ancak Çizelge 3.3'teki saflaştırma tablosuna bakıldığında, % 0.37'lik bir kolon veriminin yanında, 49.2364 kat saflaştırma derecesi ise dikkat çekmektedir. Bunun sonucunda, N₃- anyon çözeltilisinin SCN- ve de ClO₄- anyon çözeltilerinin yanında düşük bir kolon verimiyle birlikte BCA izoenzimini afinite kolonunda elüe edebildiğini göstermektedir.

Yüksek lisans olarak sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Afinite jeli sentezinde matriks olarak, aktif oksiran grupları içeren metakrilamid ve N,N'-bis-metilen-(metakrilamid) monomerlerinin bir kopolimeri olan Eupergit C-250 L kullanılırken, ligand olarak karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörü olan 4-izotiyosiyanatobenzensülfonamid kullanılmıştır.
- Sığır eritrosit karbonik anhidraz (BCA) ve insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II (hCA-I ve hCA-II) izoenzimlerinin, tarafımızdan sentezlenen afinite jeline maksimum adsorpsiyonu bazik pH derecesinde gerçekleştiği sonucunu ortaya koymuştur.

- BCA, hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin afinite kolonuna maksimum tutunma sıcaklıklarının, 15°C ve I= 0.3 iyonik şiddette gerçekleştirildiği saptanmıştır.
- BCA ve hCA-II izoenzimlerinin sentezlenen afinite jelinden elüsyonları için, en uygun tampon çözeltilerin, 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ pH = 5.6, hCA-I izoenzimi için ise, 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH=6.3 olarak tespit edilmiştir.
- Yapılan denemeler sonunda, BCA izoenzimi için % 21.07 kolon veriminin yanında 181 kat saflaştırma derecesi ile hCA (I+II) izoenzimleri için ise, % 9.49 kolon veriminin yanında 184 kat saflaştırma derecesi elde edilmiştir.
- Optimum şartlarda afinite kolonundan elüe edilen BCA, hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin saflığının kontrolü, SDS-PAGE (Sodyum-dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforez) elektroforeziyle kontrol edilmiştir.

KAYNAKLAR :

- [1] Supuran, C. T., and Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Curr.Med.Chem.*, 1, (2001), 61-97
- [2] Nuti, E., Orlandini, E., Nencetti, S., Rossello, A., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase and Matrix Metalloproteinase Inhibitors. Inhibition of Human Tumor-Associated Isozymes IX and Cytosolic Isozyme I and II with Sulfonylated Hydroxamates", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2007), 15, 2298.
- [3] Claudiu T. Supuran : "Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators" *Rev.7*, (February 2008), 1-14
- [4] Breton, S., "The Cellular Physiology of Carbonic Anhydrases", *JOP. J. Pancreas*, (2001), 2, (4), 159.
- [5] Vullo, D., Nishimori, I., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase Activators: An Activation Study of the Human Mitochondrial Isoforms VA and VB with Amino Acids and Amines", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2007), 17, 1336.
- [6] Casey, J. R., Morgan, P.E., Vullo, D., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors. Design of Selective, Membrane-Impermeant Inhibitors Targeting the Human Tumor-Associated Isozyme IX", *J. Med. Chem.*, (2003), 47, 2337.
- [7] Wilkinson, B. L., Bornaghi, L.F., Houston, T.A., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, C.T., Poulsen, S.A., "Inhibition of Membrane-Associated Carbonic Anhydrase Isozymes IX, XII and XIV with a Library of Glycoconjugate Benzene-sulfonamides", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2007), 17, 987.
- [8] Supuran, C. T., "Carbonic Anhydrases as Drug Targets-an Overview." *Curr Top Med. Chem.*, (2007), 7, (9), 825.
- [9] Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivelä, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S.: "Characterization of Ca XIII, a Novel Member of the Carbonic Anhydrase Isozyme Family", *JBC Papers*, (2003), In press.
- [10] Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., Yuri, K., Onishi, S., "cDNA Sequence, mRNA Expression, and Chromosomal Localization of Human Carbonic Anhydrase- Related Protein, Ca-Rp XII", *Biochimica et Biophysica Acta*, (1999), 1431, 518.

