

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

**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ I (HCA I) GENİNİN KLONLANMASI,
E.coli 'DE EKSPRESYONU VE Phe91Asn YÖNLENDİRİLMİŞ
MUTAGENEZİYLE ELDE EDİLEN MUTANT ENZİMİN İNHİBİTÖRLERE
KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meltem AYDIN

Balıkesir, Temmuz -2007

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

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ I (HCA I) GENİNİN KLONLANMASI,
E.coli 'DE EKSPRESYONU VE Phe91Asn YÖNLENDİRİLMİŞ
MUTAGENEZİYLE ELDE EDİLEN MUTANT ENZİMİN İNHİBİTÖRLERE
KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meltem AYDIN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR
(İkinci Danışman): Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Sınav Tarihi: 13.08.2007

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (Danışman-BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Selma SİNAN (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Elif ÖZTETİK (AÜ)



Balıkesir, Temmuz-2007

ÖZET

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ I (HCA I) GENİNİN KLONLANMASI, *E.coli* 'DE EKSPRESYONU VE Phe91Asn YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZİYLE ELDE EDİLEN MUTANT ENZİMİN İNHİBİTÖRLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Meltem AYDIN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek lisans Tezi / Tez Danışmanı: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR)
(İkinci Danışman: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)
Balıkesir, 2007

İnsan Karbonik Anhidraz (HCA I) (Karbonat hidrolizaz E.C. 4.2.1.1) 8. kromozomun uzun kolunda lokalize olan 30kDa büyüklüğünde bir proteindir. Eritrositlerde, kolon epitelinde, göz lensi ve korneal epitelyumda bulunur. Hücre içinde çözülebilir formda sitozolde yer alan HCA I eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir.

Yüksek göz içi basıncını düşürmek amacıyla glokom hastalığının tedavisinde kullanılan sülfonamidlerin HCA II izoenziminin yanında HCA I izoenzimini de önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır. Bu nedenle araştırmamızda sülfonamidlere karşı daha az ilgili mutant HCA I enzimleri elde edilmesi planlanmıştır. Bu amaçla insan hCA I geni, RT-PCR stratejisi ile HL60 hücre hattından pGEM-T vektörüne ve daha sonra pET21a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı. Phe91 hidrofobik rezidüsü PCR 'a dayalı yönlendirilmiş mutagenез stratejisi ile daha hidrofilik olan Asn rezidüsüne dönüştürüldü. Yabani ve mutant HCA I enzimlerinin ekspresyonu *E.coli* 'de gerçekleştirildi. Spesifik Sefaroz-4B-L-Tirozin afinite jeli kullanılarak saflaştırıldı, hidrataz aktiviteleri belirlendi. Glokom tedavisinde sıklıkla kullanılan sülfonamid ve asetozolamide karşı inhibisyonu araştırıldı.

Yabani tip HCA I enziminin aksine ($IC_{50} = 1.257 \times 10^{-4} M$), Phe91Asn mutanıtı, $0.468 \times 10^{-4} M$ IC_{50} değeri ile sülfonamide karşı daha yüksek afinite göstermiştir. Asetozolamide karşı yabani ($IC_{50} = 1.376 \times 10^{-6} M$) ve mutant ($IC_{50} = 1.283 \times 10^{-6} M$) HCA I enzimleri arasında önemli bir inhibisyon farkı tespit edilmemiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER : Afinite kromatografisi, Ekspresyon, Glokom, İnhibisyon, Karbonik Anhidraz, Klonlama, Yönlendirilmiş mutagenез, ,

ABSTRACT

CLONING AND EXPRESSION OF HUMAN CARBONIC ANHYDRASE I (HCA I) GENE IN *E.coli* AND INVESTIGATION OF AFFINITY OF THE MUTANT ENZYME TO THE INHIBITORS WHICH IS OBTAINED SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF Phe91Asn

Meltem AYDIN

Balıkesir University , Institute of Science, Department of Biology

(MSc. Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Feray KÖÇKAR)
(Cosupervisor: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)
Balıkesir, Turkey, 2007

Human Carbonic Anhydrase (HCA I) (Carbonate hydrolyyase E.C. 4.2.1.1) is a protein with 30kDa weight and situated on the long arm of chromosome 8. It presents in erythrocytes, colon ephithelium, lens of eye and corneal ephithelium. HCA I is the most abundant protein after hemoglobin in erythrocytes which is found in cytosol and has soluble form.

It's found that sulfonamides which are used in glaucoma treatment to reduce inner eye pressure in glaucoma, inhibit not only HCA II isoenzyme but also HCA I remarkably. For this aim, in this study it was planned to obtain mutant HCA I enzymes which have low affinity to sulfonamides. Therefore hCA I gene has been cloned from HL60 (Human acute myeloid leukemic cell line) by RT-PCR strategy and was cloned into pGEMT and subsequently into pET21a(+) expression vector. Phe91 hydrophobic residue was changed into more hidrophilic Asn residue with PCR based site directed mutagenesis. The expression of wild type and mutant HCA I enzymes was performed in *E.coli*. Wild and mutant HCA I enzymes were purified by specific Sepharose 4B-L-Tyrosine affinity gel and hydratase and esterase activities measured. Inhibition manner of these enzymes by Sulphonilamide and acetazolamide widely used for the treatment of glaucoma was investigated.

Phe91Asn mutant ($IC_{50} = 0.468 \times 10^{-5} M$) has higher inhibition affinity than wild type HCA I with IC_{50} values of $IC_{50} = 1.257 \times 10^{-5} M$ to sulphonilamide. It wasn't defined important inhibition difference of wild type ($IC_{50} = 1.376 \times 10^{-6} M$) and Phe91Asn mutant enzyme ($IC_{50} = 1.283 \times 10^{-6} M$) to acetazolamide.

KEY WORDS: Affinity choromatography, Carbonic anhydrase, Cloning, Expression, Glaucoma, İnhibition, Site-directed mutagenesis,

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER.....	ii
ABSTRACT, KEYWORDS.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Karbonik Anhidraz Enzim Ailesi.....	2
1.1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları.....	4
1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Hidrataz aktivitesinin Katalitik Mekanizması.....	5
1.1.4 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve İnhibisyon Mekanizması.....	7
1.1.5. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Hastalıklarla İlişkisi.....	10
1.1.6 Karbonik Anhidraz I İzoenzimi.....	11
1.1.7 Karbonik Anhidraz I Geninde Yönlendirilmiş Mutagenizasyon.....	13
1.2 Mutagenizasyon Teknikleri.....	14
1.3 Rekombinant Proteinin Ekspresyonu.....	16
1.3.1 Prokaryotik Ekspresyon Sistemleri.....	16
1.3.2 Ökaryotik Ekspresyon Sistemleri.....	18
1.3.2.1 Maya.....	18
1.3.2.2 Filamentli Funguslar.....	18
1.3.2.3 Böcek/Baculovirüs.....	19
1.3.2.4 Memeli Hücreleri.....	19
1.3.2.5 Transgenik Hayvan ve Bitki Ekspresyon Sistemleri.....	20
1.3.3 Ekspresyon Vektörünün Seçimi.....	20
1.3.4 Rekombinant Proteinin Kararlılığı.....	21
1.3.5 Nadir Kodon Engeli.....	21
1.3.6 İnküzyon Cisimciklerinin Oluşması.....	22
1.3.7 pET Ekspresyon Vektör Sistemi.....	22
1.4 Afinite Kromatografisi.....	25
1.5 Amaç.....	28
2. MATERYAL ve METOD.....	30
2.1 Materyal.....	30
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar.....	30
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri.....	30
2.1.3 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler.....	32

2.1.4 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Soyu.....	32
2.1.5 Bakteriyel Hücre Soyları.....	32
2.1.6 Plazmitler.....	32
2.1.7 Tamponlar ve Çözeltiler.....	34
2.1.7.1 RNA Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	34
2.1.7.2 Formaldehit-Agaroz Jel Elektrofrezisi Tamponları.....	34
2.1.7.3 Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	35
2.1.7.3.1 Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar	35
2.1.7.3.2 Kompetan Hücrelerin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler.....	36
2.1.7.4 Agaroz Jel Elektrofrezisi Tamponları.....	37
2.1.7.5 Protein Ekspresyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	37
2.1.7.6 Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	39
2.1.7.6.1 Sepharoz 4B-L-tirozin-sülfonamid Afinité Jel Tamponları.....	39
2.1.7.6.2 Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	40
2.1.7.6.3 Protein Elektrofrezisinde Kullanılan Tamponlar.....	41
2.1.7.6.4 CA-CO ₂ Hidrataz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Tamponlar...	43
2.1.7.6.5 Esteraz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Tamponlar.....	44
2.2 Metot.....	45
2.2.1 Hücre Kültürü Deneyleri.....	45
2.2.1.1 Hücre Kültürü Laboratuvarının Temizliđi.....	45
2.2.1.2 Hücre Kültürü Laboratuvarındaki Cihazların Temizliđi.....	45
2.2.1.2.1 Steril Kabinin Temizliđi.....	45
2.2.1.2.2 CO ₂ 'li İnkübatörün Temizliđi.....	45
2.2.1.3 Kullanılan Malzemelerin Temizliđi.....	46
2.2.1.4 Hücre Kültürü Deneylerinde Kullanılacak Malzemenin Hazırlığı....	46
2.2.1.4.1 Medyumun Hazırlanması.....	46
2.2.1.4.2 FCS ' nin Hazırlanması.....	46
2.2.1.4.3 -80 °C Derin Dondurucuda Stoklanan Hücrelerin Açılması.....	47
2.2.1.5 Hücrelerin Pasajlanması.....	47
2.2.1.6 Hücre Sayımının Yapılması.....	47
2.2.2 RNA ile İlgili Teknikler.....	48
2.2.2.1 RNA İzolasyonunun Yapılması.....	48
2.2.2.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	49
2.2.2.3 Formaldehit Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	49
2.2.2.4 RT- PCR Reaksiyonu.....	50
2.2.3 DNA ile İlgili Teknikler.....	51
2.2.3.1 Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	51
2.2.3.2 PCR Ürünlerinin Jelden Geri Kazanılması.....	52
2.2.3.3 Plazmit DNA İzolasyonu.....	52
2.2.3.4 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	53

2.2.3.5 Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim.....	53
2.2.3.6 PCR Ürünlerinin pGEM-T Vektör Sistem I'e Ligasyonu.....	54
2.2.3.7 Ligasyon.....	54
2.2.3.8 PCR 'a Dayalı Yönlendirilmiş Mutagenizasyon.....	54
2.2.4 Bakteri Deneyleri.....	55
2.2.4.1 <i>XL1Blue</i> ve <i>DH5α</i> Hücrelerinin Kompetan Hale Getirilmesi.....	55
2.2.4.2 BL_21(DE3) Kodon Plus Hücrelerinin Kompetan Hale Getirilmesi.....	56
2.2.4.3 Ampisilinli LB Agar Petrilerinin Hazırlanması.....	56
2.2.4.4 Transformasyon.....	57
2.2.4.5 Gliserol Stoğun Hazırlanması.....	57
2.2.5 Rekombinant Proteinin Ekspresyonu, Analizi ve Saflaştırılması.....	58
2.2.5.1 Ekspresyonun IPTG ile indüklenmesi.....	58
2.2.5.2 Hücrelerin Yıkınması.....	58
2.2.5.3 Lizis İşlemi.....	58
2.2.5.4 Diyaliz.....	59
2.2.5.5 Afinite Jelinin Sentezlenmesi.....	59
2.2.5.5.1 Sepharose -4B 'nin Aktifleştirilmesi ve Tirozin Takılması.....	59
2.2.5.5.2 Sülfanilamidin Kenetlenmesi.....	60
2.2.5.6 Örneğin Kolona Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu.....	60
2.2.5.7 Bradford Yöntemi ile Total Protein Konsantrasyonunun	60
2.2.6 SDS PAGE.....	61
2.2.7 Karbonik Anhidraz Aktivite Tayin Metodları.....	62
2.2.7.1 Hidrataz Aktivitesi.....	62
2.2.7.2 Esteraz Aktivitesi.....	62
2.2.7.3 İnhibisyon Çalışmaları.....	63
3. BULGULAR.....	64
3.1 hCAI Geninin Klonlanması.....	64
3.2 hCAI Geninin Biyoinformatik Analizi.....	69
3.3. hCAI Geninin pET 21a(+) Vektörüne Alt Klonlanması.....	71
3.4 hCAI geninde Yönlendirilmiş Mutagenizasyon Statejisi.....	73
3.4.1 Phe91Asn Mutantının Otomatik Dizi Analizi ile Doğrulanması.....	74
3.5 Yabani ve Mutant hCAI Genlerinin Ekspresyon Statejisi.....	76
3.6 İnhibisyon Çalışmaları.....	82
3.6.1 Yabani ve Mutant HCA I Enzimlerinin Esteraz Aktivitelerinin Ölçülmesi.....	87
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	88
EK ŞEKİLLER.....	93
5. KAYNAKLAR.....	96

SEMBOL LİSTESİ

<u>Simge</u>	<u>Adı</u>
HCA I	İnsan Karbonik Anhidraz I İzoenzimi
HCA II	İnsan Karbonik Anhidraz II İzoenzimi
CARP	Karbonik Anhidraz Bağlantılı Proteini
FCS	Fetal Sığır Serumu
RT-PCR	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HL60	İnsan Akut Myeloid Lösemi Hücre Hattı
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
IPTG	İzopropil β -D-Tiogalaktopiranozit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DEPC	Dietilpirokarbonat.
LB	Luria Broth
PMSF	Fenilmetilsülfonil Florür
BSA	Sığır Serum Albumini
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
FA	Formaldehit Agaroz
K562	İnsan Kronik Myeloid Lösemi Hücre Hattı
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medyum
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
RPM	Dakikadaki Dönüş Sayısı

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u> <u>Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1	Karbonik Anhidraz Enziminin CO ₂ -Hidrat az Mekanizması.....	6
Şekil 1.2	Sülfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzimine Bağlanması.....	9
Şekil 1.3	Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamid ve Anyonlarla İnhibisyonu.....	9
Şekil 1.4	İnsan Karbonik Anhidraz I Geni Diyagramı.....	11
Şekil 1.5	Karbonik Anhidraz I Enzimi Aktif Bölgesi.....	12
Şekil 1.6	HCA I Enziminin Aktif Bölgesi ve İnhibörle Etkileşimi.....	13
Şekil 1.7	Yönlendirilmiş Mutagenез Basamakları.....	16
Şekil 1.8	pET Ekspresyon Vektör Sistemi.....	23
Şekil 1.9	Rekombinant Proteinin Ekspresyonu.....	24
Şekil 1.10	Afinite Kromatografisi ile Proteinin Saflaştırılması.....	27
Şekil 2.1	pGEM-T Vektör Haritası	33
Şekil 2.2	pET21a(+) Vektör Haritası	33
Şekil 2.3	Toma Lamı.....	48
Şekil 3.1	K562 Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektrof orezi Görüntüsü ..	65
Şekil 3.2	HL60 Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektrof orezi Görüntüsü ..	65
Şekil 3.3.	hCA I geni PCR Amplifikasyonu Agaroz Jel Elektrof orezi Görüntüsü	67
Şekil 3.4	K562 cDNA 'sı kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonu Agaroz Jel Elektrof orezi görüntüsü.....	67
Şekil 3.5	Jelden geri kazanılan hCAI geni Agaroz jel elektrof orezi görüntüsü..	68
Şekil 3.6	pGEM-T ligasyonunun kontrolü.....	68
Şekil 3.7	Otomatik Dizi Analizi Sonuçlarının hCA I Geni ile Karşılaştırılması	70
Şekil 3.8	pET21a(+) Restriksiyon Kesimi Sonucu	71
Şekil 3.9	hCAI Genini İçeren pGEM-T Plazmitinin BamHI/NdeI Kesiminin Agaroz Jel Elektrof orezi Görüntüsü.....	72
Şekil 3.10	pET21a(+) hCAI Geni Agaroz Jel Elektrof orezi Görüntüsü.....	73
Şekil 3.11	Phe91Asn Mutantı Dizi Analizi Sonuçları.....	75
Şekil 3.12	Plazmit içeren ve içermeyen BL-21(DE3) Codon Plus hücrelerinden elde edilen ham ekstrakt ve afinite ürünlerinin SDS PAGE görüntüsü.	77
Şekil 3.13	İndüklenmiş HCA I İzoenzimi SDS PAGE görüntüsü	78
Şekil 3.14	İndüklenmemiş HCA I enzimi SDS PAGE görüntüsü.....	78
Şekil 3.15	Yabani HCA I Enziminin Saflaştırma Grafiği.....	79
Şekil 3.16	HCA I Yıkamada Alınan Örneğin SDS PAGE Görüntüsü	80
Şekil 3.17	Phe91Asn Mutantı Saflaştırma Grafiği	81
Şekil 3.18	Phe91Asn Mutantı SDS PAGE Görüntüsü	82
Şekil 3.19	Saf HCA I Enzimi Üzerinde Sülfonamidin Farklı Konsantrasyonları İçin Elde Edilen%Aktivite-[Sülfonamid] Grafiği	84
Şekil 3.20	Saf HCA I Enzimi Üzerinde Asetozolamidin Farklı Konsantrasyonları İçin Elde Edilen%Aktivite-[Asetozolamid] Grafiği	84

Şekil 3.21 Saf Phe91Asn Mutantı Üzerinde Sülfonamidin Farklı Konsantrasyonları İçin Elde Edilen%Aktivite-[Sülfonamid] Grafiği	86
Şekil 3.22 Saf Phe91Asn Mutantı Üzerinde Asetozolamidin Farklı Konsantrasyonları İçin Elde Edilen%Aktivite-[Asetozolamid] Grafiği	86

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge	Numarası	Adı	Sayfa No
Çizelge 1.1	α -CA	İzoenzimlerinin Hücre İçi Yerleşimleri ve Kinetik Özellikleri.....	3
Çizelge 1.2	α - CA	İzoenzimleri Tarafından Katalizlenen Reaksiyonlar.....	5
Çizelge 1.3	Karbonik Anhidraz	İzoenzimlerinin Sülfonamidlere İlgisi.....	8
Çizelge 2.1		Kullanılan Laboratuvar Gereçleri.....	8
Çizelge 2.2	Formaldehit Agaroz	Elektroforezi Jel Tamponu.....	34
Çizelge 2.3	FA Jel	Elektroforezi Tank Tamponu.....	34
Çizelge 2.4		Solüsyon I.....	35
Çizelge 2.5		Solüsyon II.....	35
Çizelge 2.6		Solüsyon III.....	35
Çizelge 2.7	Kompetan Hücre	Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar.....	36
Çizelge 2.8		Tritilasyon Tamponu.....	36
Çizelge 2.9	Tris-Borik Asit	EDTA Tamponu (0.5X).....	37
Çizelge 2.10	Tris-Cl	Tamponu.....	38
Çizelge 2.11	Lizis	Tamponu.....	38
Çizelge 2.12	Dengeleme	Tamponu.....	39
Çizelge 2.13	Yıkama	Tamponu.....	39
Çizelge 2.14	Elüsyon	Tamponu.....	40
Çizelge 2.15	Bradford	Boyama Çözeltisi.....	40
Çizelge 2.16	Standart BSA	Çözeltisi.....	40
Çizelge 2.17	%12 lik	Ayırma Jeli.....	41
Çizelge 2.18	Yığma	Jeli (%5).....	41
Çizelge 2.19		Tank Tamponu.....	42
Çizelge 2.20		Numune Tamponu.....	42
Çizelge 2.21		Boyama Çözeltisi.....	42
Çizelge 2.22		Aritma Çözeltisi.....	43
Çizelge 2.23	CO ₂ Hidrataz	Aktivite Tamponu.....	43
Çizelge 2.24		İndikatör Tamponu.....	43
Çizelge 2.25	Doygun CO ₂	Çözeltisi.....	44
Çizelge 2.26 a	Reverse	Transkripsiyon Bileşenleri	50
Çizelge 2.26 b	Reverse	Transkripsiyon Bileşenleri.....	50
Çizelge 2.27		PCR Döngü Koşulları.....	51
Çizelge 2.28	Restriksiyon	Endonükleaz Kesim Reaksiyonu.....	53
Çizelge 2.29	Yönlendirilmiş	Mutagenез PCR Koşulları.....	55
Çizelge 3.1	hCA I ve GAPDH	genine Spesifik Olarak Tasarlanan Primerler..	66
Çizelge 3.2		Mutant Primer Dizileri.....	74
Çizelge 3.3	Yabani HCA I	Enziminin Saflaştırma Çizelgesi	80
Çizelge 3.4	Phe91Asn	Mutantı Saflaştırma Çizelgesi.....	81
Çizelge 3.5	Stok İnhibitör	Çözelti Konsantrasyonları.....	82

Çizelge 3.6 Yabani HCA I Enzimi Üzerinde Çalışılan Sülfonamid Konsantrasyonu, Hidrataz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Miktarı ve %Aktiviteleri.....	83
Çizelge 3.7 Yabani HCA I Enzimi Üzerinde Çalışılan Asetozolamid Konsantrasyonu, Hidrataz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Miktarı ve %Aktiviteleri.....	83
Çizelge 3.8 Phe91Asn Mutantı Üzerinde Çalışılan Sülfonamid Konsantrasyonu, Hidrataz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Miktarı ve %Aktiviteleri.....	85
Çizelge 3.9 Phe91Asn Mutantı Üzerinde Çalışılan Asetozolamid Konsantrasyonu, Hidrataz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Miktarı ve %Aktiviteleri.....	85
Çizelge 3.10 Yabani HCA I Enzimi ve Phe91Asn Mutantı IC ₅₀ değerleri	86

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışmanın deneysel aşamaları, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya laboratuvarlarında yapılmış olup, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi **Doç. Dr. Feray KÖÇKAR** ve Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve dekanı **Prof. Dr. Oktay ARSLAN** danışmanlığında sonuçlanmıştır.

Tez çalışmalarım sırasında engin bilgi ve tecrübeleriyle beni yetiştiren ve bana yol gösteren değerli hocam Doç.Dr. Feray KÖÇKAR'a ve en kısıtlı zamanlarında bile bana zaman ayıran değerli hocam Prof.Dr. Oktay ARSLAN 'a

Çalışmalarım sırasında kullandığım hücre hatlarının temininde yardımlarını esirgemeyen Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof.Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN ve Araştırma görevlisi Canan SEVİMLİ 'ye

Yoğun laboratuvar çalışmalarım süresince beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Yrd.Doç.Dr Selma SİNAN, Araş.Gör.Hatice YILDIRIM, Ferit KARANFİL ve sevgili arkadaşlarım Semra IŞIK, Sümeyye AYDOĞAN, Serpil UĞRAŞ, Serap BEYAZTAŞ, Görkem DENİZ, Nurten ÇANAKÇI, Evrim ÇELEBİ ve Alp ALPER'e

Her zaman yanımda olan ve bana olan güvenlerini hiçbir zaman kaybetmeyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, 2007

Meltem AYDIN

Bu Yüksek Lisans Tezi DPT 2003K/120230 no'lu proje ile desteklenmektedir.

1. GİRİŞ

Karbonik Anhidraz (Karbonat hidrolizaz, karbonat dehidrataz, karbonat anhidraz, karbonik asit anhidraz E.C.4.2.1.1) Prokaryot, Ökaryot ve *Archaea* 'da yaygın olarak bulunan ve yapısında Zn^{+} iyonu bulunduran bir metaloenzimdir [1-10]. 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 [11-18]. 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^{nrb} nükleusta bulunmaktadır [7, 19-25].

CA izoenzimlerinin temel görevi karbondioksitin bikarbonata geri dönüşümlü hidrasyonunu sağlamak olduğundan solunum, dokularda CO_2 'nin taşınması, pH ve CO_2 homeostasisinin sağlanması, iyonların taşınması, biyosentetik reaksiyonlar, kemik oluşumu gibi önemli birçok süreçte rol oynar [19, 26-28].

HCA I 8. kromozomun uzun kolunda lokalize olan 30kDa 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 HCAII 'ye göre beş kat daha fazla bulunmasına rağmen katalitik aktivitesi HCA II 'nin sadece %15 'i kadardır [29-34].

Yüksek göz içi basıncı ile ortaya çıkan glokom hastalığının tedavisinde HCA II izoenzimini inhibe edici klinik ajanlar olan sülfonamidler sıklıkla kullanılmaktadır. Çünkü humor aközün salgılanmasında karbonik anhidraz enziminin uyarıcı etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu humor aközün salgılanması azaltılarak göz içi basıncı kontrol altında tutabilir [35-41].