- [11] Maren, T. H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., and Godman, D.R. “*Renal and Cerebrospinal fluid formation pharmacology of high molecular weight Carbonic Anhydrase Inhibitor*”, *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280, (1997), 98-104
- [12] Chegwidde, W.R., Dodgson, S.J., Spencer, I.M., “*In the carbonic Anhydrase New Horizons*”, Birkhauser Verlag, Basel, (2000), 343-363.
- [13] Keha, E.E., “*Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu*”, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Ed. Fakültesi, Erzurum, (1981)
- [14] Wistrand, P.J., “*The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte*”, *Acta Physiol. Scand.*, (1981), 343.
- [15] Supuran, C. T., and Scozzafava, A., “*Carbonic Anhydrase Inhibitors*”. *Curr. Med. Chem.*, 1, (2001), 61.
- [16] 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.*, (1977), 78, 511.
- [17] Chegwidde, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M., “*In the Carbonic Anhydrase New Horizons*”, Birkhauser Verlag, Basel, (2000), 343.
- [18] Hilvo, M., “*Expression studies on carbonic anhydrase IX*”, Master’s thesis, Institute of Medical Technology, University of Tampere, April 2005
- [19] Leppilampi, M., “*Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX*”, Master’s thesis, Faculty of Medicine, University of Oulu, February 2006.
- [20] Lowe, N., Edwards, Y.H., Edwards, M., Butterworth, P.H., “*Physical Mapping of the Human Carbonic Anhydrase Gene Cluster on Chromosome 8*”, *Genomics*, (1991), 10, (4), 882.
- [21] Brady, H. J., Edwards, M., Linch, D.C., Knott, L., Barlow, J.H., Butterworth, P.H., “*The Human Carbonic Anhydrase I Gene Has Two Promoters with Different Tissue Specificities*”, *Biochem J.*, (1999), 277, 903.
- [22] Lowe, N., Brady, H.J., Barlow, J.H., Sowden, J.C., Edwards, M., Butterworth, P.H., “*Structure and Methylation Patterns of the Gene Encoding Human Carbonic Anhydrase I*”, *Gene*, (1990), 93, (2), 277.
- [23] Brady, H. J., Edwards, M., Linch, D.C., Knott, L., Barlow, J.H., Butterworth, P.H., “*Expression of the Human Carbonic Anhydrase I Gene Is Activated Late in Fetal Erythroid Development and Regulated by Stage-Specific Trans-Acting Factors*”, *Br. J. Haematol.*, (1990), 76, (1), 135.

- [24] Drummond F.J., S. J., Morrison K., Edwards Y.H., "Colon Carbonic Anhydrase I: Transactivation of Gene Expression by the Homeodomain Protein Cdx2 ", FEBS Letters, (1998), 423, (2), 218.
- [25] Sowden, J., Edwards, M., Morrison, K., Butterworth, P.H.W., Edwards, Y.H., " Erythroid Expression and DNAase-Hypersensitive Sites of the Carbonic Anhydrase I Gene", Biochem J., (1992), 288, (2), 545.
- [26] Mincione Francesco, Menabuoni Luca ve Supuran Claudiu T. : "Carbonic Anhydrase,Its Inhibitors and Activators" London 2004 (Bölüm 8)
- [27] Aalto-Korte, K. (1998) "Contact allergy to dorzolamide eyedrops." *Contact Dermatitis* 39, 206. Alm, A. (1998) Prostaglandin derivatives as ocular hypotensive agents. *Progress in Retinal and Eye Research* 17, 291–312.
- [28] Özensoy, Ö., "Eritrositlerden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması için Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması" Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, 2002
- [29] Falkbring, S. O., Göthe, P. O., Nyman, L., and Parath, J., "Affinity Chromatography of carbonic anhydrase", FEBBS. Letter, 24, (1972), 229.
- [30] Whitney, P. I., "Affinity Chromatography of Carbonic anhydrase", Anal. Biochem., 64, (1974), 267.
- [31] Osborne, W. R., and Tashian, R. E., "An Improved method for the Purification of Carbonic anhydrase Isoenzymes by Affinity Chromatography", Anal. Biochem., 64, (1975), 297.
- [32] Johansen, J. T., "Isolation of Human Carbonic anhydrase Band C and apocarbonic anhydrase by Affinity Chromatography", Carlsberg Res. Commun., 41, (1976), 73.
- [33] Demir, N., Demir, Y., and Coşkun, F., "Purification and Characterization of Carbonic anhydrase from Human Erythrocyte Plasma Membrane", Turk J. Med. Sci., 31, (2001), 477-482.
- [34] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ. : "A new Method for the purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography." Turkish Journal of Medical Sciences, 26:163-166, 1996
- [35] Cho, YOUN-JEUNG & Park, OH-JIN & Shin, HYUN-JAE "Immobilization of thermostable trehalose synthase for the production of trhalose" Yusong Daejon 305-333, Korea; October 2005
- [36] Thomas Boller, Christian Meier ve Stefan Menzler* "EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis" Thomas Boller, Christian Meier, and Stefan Menzler* (Author for correspondence. Degussa Specialty Polymers, Röhm GmbH and Co. KG, Kirschenallee, D-64293 Darmstadt, Germany