Ancak bu inhibitörler izoenzime spesifik olmadıklarından HCA II izoenzimi yanında eritrositlerdeki HCA I 'i de inhibe etmektedir. Buna bağlı olarak ortaya çıkan olumsuzlukları engellemek amacıyla hidrataz aktivitesinde azalma olmaksızın, sülfonamidlere daha az ilgi duyan mutant HCA I enzimlerinin elde edilmesi amaçlanmaktadır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda sülfonamidlere daha az ilgi duyan aynı zamanda hidrataz aktivitesini kaybetmemiş mutant HCA I enzimlerinin eldesi ve gen tedavisinde kullanımıyla inhibitörlerin HCA I enzimi üzerindeki etkilerinin azaltılması amaçlanmaktadır.

1.1 Karbonik Anhidraz Enzim Ailesi

1.1.1 Sınıflandırılması ve Dağılımı

Karbonik Anhidraz yapısında Zn^{+} iyonu bulunduran, bir metaloenzimdir. CO_2 molekülünün HCO_3^{-} iyonuna hidrasyonunu, geri dönüşümlü olarak katalizler .



$HCO_3^{-} + H^{+} \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow CO_2 + H_2O$ (CO_2 derişiminin düşük olduğu durumlarda) [7, 8]

İlk olarak sığır eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Günümüzde CA II ve CA 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 [3].

Günümüzde CA izoenzimleri α -, β -, γ -, δ -, ϵ - olmak üzere evrimsel olarak birbirinden bağımsız beş ayrı gen ailesi altında sınıflandırılmaktadır. Bu gen aileleri aminoasit dizilişleri açısından önemli sayılabilecek bir benzerlik göstermemektedir.

Çizelge 1.1 α -CA İzoenzimlerinin Hücre İçi Yerleşimleri ve Kinetik Özellikleri [10]

İzoenzim	Hücresel yerleşim	Aktivite
CA I	Sitoplazma	Düşük-Orta
CA II	Sitoplazma	Çok Yüksek
CA III	Sitoplazma	Düşük
CA IV	Membrana bağlı	Yüksek
CA VA	Mitokondri	Orta
CA VB	Mitokondri	Yüksek
CA VI	Salgı(hücre dışı)	Orta
CA VII	Sitoplazma	Yüksek
CA IX	Membranlar arası	Yüksek – Orta
CA XII	Membranlar arası	Düşük – Orta
CA XIII	Sitoplazma	Orta (fare)
CA XIV	Membranlar arası	Düşük (insan)
CA XV	Membrana bağlı	Düşük

β -CA izoenzimleri bakteriler, algler, bazı bitkiler ve *Archaea* 'da yaygın olarak bulunmaktadır [11-14, 17].

γ izoformu metan üreten bakterilerde bulunmuştur. δ ailesine ait izoform diatomelerde tanımlanmıştır. ϵ - gen ailesine ait CA izoenzimleri bakterilerde bazı kemolitroflarda ve karboksizoma sahip bazı siyanobakterilerde bulunur [5].

Memelilerde α -CA gen ailesine bağlı 13 farklı CA izoenzimi ve akatalitik olarak bulunan 3 farklı CA bağlantılı protein (CARP) tanımlanmıştır. CARP 'ler enzimin aktif bölgesinde yer alan histidin rezidülerinden bazılarını ya da enzim aktivitesi için gerekli olan Zn^{+2} iyonunu yapılarında bulundurmadıklarından dolayı aktif değildirler [4, 5, 7, 20, 24, 42]. Nükleusta bulunan NonO/p54^{nrb} formu henüz sınıflandırılmamıştır [7, 43]. Bu izoenzim aminoasit dizisi açısından bilinen diğer CA izoenzimlerine benzemez ama CA II ile benzer katalitik özelliklere sahiptir. CA izoenzimleri doku dağılımları, hücre içi yerleşimleri ve kinetik özellikleri bakımından farklılık gösterirler (Çizelge 1.1) [7, 24, 44].

1.1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları

Prokaryotlarda CA izoenzimleri; farklı dokular arasında CO_2 'in HCO_3^- iyonları şeklinde taşınması ve enzimatik reaksiyonlar için gerekli olan CO_2/HCO_3^- dengesinin kurulması gibi iki genel fonksiyona sahiptir [13]. Akuatik fotosentetik organizmalarda bu göreve ek olarak çevredeki CO_2 sınırlılığının üstesinden gelmek amacıyla CO_2 'yi derişik hale getirici bir mekanizma olarak rol oynar [45].

Omurgalıları da içeren yüksek organizmalarda, CA I, II, ve IV izoenzimleri asit-baz dengesinin sağlanmasında ve solunumda görevlidir [46, 47]. CA II izoenzimi osteoklastın farklılaşmasını sağlar ve kemik gelişiminde de rol oynar [42]. Doku ve organlardan elektrolitlerin salgılanmasında, koku ve tat almada da CA izoenzimleri görevlidir. Bu sayede gastrointestinal sistem çok yüksek ya da çok düşük pH koşullarından korunmuş olur [47, 48]. CA V gibi bazı izoenzimler hücre içi sinyal iletim sürecinde görev alır (Pankreasın β hücrelerinden insülin salgılanması). II ve V numaralı izoenzimler glukoneogenez için bikarbonat iyonu sağlarlar. Ayrıca yağ asitlerinin *de-novo* biyosentezi ve primidin bazı sentezi

sürecinde de rol oynarlar. Yapılan son çalışmalarda IX, XII, CARP VIII izoenzimlerinin tümörlerde fazlaca bulunduğu tespit edilmiştir [7].

Çizelge 1.2 α - CA İzoenzimleri Tarafından Katalizlenen Reaksiyonlar [4]

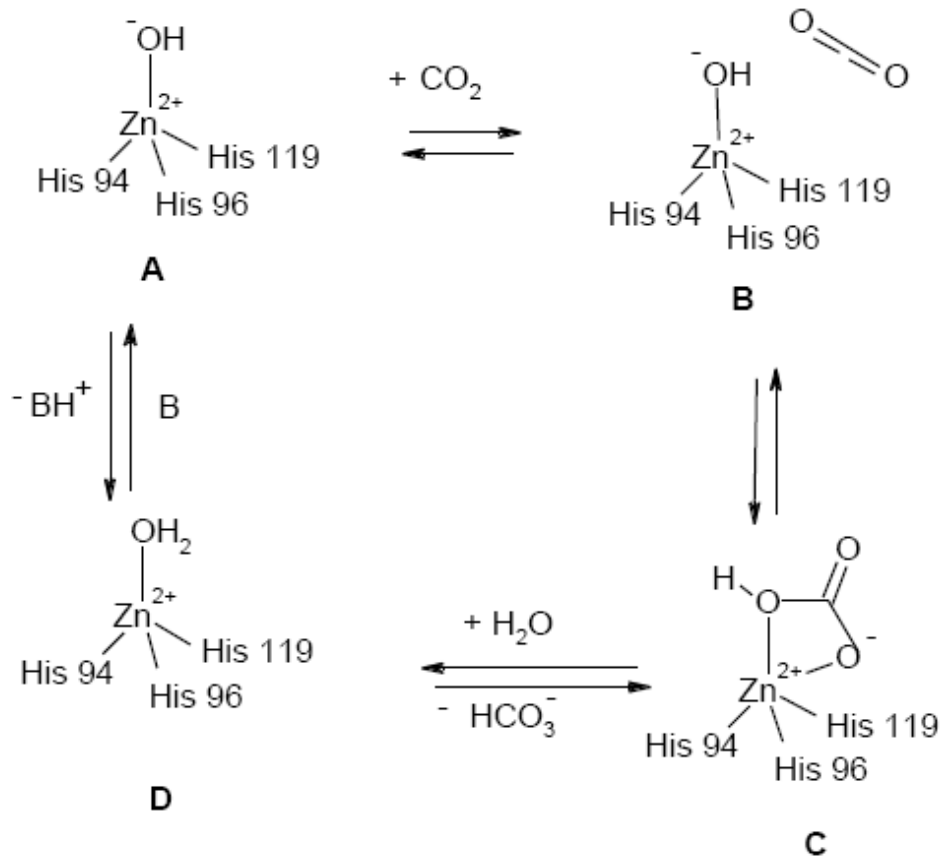
(1)	$O=C=O + H_2O \Leftrightarrow HCO_3^- + H^+$
(2)	$O=C=NH + H_2O \Leftrightarrow H_2NCOOH$
(3)	$HN=C=NH + H_2O \Leftrightarrow H_2NCONH_2$
(4)	$RCHO + H_2O \Leftrightarrow RCH(OH)_2$
(5)	$RCOOAr + H_2O \Leftrightarrow RCOOH + ArOH$
(6)	$RSO_3Ar + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + ArOH$
(7)	$ArOPO_3^{-2} + H_2O \Leftrightarrow HPO_3^{-2} + ArOH$
(8)	$ArF + H_2O \Leftrightarrow HF + ArOH$ (Ar = 2,4 dinitrofenil)
(9)	$PhCH_2OCOCl + H_2O \Leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
(10)	$RSO_2Cl + H_2O \Leftrightarrow RSO_3H + HCl$ (R=Me;Ph)

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 1.2, 4. reaksiyon) geri dönüşümlü olarak katalizler. Ayrıca karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizini ve hidrolitik reaksiyonları geri dönüşümlü olarak katalizler (Çizelge 1.2, 5-10. reaksiyonlar) [4].

1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Hidrataz Aktivitesinin Katalitik Mekanizması

Karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesinin mekanizması katalitik aktivitesi çok yüksek olan CA II izoenzimi üzerinde iyi bir şekilde aydınlatılmıştır.

Buna göre Karbonik Anhidrazın yapısal olarak iki önemli özelliği vardır; aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir $-OH$ grubu içermesi ve aktif bölge yakınındaki aminoasitlerin proton verici ve proton gradiyenti oluşturacak şekilde düzenlenmesidir. Karbonik Anhidrazın katalizlediği CO_2 -hidrataz mekanizması Şekil 1.1' de verilmiştir. Birinci basamakta Zn^{+2} iyonuna bağlı $-OH$ grubundaki bağ yapmayan elektron çiftinin CO_2 molekülüne nükleofilik atak yaparak karbon oksijen bağı oluşturması esnasında π - bağı açılmaktadır. Sonraki basamakta, negatif yüklü oksijen atomunun protonu ve su girişi ile HCO_3^- iyonu ayrılmaktadır. Son olarak bileşik H^+ iyonu kaybederek yeniden başlangıçtaki bileşiğe dönüşmektedir [35].



Şekil 1.1 Karbonik Anhidraz Enziminin CO_2 -Hidrataz Mekanizması [4]

Zn^{+2} iyonu kataliz reaksiyonu için gereklidir. X-Işını kristalografi çalışmaları bu metal iyonunun 15 Å derinlikteki aktif bölgenin tabanında üç histidin rezidüsü

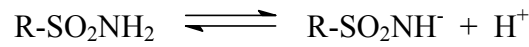
(His 94, His 96 and His 119) ve bir su molekülü/hidroksit iyonu ile koordineli olarak bulunduğunu göstermiştir. Bu su molekülü Thr199 rezidüsünün hidroksil kısmı ile hidrojen bağı yapmaktadır. Bu etkileşimler sonucu çinko bağı su molekülünün nükleofilitesi artar ve molekül uygun yerdeki CO₂'ye nükleofilik atak yapar. Zn⁺² iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur. Bu güçlü nükleofil, hidrofobik cep ve çevresinden CO₂ molekülüne saldırır ve Zn⁺² iyonu ile koordine olmuş bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Sonraki basamakta, HCO₃⁻ iyonu bir su molekülüyle yer değiştirerek çözeltiliye geçer. Zn⁺² iyonuna su molekülü bağlanmasıyla enzim katalitik olarak inaktif asit formuna döner [4].

1.1.4 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve İnhibisyon Mekanizması

Karbonik Anhidraz inhibitörlerini iki temel sınıfta incelemek mümkündür;

- (i) metallerle kompleks yapan inorganik anyonlar (siyanid, siyanad, tiyosiyanat, azid, hidrojen sülfid gibi) ve
- (ii) sülfonamidlerdir [4].

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler R-SO₂NH₂ kimyasal yapısına sahiptir. Burada R, genellikle aromatik veya heteroaromatik halka sistemleridir. CA-II için K_i sabitleri 10⁻⁵ ile 10⁻¹⁰ arasında değişmektedir.



Sülfonamidlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi, kolaylıkla iyonik yapı kazanabilmeleridir. Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidler içerdikleri bu hidrofilik bölgeye ek olarak, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere de sahiptirler. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle R-SO₂NH⁻ bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn⁺² iyonuna iyonik bağlanmasıyla olur. Daha sonra hidrofobik etkileşimlerle inhibitörün enzime bağlanmasıyla tamamlanır.

Sülfonamidlerin CA enzimine 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 [49].

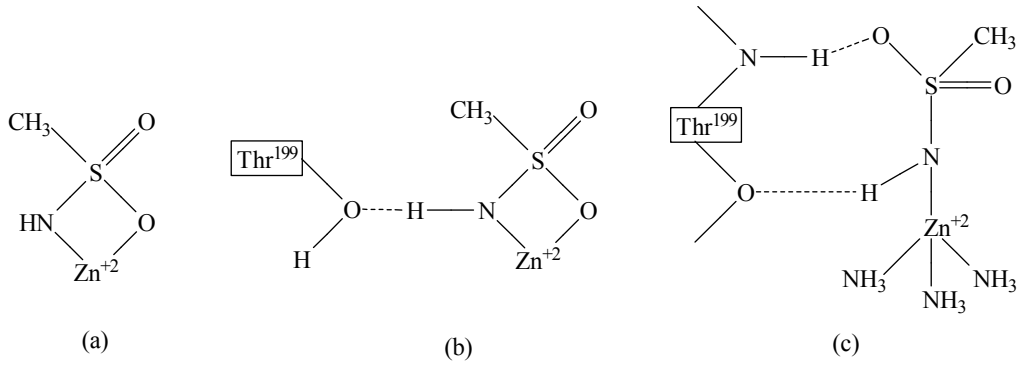
Çizelge 1.3 Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Sülfonamidlere İlgisi [4]

İzoenzim	Katalitik aktivite (Hidrataz)	Sülfonamidlere ilgi
CA I	Düşük	Orta
CA II	Yüksek	Çok yüksek
CA III	Çok düşük	Çok düşük
CA IV	Yüksek	Yüksek
CA V	Orta -yüksek	Yüksek
CA VI	Orta	Orta –düşük
CA VII	Yüksek	Çok Yüksek
CA VIII	Akatalitik	-
CA IX	Yüksek	Yüksek
CARP X	Akatalitik	-
CARP XI	Akatalitik	-
CA XII	Aktif	Bilinmiyor
CA XIII	Yüksek	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Bilinmiyor

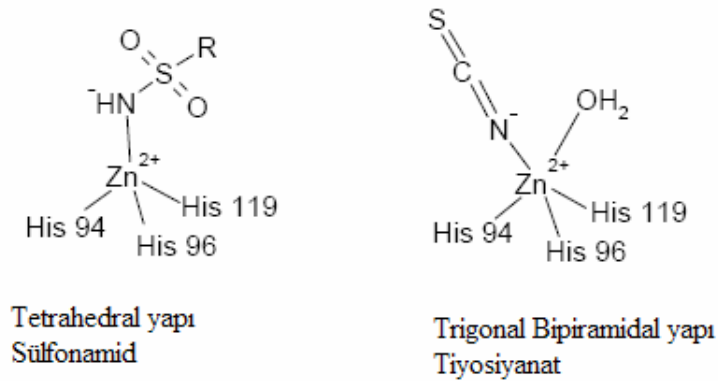
İnorganik anyonlarda yalnızca hidrofilik bağlanma söz konusu olduğundan CA enzimi üzerine sülfonamidler kadar güçlü inhibitör görevi üstlenemezler.

Sülfonamidlerin CA enzimine bağlanması konusundaki teorik bir çalışmada, ilk olarak Zn^{+2} tek başına azot ve oksijen atomlarının ile koordine olabildiği gösterilmektedir (Şekil 1.2 a). İkinci olarak, aktif bölgede bulunan tirozin (Thr-199) ile sülfonamid molekülündeki $-NH$ grubu arasında oluşan hidrojen bağı yapıyı daha kararlı hale getirmektedir (Şekil 1.2 b). Üçüncü olarak sülfonamidin oksijeni, Thr-

199 'un -NH grubu ile hidrojen bağı yaparak yapıyı en kararlı hale getirmektedir (Şekil 1.2 c). Elde edilen sonuçlar, sülfonamid türevlerinin enzim ile farklı bir şekilde Van der Waals etkileşmelerinden dolayı K_i 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 1.3). Anyonlar ise hem metal iyonun tetrahedral geometrisinde, hem de siyanat örneğinde görüldüğü gibi trigonal-bipiramidal yapıda bağlanabilirler (Şekil 1.3) [49].



Şekil 1.2 Sülfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzimine Bağlanması [49]



Şekil 1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamid ve Anyonlarla İnhibisyonu [6]

1.1.5. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Hastalıklarla İlişkisi

Karbonik Anhidrazın sülfonilamid ile inhibisyonunun Mann ve Keilin ile keşfi bazı önemli ilaçların dizayn edilebilmesini sağlamıştır. İnhibitör özelliği taşıyan sülfonamidlerden göz tansiyonu, tiroid, nörolojik ve nöromusküler düzensizliklerin tedavisinde yararlanılmaktadır. Ayrıca sülfonamidler diüretik, anti-epileptik, anti-ülser ve antitümör ajanı olarakta kullanılmaktadır [4].

α -CA ailesine ait bazı izoenzimlerin aktivasyonunun sağlanmasıyla alzheimer, yaşlanma, hafıza kaybı ve kesikli öğrenme gibi hastalıklar için yeni bir tedavi yaklaşımının oluşturulabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yaşlılarda ve alzheimer hastalarında HCA I enzimi ekspresyon seviyesinin düşük olduğu bulunmuştur [50].

Hipertiroidizm görülen kişilerde tiroid hormonu artışı ile bağlantılı olarak Karbonik Anhidraz I enzimi seviyesinde de artış tespit edilmiştir [51].

Ayrıca glokom hastalığında CA enzimlerinin etkili bir şekilde rol oynadığı bulunmuştur. Bu hastalıkta CA enzimlerinin tam etki mekanizması aydınlatılmıştır. Bu enzimlerin diğer hastalıklarla ilişkisine örnek olması açısından glokom hastalığında CA enziminin etki mekanizması aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

Göz içi basıncının tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (humor aköz). Humor aköz, göz içi basıncının sağlanmasında, lens ve korneanın beslenme ve metabolik faaliyetlerinde büyük rol oynamaktadır. Metabolik materyal açısından zengin olan humor aköz yüksek miktarda Na^+ ve HCO_3^- ile birlikte Cl^- , laktat ve askorbat içerir. Glukoz miktarı sadece kornea ve lens metabolizması için gerekli olduğundan plazmadakinden daha azdır [38].

Aköz boşaltım kanallarının tıkanması ile humor aköz arka kısımda birikmeye başlar. Artan osmotik basıncı azaltmak amacıyla plazmadan arka kamaraya su salgılanmaya başlar. Osmotik basınç dengeye gelirken, göz küresinin çeperlerine

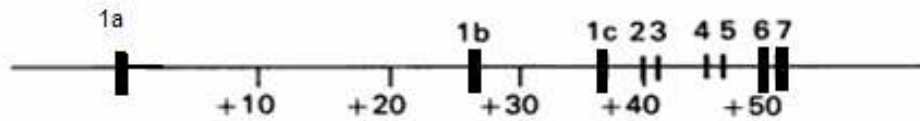
uygulanan fiziksel basınç (göz içi basıncı) artar. Basınç yüksek değerlere ulaştığında göz küresinin arkasında bulunan optik sinirlerde atrofi meydana gelir ve görüntü kayıpları başlar [38].

Humor aközün salgılanmasında karbonik anhidraz enziminin uyarıcı etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu ile korus siliarenin salgı aktivitesi 2/3 oranında azalır, göz içerisindeki osmotik basınç ve dolayısıyla göz içi basıncı kontrol altında tutulabilir. Bu nedenden dolayı karbonik anhidraz inhibitörleri 40 yılı aşkın bir süredir glokom hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [38].

1.1.6 Karbonik Anhidraz I İzoenzimi

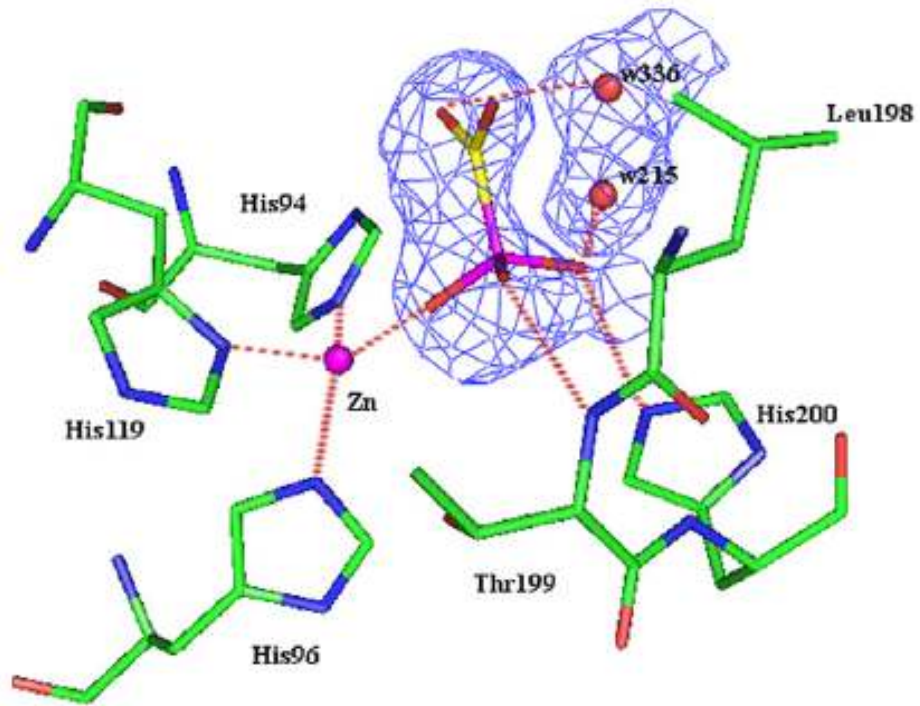
Karbonik Anhidraz I, α -CA ailesine bağlı 30kDa büyüklüğünde sitoplazmik bir izoenzimidir. Eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir. Ayrıca kapiler ve korneal endotelyumda, göz lensinde, Langerhans adacıklarında, fetal membranda ve plasentada bulunur. Gastrointestinal sistemde ise özefagus epiteli, ince bağırsak, kolon, pankreatik langerhans adacıklarının A hücrelerinde ve ince bağırsağın kriptal enterositlerinde bulunur [7].

İnsan Karbonik Anhidraz I geni 8. kromozomun uzun kolu üzerinde lokalize olmuştur [29]. 50kb büyüklüğündeki genin promotörüyle kodlama yapan bölgesi arasında yaklaşık 36kb'lık bir intron bulunmaktadır. Bu intron içerisinde bazen 54 bç 'lik kodlama yapmayan bir ekzon bulunabilmektedir. Şekil 1.4 'te insan karbonik anhidraz I genine ait diyagram görülmektedir. 1a, 1b, 1c, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ile gösterilen kısımlar gene ait ekzon bölgeleridir [29, 31].