- [37] Falkbring, S. O., Göthe, P. O., Nyman, L., and Parath, J., "Affinity Chromatography of carbonic anhydrase", *FEBS. Letter*, 24, (1972), 229.
- [38] Whitney, P. I., "Affinity Chromatography of Carbonic anhydrase", *Anal. Biochem.*, 64, (1974), 267.
- [39] Osborne, W. R., and Tashian, R. E., "An Improved method for the Purification of Carbonic anhydrase Isoenzymes by Affinity Chromatography", *Anal. Biochem.*, 64, (1975), 297.
- [40] Johansen, J. T., "Isolation of Human Carbonic anhydrase Band C and apocarbonic anhydrase by Affinity Chromatography", *Carlsberg Res. Commun.*, 41, (1976), 73.
- [41] Demir, N., Demir, Y., and Coşkun, F., "Purification and Characterization of Carbonic anhydrase from Human Erythrocyte Plasma Membrane", *Turk J. Med Sci.*, 31, (2001), 477-482.
- [42] Maren, T.H., "Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition", *Physiol.Rev.*, 47, (1967) 595
- [43] Lindskog, S., "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase", *Pharmacol. Ther.*, (1997), 74, (1), 1.
- [44] Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G. N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J. M., Vhinen, M., Sly, W. S., Parkkila, S., "Characterization of CA XV, a New Gpi-Anchored Form of Carbonic Anhydrase", *Biochem. J.*, (2005), 392, (1), 83.
- [45] Mohanty, A. K., Kannan, K.K., Mahajan S.K., "Human Carbonic Anhydrase I: Effect of Specific Site Mutations on Its Function", *J. Biosci.*, (1998), 23 (3), 235.[60]
- [46] Mohanty, A. K., Satyamurti, M.B., Joshi, V.R., Mahajan, S.K., Hosur, M.V., Kannan, K.K., "Cloning and Crystallographic Analysis of Human Carbonic Anhydrase I", *Current Science*, (1992), 73, (3), 267.
- [47] Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T, "Carbonic Anhydrase Inhibitors and Activators and Their Use in Therapy", *Expert Opin. Ther. Patents*, (2006), 16, (12), 1627.
- [48] Smith, K. S., Cosper, N.J., Stalhandske, C., Scott, R.A., Ferry, J.G., "Structural and Kinetic Characterization of an Archaeal B-Class Carbonic Anhydrase", *Journal of Bacteriology*, (2000), 182, (23), 6605
- [49] Supuran, C. T., Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Curr. Med. Chem. Imm., Endoc. & Metab. Agents*, (2001), 1, 61.
- [50] Kim, G., Selengut, J., and Levine, R.L. (2000) Carbonic anhydrase III: The Phosphatase activity is extrinsic. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 377, 334–340.