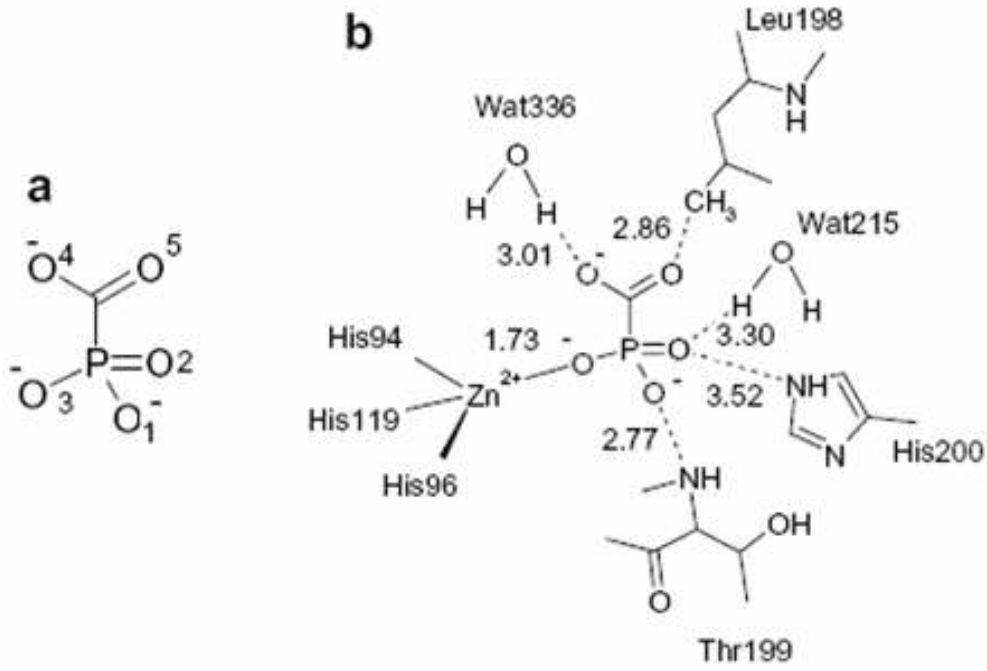
Şekil 1.4 İnsan Karbonik Anhidraz I Geni Diyagramı [29, 31]

CA I ve CA II'nin üç boyutlu yapısına bakıldığında izoenzimlerinin aktif bölgeleri arasında bazı farklılıklar mevcuttur (Şekil 1.5). Daha önce de değinildiği gibi aktif bölgede yer alan ve çinko iyonuna bağlanan histidin rezidülerine (His 94, His 96 ve His 119) ek olarak CA I izoenziminde His 67, His 200 ve His 243 rezidüleri; CA II izoenziminde ise sadece 64. pozisyonda bulunan tek bir histidin rezidüsü katalizde rol oynar [4].



Şekil 1.5 Karbonik Anhidraz I Enzimi Aktif Bölgesi [50]

Önemli bir diğer farklılık CA II enzimi aktif bölge yakınında His 64, His 4, (Bu iki rezidü kristal yapıya esneklik sağlar) His 3, His 10, His 15 ve His 17 rezidülerinden oluşan bir histidin kümesi bulundurur. Bu küme CA I izoenziminde yoktur. CA I ve CA II izoenzimlerinin iki temel sınıf inhibitöre olan afiniteleri farklıdır. CA I enziminin siyanid, tiyosiyanat, siyanat, ve halidler gibi anyonlara olan afinitesi daha fazladır. CA II enziminin ise sülfonamidlere olan ilgisi fazladır. Bunun sonucu olarak CA I izoenzimine daha fazla afinite gösteren sülfonamid inhibitörlerinin tasarlanması oldukça güçtür [4].



Şekil 1.6 HCA I Enziminin Aktif Bölgesi ve İnhibörle Etkileşimi [4]

1.1.7 Karbonik Anhidraz I Geninde Yönlendirilmiş Mutageniz

hCA I geninin katalitik özelliklerini ve inhibisyon mekanizmasını açıklamaya yönelik yönlendirilmiş mutageniz çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

67. pozisyonda bulunan histidin aminoasiti yönlendirilmiş mutageniz yöntemiyle ile Arg aminoasiti ile değiştirilmiştir. Mutant proteinin esteraz aktivitesinde artış gözlenmiştir [52].

Yapılan diğer bir çalışmada hCA I geninin aktif bölgesinde bulunan Val62, His67 ve His200 aminoasitleri yönlendirilmiş mutagenizle CA II 'deki karşılıkları olan Asn62, Asn67 ve Thr200 aminoasitleri ile değiştirilerek Asn62 ve Asn67 ikili ve üçlü mutantlarını içeren alternatifler çalışılmıştır. Tekli mutasyonların anyon bağlama üzerindeki etkisinin çok az olduğu ve Val62 ve His67 aminoasitlerinin aktif bölgedeki proton mekiği grubu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. CA I 'deki His200 aminoasitinin enzim-bikarbonat kompleksinin ömrünü uzattığı ve katalitik

grubun pKa değerini arttırdığı tespit edilmiştir. Yalnızca üçlü mutantın CA II 'dekine benzer anyon bağlama özelliğine sahip olduğu belirtilmiştir [53].

Thr199Val, Thr199Cys, Thr199Ser, Glu106Gln, Glu106Ile, His107Val, Tyr7Trp, Glu117Gln aminoasitlerinde belirtilen bölgelerde yönlendirilmiş mutagenез çalışılmış ve esteraz aktiviteleri ölçülmüştür. Glu 117Gln ve His107Val mutant proteinlerinin *E.coli* 'de ekspresyonu sonucu elde edilen proteinlerde agregasyon oluşumu gözlenmiştir. Bunun nedeninin proteinlerin katlanmasında meydana gelen bir hata olduğu düşünülmektedir. Thr199Val, Glu106Ile, Glu106Gln mutasyonları şiddetli şekilde azalan enzim aktivitesine sahip çözünebilir proteinler oluşturmuşlardır. Tyr7Trp mutantının aktivitesinde çok az bir değişiklik gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda sadece Thr 199 ve Glu106 aminoasitlerinin HCA I enziminin aktivitesi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir [8].

1.2 Mutagenез Teknikleri

Rekombinant DNA teknolojisi, biyolojik sistemlerdeki kısıtlamaları ortadan kaldırıp canlı sistemlerde uygulanması imkansız ya da güç olan tekniklerin *in-vitro* 'da çalışılabilmesini sağlamıştır.

DNA molekülünü mutasyona uğratmak amacıyla birçok teknik geliştirilmiştir. Bu teknikler rastgele mutagenез teknikleri ve yönlendirilmiş mutagenез teknikleri olarak iki grupta incelenebilir.

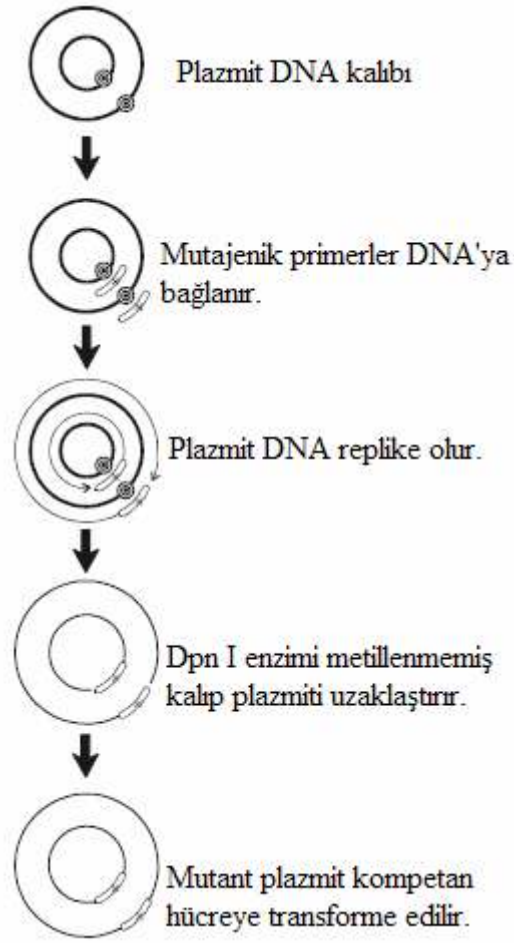
Yapılan ilk çalışmalarda kromozomal DNA 'da X-Işınları ve kimyasal teknikler kullanılarak rastgele mutasyonların oluşturulması üzerine odaklanılmıştır. Bu rastgele mutasyon metodları klasik genetik çalışmaları için önemli bir gelişme olmasına karşın spesifik bir bölge üzerinde mutasyonların oluşturulamaması nedeniyle sınırlı kalmıştır. Plazmit vektörlerin ortaya çıkışıyla birlikte DNA molekülü *in-vitro* olarak manüple edilmeye başlanmış bu gelişme DNA molekülünde istenilen spesifik bölgelerin ayrı olarak çalışılabilmesine olanak sağlamıştır. Mutagenез bu tekniklerden biridir [54].

Literatürde mutagenез amaçlı birçok metot bulunmaktadır. Bunlardan *dut* ve *ung* metodu Kunkel tarafından geliştirilmiş ilk oligonükleotid mutagenез yöntemidir. *dut* ve *ung* metodunda klonlama vektörü *dut* ve *ung* geninde mutasyonlar içeren *E.coli* hücrelerine aktarılarak büyütülür. *Dut* geni, dUTP 'yi, dUMP ve pirofosfata dönüştüren dUTPaz enzimini kodlamaktadır. *Ung* geni ise DNA 'dan urasil bazını uzaklaştıran urasil N-glikozilaz enzimini kodlamaktadır. Yönlendirilmiş mutagenезde Urasil içeren bir kalıp kullanılır. Böylece oligonükleotid primerler bağlanıp komplementer DNA sentezlendikten sonra *dut+* ve *ung+* *E.coli* soyuna transforme edilir. Orijinal zincirin yıkımı gerçekleşirken komplementer zincir replike olur [55].

Günümüzde ek klonlama gerektirmeyen başlangıç materyali olarak tek zincirli DNA'ya gereksinim duymayan yeni stratejiler geliştirilmiştir.

Oligonükleotid-Yönlendirilmiş Mutagenез tekniği bunlardan biridir. Temel basamakları aşağıda açıklanmıştır.

PCR yöntemine dayalı olarak ilgili mutasyonu taşıyan sentetik oligonükleotid primerler plazmit DNA 'ya bağlanır ve plazmit replike olur. Mutant diziyi taşıyan plazmitler ile yabancı diziyi taşıyan plazmitler Dpn I enzimi ile muamele edilir. Metillenmiş DNA'ya spesifik olan DpnI enzimi metillenmiş yabancı tip plazmiti keserek uzaklaştırır. Mutant plazmit önceden kompetan haline getirilmiş konakçı hücreye, replikasyon sonucunda meydana gelmiş olan çentiklerin tamamlanması için transforme edilir (Şekil 1.7) [56].



Şekil 1.7 Yönlendirilmiş Mutagenizasyon Basamakları [56]

In-vitro oligonükleotid yönlendirilmiş mutagenizasyon proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının aydınlatılmasında, gen ekspresyonu, vektör ve enzim aktivitelerinin modifiye edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

1.3 Rekombinant Proteinin Ekspresyonu

1.3.1 Prokaryotik Ekspresyon Sistemleri

Rekombinant proteinlerin ekspresyonunda prokaryotik ve ökaryotik ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Prokaryotik ekspresyon sistemi olarak en yaygın olarak *E.coli* ve *B.subtilis* tercih edilmektedir [57].

İlk olarak Itakura ve arkadaşları tarafından bir memeli peptid hormonu olan somatostatinin *E.coli*' de ekspre edilmesiyle yabancı bir genin prokaryotik hücrelerde *in-vitro* olarak üretilebileceği anlaşıldı [57]. Günümüzde gram (-) bir bakteri olan *E.coli* rekombinant proteinlerin üretiminde sıklıkla tercih edilmektedir. Bunun nedeni üretiminin ekonomik olması, hızlı bir şekilde çoğalabilmesi ve genetiğinin iyi aydınlatılmış olmasıdır. *E.coli* toksik rekombinant proteinlerin ekspresyonu için de oldukça caziptir [57].

E.coli'nin BL-21(DE3) Kodon Plus soyu rekombinant protein ekspresyonu için uygundur. Zararlı proteazları içermez, genomunda T7 RNA polimeraz geni bulundurur. IPTG ile indüklenebilen bir sistemdir [58].

B.subtilis, *E.coli* 'ye alternatif olarak kullanılan bir ekspresyon sistemidir. Toprakta bulunan bir bakteri olan *B.subtilis* çok sayıda avantajlara sahiptir. İlk olarak *B.subtilis*, *E.coli*'nin yaygın bir yan ürünü olan, insan ve hayvanlarda bazı dejeneratif düzensizliklere neden olan lipopolisakkaritleri üretmez. İkinci olarak genetik yapısından dolayı plazmit ve bakteriyofajlarla kolay transforme olabilmektedir. Üçüncü olarak iyi işlenmiş proteinlerini medyuma verebilmektedir bu da daha sonraki basamaklarda saflaştırmayı kolaylaştırmaktadır. Son olarak *B.subtilis* ucuz ve kolay bir şekilde yoğun olarak üretilebilmektedir ayrıca bu bakterinin büyüme ve fizyolojik karakterleri iyi bir şekilde çalışılmıştır.

B.subtilis dışında *E.coli*'ye alternatif olarak *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) da kullanılmaktadır. Bu bakteri *E.coli* 'ye bağlı proteinlerin ekspresyonunda meydana gelen bazı olumsuzlukların üstesinden gelebilmektedir (inklüzyon cisimciklerinin oluşumu). Ayrıca son dönemde *Pseudomonas* 'a dayalı ekspresyon sistemleri geliştirilmiştir [57].

1.3.2 Ökaryotik Ekspresyon Sistemleri

1.3.2.1 Maya

S. cerevisiae rekombinant genlerin ekspre edilebilmesi amacıyla uzun bir süredir kullanılmaktadır. Moleküler, genetik ve biyokimyasal özellikler bakımından ökaryotlara büyük benzerlik gösterdiği için önem taşımaktadır. Özellikle endüstriyel fermentasyonda kullanılmaktadır. *Pichia pastoris* ve *S. pombe* son dönemlerde, *S. cerevisiae*'ya alternatif olarak kullanılmaktadır [57].

Ucuz ve kolay kültüre edilebilmesinin yanısıra, mayanın zenginleştirilmiş endomembran sistemi hücre içinde sentezlenen proteinlerin hücre dışına salgılanmasını sağlayabilmektedir [57].

Tek hücreli bir ökaryot olan maya fonksiyonel açıdan gerekli posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmektedir. Memeli hücrelerine göre manuplasyonu ve kültürü daha kolay yapılabilir [57].

1.3.2.2 Filamentli Funguslar

Başka bir sistem olan filamentli funguslar da maya gibi rekombinant proteinlerin ticari üretiminde kullanılmaktadır. Filamentli funguslar özellikle salgılanan proteinlerin oldukça büyük miktarlarda üretilmesini sağlar. *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*'de rekombinant proteinlerin ekspresyonu oldukça sınırlıdır.

Maya ile karşılaştırıldığında özellikle hücre dışına salgılanan proteinlerin mekanizması yeterli şekilde aydınlatılamamıştır [57].

1.3.2.3 Böcek/Baculovirüs

Baculovirüs oldukça spesifik bir konakçıya gerek duyduğundan infeksiyonu böceklerle sınırlıdır. Böceklerin ya da böcek hücre hatlarının baculovirüs ile infekte edilmesiyle birçok rekombinant genin ekspresyonu sağlanabilmektedir. Bu ekspresyon sisteminin en çarpıcı özelliği ökaryotik proteinleri üretebilmesidir. Özellikle rekombinant glikoprotein üretimi için mükemmel bir sistemdir. Aşı üretimi ve gen terapisinde kullanılan birçok protein bu yolla üretilebilmektedir [57].

Bununla birlikte bu sistemin bazı dezavantajları da mevcuttur. Örneğin virüs ile infekte edilen konakçı hücre eninde sonunda öldüğünden rekombinant genin ekspresyonu sürekli olarak yapılamamaktadır. Bu nedenle bu sistem sürekli fermentasyon kapasitesi bakımından prokaryotik ve maya ekspresyon sistemlerinden daha ilkedir [57].

1.3.2.4 Memeli Hücreleri

Memeli hücre ekspresyon sistemleri yukarıda değinilen diğer bütün ekspresyon sistemlerinden daha avantajlıdır. Özellikle ökaryotik proteinlerde sinyal sentezi seviyesi ve sürecini arttıırırlar.

Böcek/Baculovirüs sisteminde olduğu gibi transfekte edilmiş memeli hücresi yabancı DNA molekülünün sınırsız replikasyonuna bağlı olarak ölür. İlgilenilen ürünün sürekli olarak ekspresyonunun sağlanması için ilgilenilen gen konakçı hücrenin kromozomuna entegre olmalıdır. Bu sistem reseptör, sitokin ve enzimlerin fonksiyonunun artmasını sağlayan salgı ve hücre içi proteinlerinin ekspresyonu için uygundur.

Yüksek maliyeti, komplike teknolojisi ve kontaminasyon riski ile yüksek ölçekli endüstriyel üretim için bir darboğaz teşkil etmektedir [57].

1.3.2.5 Transgenik Hayvan ve Bitki Ekspresyon Sistemleri

Hayvan ekspresyon sistemleri daha önce değinilen ekspresyon sistemlerine göre daha uzun bir üretim periyodu ve yüksek maliyet gerektirir buna karşılık ürün miktarı oldukça düşüktür. Bu nedenle sistem temelde proteinlerin medikal amaçlı olarak ekspresyonunu hedefler.

Bitki ekspresyon sistemleri regülatör sekanslar kullanılarak ilgili proteinin bitkinin istenilen kısmında ve istenilen gelişim basamaklarında ekspre edilebilmesine olanak sağlar. Ayrıca bitkiler bir fermantör olmaksızın kolayca yetiştirilebilmektedir. İlgili genlerin tohumda ekspre edilmesi ile daha kararlı, hazır ve kolayca saflaştırılabilen proteinler elde edilebilmektedir. Bu sistem ayrıca immunojenik proteinlerin ekspre edilmesi amacıyla da kullanılmaktadır [57].

1.3.3 Ekspresyon Vektörünün Seçimi

Rekombinant proteinlerin ekspresyonunda sentezlenen proteinlerin kararsız ya da inaktif olması gibi durumlarla karşılaşılabilir. Bu durumda seçilen ekspresyon sistemi, konakçı ve vektör seçimi dahil pek çok parametrenin göz önünde bulundurulması gerekmektedir [59, 60].

Plazmitler bakteri içerisinde bulunan otonom olarak replike olabilen çift zincirli ekstrakromozomal DNA parçalarıdır. Bir plazmitin klonlama amaçlı kullanılabilmesi için diğer hücreler arasından seçilebilmesini sağlayacak bir direnç geni taşıması ve bulunduğu ortamdan ayrı olarak izole edilebilmesi gereklidir. Ayrıca belirli sayıda restriksiyon kesim bölgesi de içermelidir. Temelde bir plazmit; lac I geni, T7 RNA polimeraza özgü bir T7 promotörü, lac operatörü, polilinker bölgesi, fl orijini, antibiyotiğe direnç geni ve ColE1 orijini gibi önemli birçok bileşeni içerir [59, 60].

Rekombinant protein ekspresyonunda, ColE1 ve p51A replikonları ile çoğaltılan plazmit vektörler kullanılır. Plazmitin kopya sayısı replikasyon orijini

tarafından kontrol edilir. ColE1 replikonu, kopya sayısı 15-20 olan pBR322 'den veya kopya sayısı 500-700 olan pUC plasmid ailelerinden köken alır. p51A replikonu ise kopya sayısı 10-12 olan pACYC184 plazmitinden köken alır [58, 61].

1.3.4 Rekombinant Proteinin Kararlılığı

Hücreler lizise uğratıldıklarında hücre zarındaki proteazlar sitoplazmik proteinleri degrades eder. *E.coli* 'nin bazı Proteaz mutant içeren soyları bu problemin üstesinden gelmenin en iyi yoludur. Proteaz inhibitörleri de yararlı olabilir ancak inhibitörü bilinmeyen birçok proteaz mevcuttur. Proteazların etkilerini azaltmanın bir diğer yolu da hücre lizatını seri bir şekilde kromatografi materyaline tatbik etmektir. Eğer protein ekspresyon sırasında degrades oluyorsa indüklenme zamanı daha kısa tutulmalıdır (Genellikle proteinler bir gece boyunca indüklendiklerinde degrades olurlar) [62].

1.3.5 Nadir Kodon Engeli

Aminoasitlerin çoğu birden fazla kodon tarafından kodlanır. Her organizmanın varolan 61 kodonu kullanma eğilimi farklıdır. Hücredeki tRNA populasyonu, mRNA populasyonunun kodon eğilimini iyi bir şekilde yansıtır. Hedef genin *E.coli* 'de ekspresyonu başlayınca kodon kullanımındaki farklılık populasyonda az olan ya da bulunmayan tRNA 'ya olan ihtiyaçtan dolayı translasyona engel olabilir. Yetersiz tRNA havuzu, translasyonun hızının yavaşlamasına, erken sonlanmasına, çerçeve kaymasına ve mistranslasyona yol açabilir. pET sistem ve diğer *E.coli* ekspresyon sistemlerinde hedef proteinin sentezi nadir kodona bağlı olarak tamamen engellenmez. Sadece ekspresyon seviyesi düşük olabilir [63].

Ekspre edilen proteinle birlikte aynı soydan gelen tRNA genlerinin de ekspresyonunun yapılması ile bu problem pratik olarak çözülebilir [58].

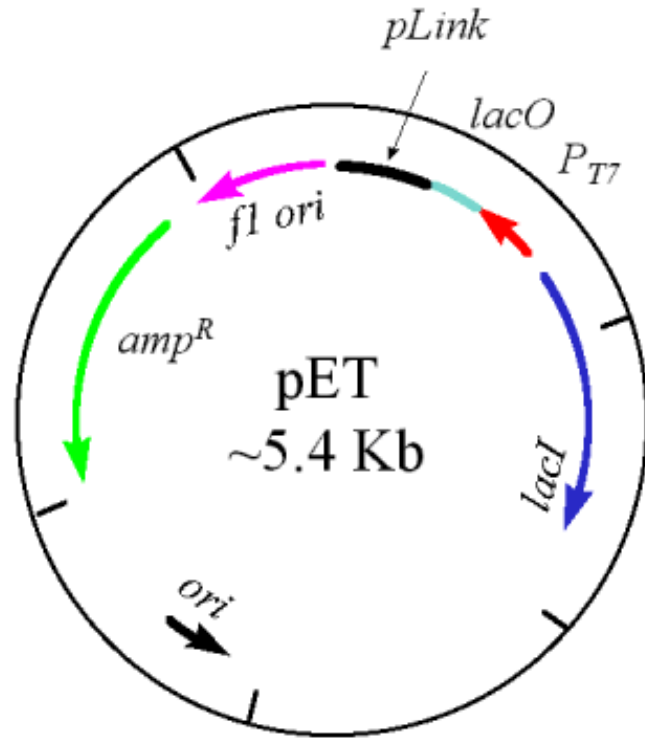
1.3.6 İnküzyon Cisimciklerinin Oluşması

Rekombinant proteinin yüksek seviyede ekspresyonu *E.coli* 'de bir stres cevabı oluşturabilir. Isı şoku, aminoasit tükenmesi veya açlığı gibi çevresel koşullar stres cevaplarının oluşmasına neden olur [58].

Protein aktivitesi tam üç boyutlu yapı katlanmalarına bağlıdır. Isı şoku gibi stres koşulları *in vivo* 'da protein katlanmalarını bozar ve inküzyon cisimleri olarak adlandırılan şekilsiz protein granüllerinin oluşumuna neden olur. İnküzyon cisimleri, rekombinant proteinin yüksek oranda ekspresyonu sırasında, stres cevabı olarak oluşur. Rekombinant ekspresyon sisteminde inküzyon cisimlerinin oluşumu *in vivo* 'da protein kümeleşmesi ve çözülmesi arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşur. Rekombinant sistemdeki protein kümeleşmesi, sıcaklık, ekspresyon oranı, *E.coli* metabolizması, çözünür kuyruk teknolojisi gibi hedef protein mühendisliği ve şaperon kodlayan plasmid ile birlikte ekspresyon gibi parametrelerle azaltılabilir [58, 63-67].