- [51] Supuran, C.T., Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase as Targets for Medicinal Chemistry", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2007), In Press.
- [52] Aydoğan, S., "Yönlendirilmiş Mutagenез İle Mutant hCAII Geninin Eldesi ve Mutant Proteinlerin İnhibitörlere Karşı İlgisinin Araştırılması", Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 2006
- [53] Lindskog, S., and Silverman, D.W. (2000) The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. In *The Carbonic Anhydrases — New Horizons*, Chegwidde W.R., Edwards, Y., and Carter, N., Eds., Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 175–196.
- [54] Smith, K.S., and Ferry, J.G. (1999) A plant-type (β -class) carbonic anhydrase in the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of Bacteriology* 181, 6247–6253.
- [55] Lindskog, S., Coleman, J.E., "The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (1973), 70, (9), 2505.
- [56] Lowe, N., Edwards, Y.H., Edwards, M., Butterworth, P.H., "Physical Mapping of the Human Carbonic Anhydrase Gene Cluster on Chromosome 8", *Genomics*, (1991), 10, (4), 882.
- [57] Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., and Goodman, M., "On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and III isozymes: Current topics in Biological and Medical Research", *Molecular Structure and Regulation*, 7,(1983), 79.
- [58] Deutsch, H.F., "Carbonic anhydrase", *Int. J. Biochem.*, 19, (1987) 100.
- [59] Wistrand, P.J., "Solubilization and preliminary characterization of membrane bound Carbonic anhydrase", *J. Med. Sci.*, 85,(1980) 75.
- [60] 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, (1982) 914
- [61] Lindskog S (1997). "Structure and mechanism of carbonic anhydrase". *Pharmacol. Ther.* 74 (1): 1–20.
- [62] Jabusch, J. R., and Deutsch, H. F., "Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with *p*-nitrophenyl acetat" *Arch Biochem. Biophys.*, 238,(1989),170
- [63] Arslan, O., Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).

- [64] Scozzafava, A. and Supuran, C.T. (2002)*Biorganic Medicinal Chemistry Letters* 12, 1177–1180. With permission from Elsevier.)
- [65] 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.*, (2007), 7, (9), 901.
- [66] Maren, T.H., "Carbonic anhydrase: General perspectives and advances in glaucuma research", *Drug dev. Res.*, 10, (1987) 255.
- [67] Arslan, O., "Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds", *Turk J. Med. Sci.*, (2001) 66 (9), 982
- [68] Winum, J.,Y., Scozzafava, A., Montero, J.L., Supuran, C.,T. "Sulfamates and Their Therapeutic Potential", *Med.Research Reviews*, 2004 Wiley Periodicals, Inc.
- [69] Franchi, M., Vullo, D., Lallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Supuran, C.T. "Carbonic Anhydrase Inhibitors, Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane Cancer-associated Isozyme IX with Lipophilic Sulfonamides", *J.Enzyme Inhib. And. Med.Chem.*184, (2003), 333.
- [70] Supuran, C.T., Scozzafava, A., and Casini, A. (2003) Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews* 23, 146–189.
- [71] Lindahl, M., Vidgren, J., Eriksson, E., Habash, J., Harrop, S., Helliwell, J., Liljas, A.,Lindeskog, M., and Walker, N. (1991) "Crystallographic studies of carbonic anhydrase inhibition. In *Carbonic Anhydrase*", Botrè, F., Gros, G., and Storey, B.T., Eds., VCH, Weinheim, pp. 111–118.
- [72] Smith, K.S., and Ferry, J.G. (2000) Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiological Reviews* 24, 335–366.
- [73] Philopot, F. J., and Philopot, J., "A modified colorimetric estimation of Carbonic anhydrase", *J.Biochem.*, 30, (1936), 2191.
- [74] Brinkman, R., "The occurrence of Carbonic anhydrase in lower marine animals", *J. Physiol.*, 80, (1934), 171.
- [75] Maren, C. H., "A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors", *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 130, (1960), 26.
- [76] Conroy, C. W., and Maren, T. H., "The determination of osteopetrotic phenotypes by selective inactivation of red cell Carbonic anhydrase isoenzymes", *Clin. Chim. Acta.*, 15, (1985), 3347.
- [77] Wilbur, K. M., and Anderson, N. G., "Electrometric and colorometric determination of Carbonic anhydrase", *J. Biol. Chem.*, 176, (1948), 147.
- [78] Wilbur, K. M., and Anderson, N. G., "Electrometric and Colrimetric Determination of Carbonic Anhydrase", *J. Biol. Chem.*, 176, (1948), 147