1.3.7 pET Ekspresyon Vektör Sistemi

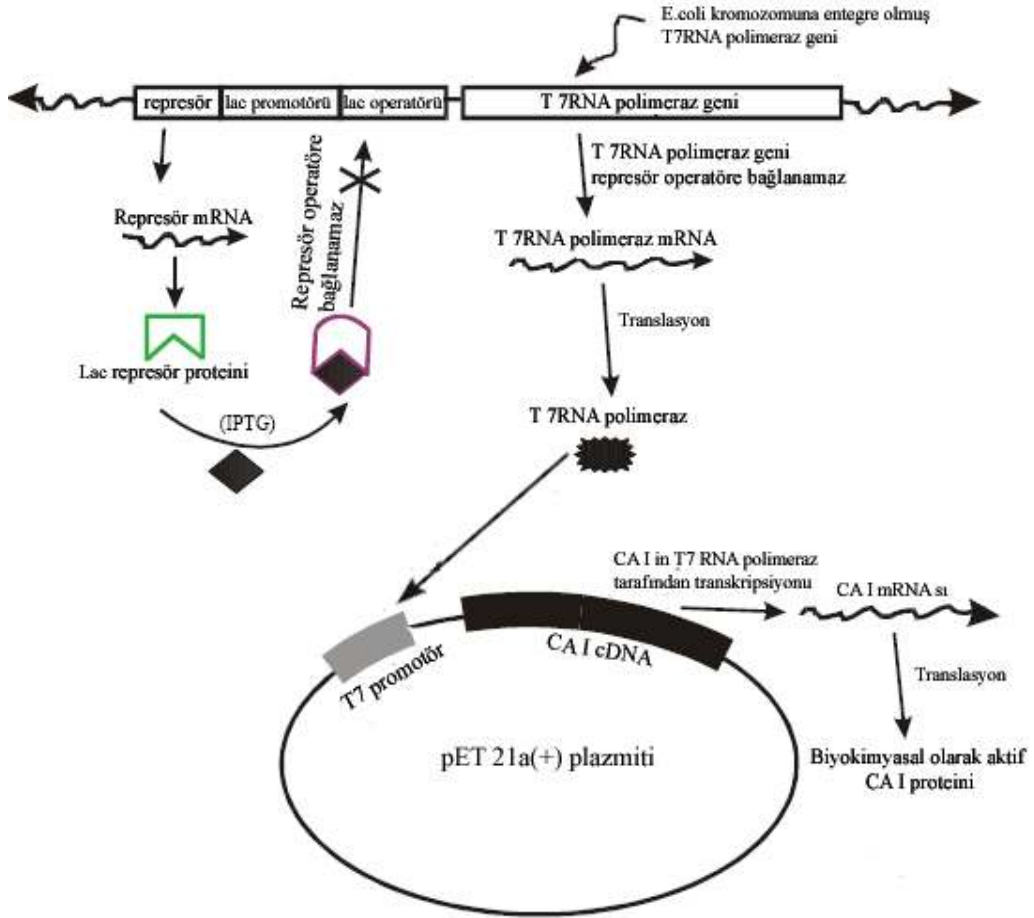
pET vektör sistemi rekombinant proteinlerin klonlanması ve *E.coli* 'de ekspresyonu için geliştirilmiş yeni ve güçlü bir sistemdir. İstenilen proteinin büyük miktarda ve çabuk olarak üretilebilmesini sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. pET vektör sistemi T7 bakteriyofajının güçlü transkripsiyon ve translasyon sinyalleri kontrolünde proteinlerin ekspre olmasını sağlar. Ekspresyon konuk hücrenin T7 RNA polimerazı ile de teşvik edilir [68].



Şekil 1.8 pET Ekspresyon Vektör Sistemi [68]

pET vektör sistemi, ekspresyona yeni opsiyonlar sunacak şekilde sürekli gelişmektedir. Bugün ticari olarak 42 farklı pET vektör sistemi bulunmaktadır [68].

Rekombinant molekülün ekspresyonunda etkili olan mekanizma şöyledir;



Şekil 1.9 Rekombinant Proteinin Ekspresyonu[69]

LacI geni bir baskılayıcı molekül oluşturarak yapısal genlerin transkripsiyonunu regüle eder. Baskılayıcı molekül allosterik yapıdadır yani başka bir moleküle tersinir olarak bağlanır. Hem üç boyutlu yapısı hem de kimyasal aktivitesi değişir.

Baskılayıcı molekül normal olarak operatör bölgenin DNA dizisi ile ilişki kurmaktadır. Bu durumda, RNA polimerazın işlevi engellenir ve yapısal genlerin transkripsiyonu baskılanır.

Ortamda IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) varsa baskılayıcıya bağlanır ve baskılayıcı allosterik konformasyonel değişikliğe uğrar. Bu değişiklik sonucu baskılayıcının bağlanma bölgesi değiştiği için, operatör bölgeye bağlanamaz.

Böylece RNA polimeraz yapısal genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir ve laktöz metabolizması için gerekli olan enzimler sentezlenir [69, 70].

1.4 Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Bir biyolojik ligand (veya onun sentetik bir analogu) ile saflaştırılmak istenen molekül üzerindeki komplementer bağlama bölgesi arasındaki spesifik etkileşimi esas alan, güçlü bir protein saflaştırma tekniğidir. Biyolojik ligandlar arasında; substrat, koenzim, hormon, antikor, nükleik asit gibi yapılar örnek olarak verilebilir.

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 [38].

Afinite kromatografisi ilk defa 1910 yılında amilazın çözünmeyen nişastaya adsorpsiyonu sonucu izolasyonunda kullanılmıştır. Ancak ligandların kovalent olarak bağlanabileceği ve dayanıklı katı destek materyallerinin (matriks) bulunmaması nedeniyle bu tekniğin yaygın halde uygulanması 1967'den sonra gerçekleşebilmiştir. Bu tarihte primer amino grubuna sahip bileşiklerin siyanojen bromür (CNBr) ile aktifleştirilmiş olan polisakkarit matriks üzerine kovalent bağlanabileceği gösterilmiştir [38].

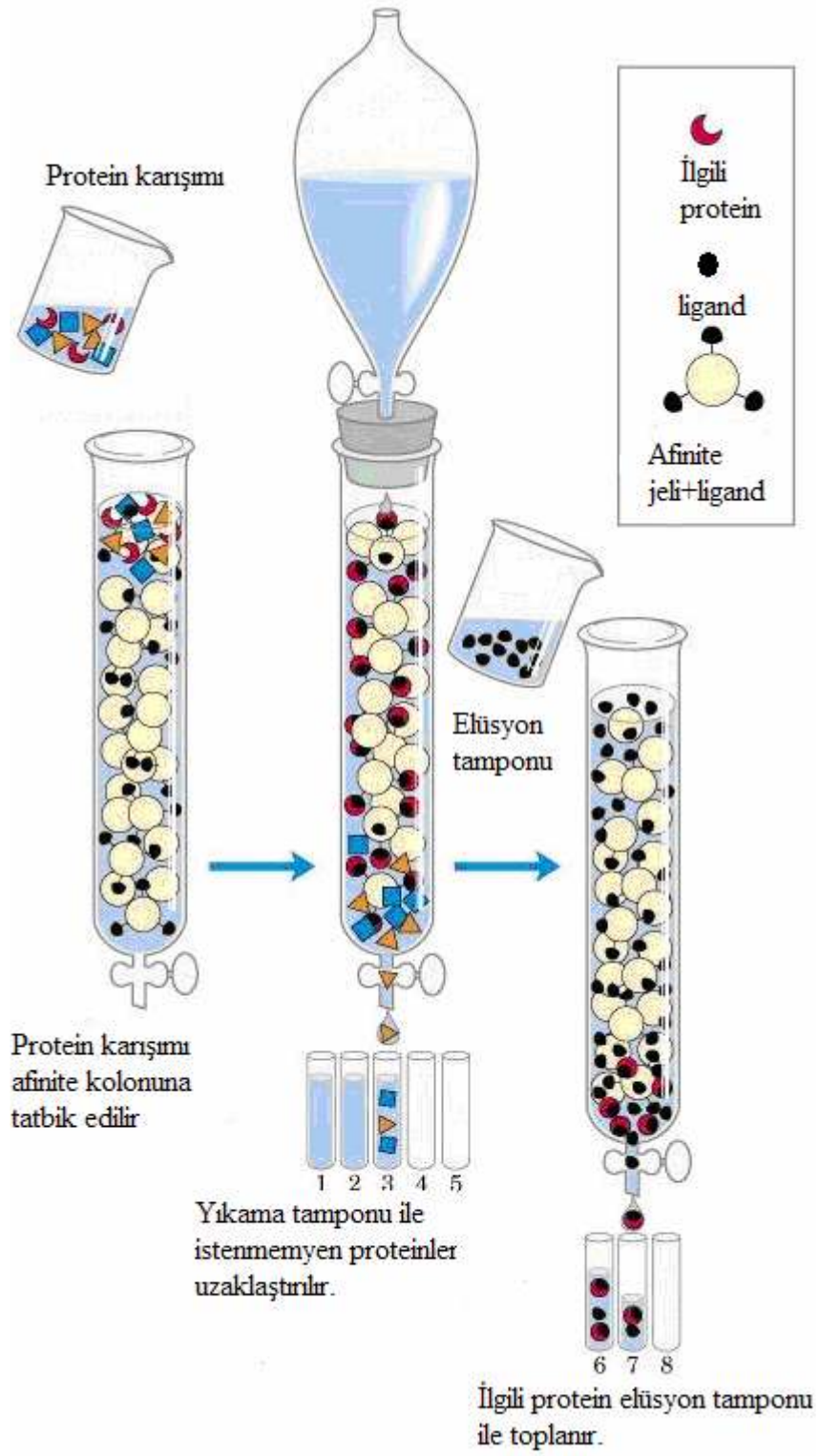
Literatürde afinite jelleri için kullanılan matrikslerin aktivasyonu için, CNBr aktifleştirmesi dışında, oksiran ve karbodiimid aktifleştirilmesi gibi değişik aktifleştirme yöntemleri de bulunmaktadır.

Afinite kromatografisinin yaygınlaşmasından sonra, yöntemin avantajlarından ve modifikasyonlara açık olmasından yararlanılarak, biyospesifik ligandlarla antikolar, 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 [38].

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 1.10).

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 [38].



Şekil 1.10 Afinite Kromatografisi ile Proteinin Saflaştırılması [38]

1.5 Amaç

Karbonik Anhidraz inhibitörleri pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu tedavide karşılaşılan en büyük problem kullanılan inhibitörün, izoenzime dokuya ya da en azından organa spesifik olmamasıdır. Bu ilaçların diğer CA izoenzimlerini de inhibe ettiklerinden dolayı yan etkileri vardır [38].

Yüksek göz içi basıncı ile ortaya çıkan glokom hastalığında uzun yıllardan beri güçlü CA inhibitörleri olarak sülfonamidler kullanılmaktadır. Sülfonamidler gözde bulunan insan karbonik anhidraz II izoenziminin aktivitesini bloke edip göz içi sıvısının oluşmasını azaltarak göz içi basıncını düşürmektedir. Şu an klinikte kullanılan asetozolamid CAII inhibisyonu yanında özellikle eritrositlerde bulunan HCA I 'i de inhibe ettiği bilinmektedir. Buna bağlı olarak birçok olumsuz yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla son yıllarda HCA-II ye spesifik pek çok sülfonamid sentezlenmeye çalışılmış ancak asetozolamide karşı ciddi bir rakip henüz bulunamamıştır. Bunun en önemli nedeni inhibisyon mekanizmasının tam olarak aydınlatılmamasıdır.

Bu gün bilinen inhibisyon mekanizması sülfonamidlerin $SO_2 NH_2$ grubundaki N atomu CA izoenzimlerinin aktif bölgesindeki Zn^{+2} 'ye bağlanırken Thr199 rezidüsünün NH grubu ile sülfonamid grubunun oksijeni arasında hidrojen bağı bulunmaktadır. Ancak bu mekanizma farklı sülfonamidlerin farklı inhibisyon etkisine sahip olmalarını açıklayamaz. Bağlanmada bunun dışında hidrofobik etkileşmelerin de etkili olduğu kesindir [35].

Bu çalışmada HCA-I izoenzimi üzerinde hidrofobik cepte bulunan Phe91 aminoasit rezidüleri yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile daha polar olan Asn aminoasiti ile değiştirilerek sülfonamid ve asetozolamide karşı ilgisi araştırılmıştır.