- [79] Mc Intosh, J. E. A., “Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and uterus of the rabbit”, *J. Biochem.*, 120, (1970), 299.
- [80] Erarslan,A., Kazan,B., Denizci,A.A., Karahan,N., “Enzim Saflaştırılmasında Temel yöntemler”, (2001), Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Ens., Kocaeli
- [81] Bollog, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J., “Protein Purification Methods”, *Second Edition, Wiley-Liss, Inc. New-York*, (1996)
- [82] Scopes, R. K., “Protein Purification-Principles and Practice”, *3rd Edition Springer-Verlag New-York*, (1982)
- [83] Arslan, O. , “Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitorlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması”, *Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum*, (1994)
- [84] Arslan,O., “Biyomolükeller Teori ve Uygulamaları ile”, (2003), Balıkesir
- [85] <http://teachline.ls.huji.ac.il/72682/Booklets/PHARMACIA-AffinityManual.pdf>
- [86] Keha, E. E., “Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu”, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,Erzurum, (1981).
- [87] Backman, L. Binding of human carbonic anhydrase to human hemoglobin. *Eur. J. Biochem.*, 120, 257-281, 1981.
- [88] Whitney, P.L. and Briggie, T.V. Membrane-associated carbonic anhydrase purified from bovine lung. *J. Biol. Chem.*, 257, 12056-12059, 1982.
- [89] Storey, B.T., Dodgson, S.J. and Forster, R.E. Mitochondrial carbonic anhydrase: the purified enzyme. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429, 210-211, 1984.
- [90] Murakami, H. and Sly, W.S. Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 262, 1382-1388, 1987.
- [91] Vince, J.W. and Reithmeier, R. A. F.: Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl-/HCO₃⁻ anion exchanger AE1. *Biochemistry*, 39: 5527-5533, 2000.
- [92] Warburg, O., and Christian, W., “Isolierung und Kristallization des Gärungsferments Enolase”, *Biochem.*, 310, (1941), 384
- [93] Bradford, M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, 72, (1976), 248.

- [94] Solomon, B., Schmitt, S., Schwartz, F., Levi, A., and Fleminger, G., "Eupergit C-Coated Membranes as solid support for a Sensitive Immunoassay of Human Albumin", *J. Immunol. Methods*, 157 (1-2), (1993), 209-215.
- [95] Clanis, Y. D., "Matrix Evaluation for Preparative High-Performance affinity Chromatography", *J. Chromatogr.*, 407, Pt. A, (1990), 179-187.
- [96] Axen, R., and Ernback, S., "Chemical fixation of enzymes halide activated polysaccharide carriers", *Eur.J. Biochem.*, 18, (1971), 351.
- [97] Laemmli, D. K., "Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T₄", *Nature*, (1970), London, 227-680.
- [98] John F. Robyt, Bernard J. White, "Biochemical Techniques Theory and Practice", Waveland Press, Inc., (1987).
- [99] Cuatrecasas, P., "Protein Purification by Affinity Chromatography, derivatizations of agarose and polyacrylamide beads", *J. Biol. Chem.*, 245, (1970), 3059.
- [100] Casini, A., Scozzafava, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Iliés, M.A., and Supuran, C.T. (2000), Carbonic anhydrase inhibitors: Water soluble 4-sulfamoylphenylthioureas as topical intraocular pressure lowering agents with long lasting effects. *Journal of Medicinal Chemistry* 43, 4884–4892.
- [101] Roughtan, F. J. W. and Booth, V. H., "The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of Carbonic anhydrase", *J. Biochem.*, 40, (1946), 319.
- [102] Schmidt TG, Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc.* 2007;2(6):1528-35. Germany.
- [103] Ulrich J. Meyer, Zheng-liang Zhi, Markus Meusel, Friedrich Spener and Elma Loomans Automated stand-alone flow injection immunoanalysis system for the determination of cephalixin in milk *Analyst*, 1999, 124, 1605 - 1610,