Ayrıntılı çalışma basamakları aşağıda sunulmuştur;

- 1) Orijinal hCAI geninin klonlanması
 - a. K562 (İnsan kronik myeloid lösemi hücre hattı) ve HL60 (İnsan Akut myeloid lösemi hücre hattı) hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı.
 - b. RT-PCR stratejisi ile hCAI geninin cDNA 'sı elde edildikten sonra pGEM-T vektörüne klonlandı
 - c. Klonlanan gen, dizi analizi ve biyoinformatik yöntemler kullanılarak doğrulandı.
 - d. hCA I geninin vePhe91Asn mutantının ekspresyon amacı ile bir ekspresyon vektörü olan pET21a(+) 'ya alt klonlaması yapıldı.
- 2) Yönlendirilmiş Mutagenезle orijinal hCAI 'de mutasyonlar oluşturulması
 - a. PCR stratejisi kullanılarak Phe91 pozisyonundaki rezidü, Asn aminoasiti ile değiştirildi.
 - b. Oluşturulan olası mutant, dizi analizi ve biyoinformatik yöntemler kullanılarak doğrulandı.
- 3) Orijinal ve mutant hCAI plazmitleri BL_21(DE3) Kodon Plus hücrelerine transforme edilip ekspresyonu yapıldı.
- 4) Ekspresyonu yapılan rekombinant proteinler HCA I izoenzimine spesifik afinite jeli kullanılarak saflaştırıldı.
- 5) Saflaştırılan orijinal ve mutant enzimlerin hidrataz ve esteraz aktivite tayinleri yapıldıktan sonra inhibitörlerin etkisi belirlendi.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma Aldrich ve Merck'ten temin edilmiştir. Doku kültüründe kullanılan medyum ve kimyasallar Sigma ve Biochrom AG firmalarından sağlanmıştır. Moleküler Biyoloji çalışmalarında kullanılan kimyasal, enzim ve kitler Stratagene, İnvitrogen, Fermentas MBI, New England Biolabs, Promega, Qiagen ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları Çizelge 2.1 'de listelenmiştir.

Çizelge 2.1 Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
-86 °C Derin Dondurucu	Sanyo, Japonya
CO ₂ 'li İnkübatör	Nuair
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
Mikroskop	Nikon Eclipse
Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, USA

Çizelge 2.1'in devamı

Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Kromatografi Kolonu	Sigma (1cm çap ve 20cm uzunluk)
Otoklav	Hirayama, Japonya
Thermocycler	Techne Progene, İngiltere
pH Metre	WTW, Almanya
Jel görüntüleme sistemi	Bioimaging Systems
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
MikroSantrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Germany
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
SDS PAGE Aparatları	Atto, Japonya
Horizontal Çalkalayıcı	GFL, Almanya
Elektroforez için Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Sıcak su banyosu	Elektro-mag, Türkiye
Isı kontrollü çalkalamalı etüv	GFL , Almanya
Isıtıcı blok	FALC, İtalya
UV visible Spektrofotometreler	Heiosα (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Pipetler	Finnpipette, Eppendorf

2.1.3 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler

Hücre Kültürü çalışmalarında kullanılan RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) Medyum, FCS (Fetal Calf Serum), Penisilin-Streptomisin solüsyonu, L-Glutamin, DMSO (Dimetil Sülfoksit), Tripkan Blue Solüsyonu, Sigma ve Biological Endustries firmalarından temin edilmiştir.

2.1.4 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Soyu

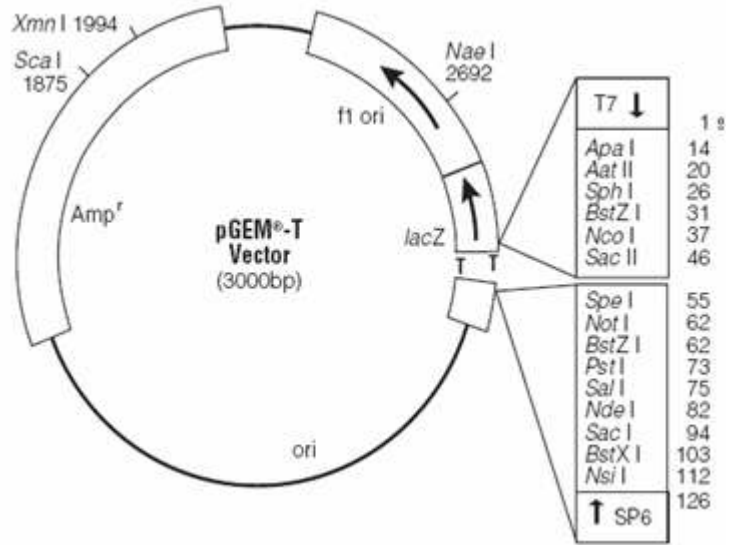
Çalışmada İnsan Akut Myeloid Lösemi (HL60) ve Kronik Myeloid Lösemi (K562) hücre hatları kullanılmıştır [71]. Çalışmada kullanılan bu hücreler Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN' dan temin edilmiştir.

2.1.5 Bakteriyel Hücre Soyları

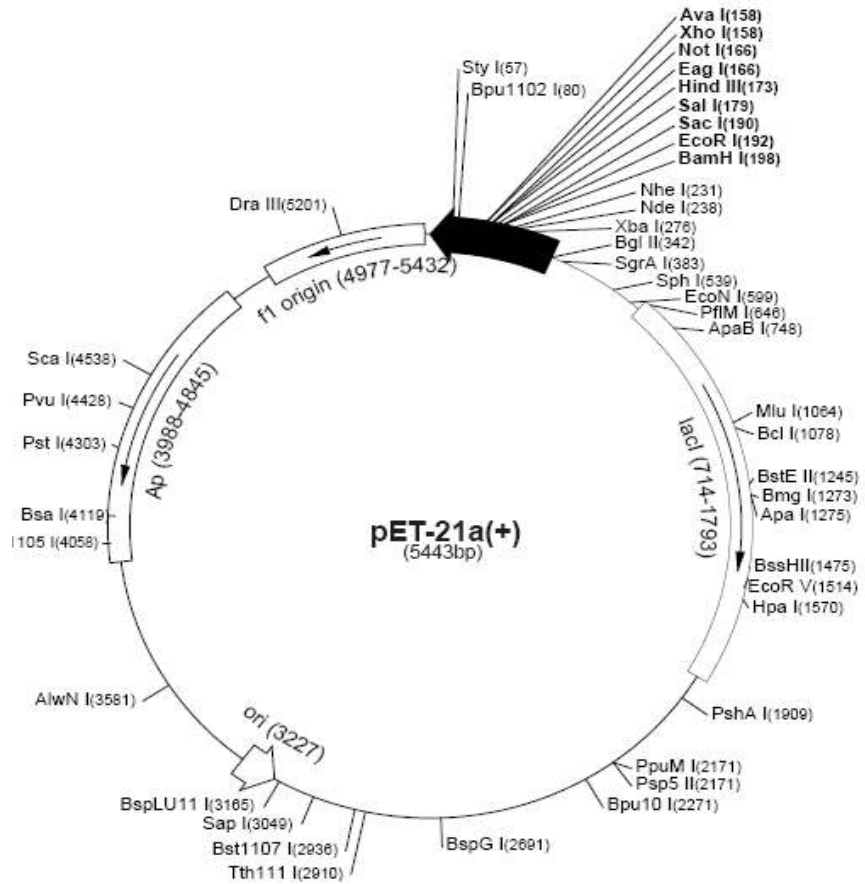
Klonlama ve stok amaçlı DH5 α (SupE44 Δ lacU169 (Φ 80 LacZ Δ M15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rI A1) ve XL-1Blue süper kompetent (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]) *E.coli* soyu kullanılmıştır [60]. Ekspresyon amaçlı çalışmada kullanılan bakteri soyu BL_21 (DE3) 'tür. Bu soyun genotipi (*E. coli* B F⁻ dcm ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) gal λ (DE3) şeklindedir [56].

2.1.6 Plazmitler

Çalışmada PCR ürünlerinin klonlanması amacıyla pGEM-T vektör sistem I kullanılmıştır [72]. Plazmit haritası Şekil 2.1 'de gösterildiği gibidir [72]. Ekspresyon amaçlı kullanılan plazmit pET21a (+)'dır. Plazmit haritası Şekil 2.2 'de gösterilmiştir [68, 73].



Şekil 2.1 pGEM-T Vektör Haritası [74]



Şekil 2.2 pET21a(+) Vektör Haritası [68]

2.1.7 Tamponlar ve Çözeltiler

2.1.7.1 RNA Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

DEPC (Dietilpirokarbonat) 'lı Su: 0.1mL DEPC, 100mL dH₂O' da çözülür. 37 °C'de 12 saat bekletildikten sonra 121°C 'de 20 dakika otoklavlanır. RNA çalışmalarında kullanılacak olan tamponlar DEPC 'li su kullanılarak hazırlandı [75].

2.1.7.2 Formaldehit-Agaroz Jel Elektrofrez Tamponları

Formaldehit agaroz jel elektrofrezinde kullanılan jel tamponu ve tank tamponu Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3 'te gösterildiği şekilde hazırlanmıştır [75].

Çizelge 2.2 Formaldehit Agaroz Elektrofrez Jel Tamponu

FA jel tamponu	Stok Sol.	Son Konsantrasyon	Son Kon.
MOPS(pH:7)	1M	0.2M	20mM
EDTA(pH:8)	0.5M	0.05M	1mM
NaAc	1M	0.01M	5mM
dH ₂ O	1L 'ye tamamlanır		
Tampon DEPC 'li su ile hazırlanır, pH: 7 'ye ayarlanır. Otoklavlanır.			

Çizelge 2.3 FA Jel Elektrofrez Tank Tamponu

FA Tank Tamponu	Son Konsantrasyon
10X FA Jel Tamponu	1X
%37 'lik (12.3M) Formaldehit	0.25M
DEPC 'li dH ₂ O	1L 'ye tamamlanır

2.1.7.3 Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

2.1.7.3.1 Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

Plazmit izolasyonunda kullanılan ve hücreler için izotonik bir ortam oluşturan solüsyon I, hücre duvarının parçalanması ve denatürasyon amacıyla kullanılan solüsyon II ve hücre duvarı ile kromozomal DNA'nın çöktürülmesi amacıyla kullanılan solüsyon III Çizelge 2.4, Çizelge 2.5, Çizelge 2.6'da belirtilen şekilde hazırlanmıştır [76].

Çizelge 2.4 Solüsyon I

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon (mM)
1M Glukoz	50mM
1M Tris-HCl (pH: 8)	25mM
0.5M EDTA (pH: 8)	10mM
ddH ₂ O	100mL 'ye tamamlanır.
Otoklavlanır. +4 °C 'de saklanır.	

Çizelge 2.5 Solüsyon II

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon
0.5M NaOH	200mM
% 10 SDS	%1
ddH ₂ O	10mL'ye tamamlanır.
Otoklavlanır. +4 °C 'de saklanır.	

Çizelge 2.6 Solüsyon III

Kimyasal Madde	Miktar
KOAc	29.44gr
%99 G.Asetik Asit	11.5mL
ddH ₂ O	100mL 'ye tamamlanır.
KOAc, yaklaşık 50mL suda çözülür, Asetik Asit ilave edilir. dH ₂ O ile 100mL 'ye	

2.1.7.3.2 Kompetan Hücrelerin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

DH5 α ve XL1Blue hücre hatlarını kompetan hale getirmek amacıyla kullanılan çözeltiler ve son konsantrasyonları Çizelge 2.7 'de verilmiştir [76].

Çizelge 2.7 Kompetan Hücre Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar

Kimyasal madde	Son Konsantrasyon
1M CaCl ₂	100mM
%99 Gliserol	%40

BL_21 (DE3) hücre hattının kompetan hale getirilmesi amacıyla kullanılan tritilasyon tamponu Çizelge 2.8'de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır [77].

Çizelge 2.8 Tritilasyon Tamponu

Kimyasal madde	Son Konsantrasyon
CaCl ₂	100mM
MnCl ₂	70mM
Na Asetat	40mM
pH=5.5 'e ayarlanır	

2.1.7.4 Agaroz Jel Elektroforezi Tamponları

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan Tris-Borik Asit EDTA Tamponu Çizelge 2.9 'da belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Et-Br Stok Solüsyonu: 10mg/mL olacak şekilde steril dH₂O ile hazırlanır. Koyu renkli ışık geçirmeyen bir şişede muhafaza edilir.

Çizelge 2.9 Tris-Borik Asit EDTA Tamponu (0.5X)

Stok Solüsyon	Son Konsantrasyon
1M Tris-borate	0.045M
0.5M EDTA (pH:8)	0.001M

2.1.7.5 Protein Ekspresyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

LB Agar ve LB Besiyerleri: Üretici firmanın belirttiği miktarda destile H₂O içinde çözülür ve 121 °C 'de 20 dakika otoklavlanarak hazırlanır.

Ampisilin Stok Solüsyonu: 100 mg/mL olacak şekilde steril destile H₂O ile hazırlanır. 0,22µm 'luk filtreden süzülerek steril edilir. -20 °C 'de saklanır.

5mM ZnCl₂ Solüsyonu: 0.068gr ZnCl₂, 100 mL destile H₂O 'da çözülür ve otoklavlanarak steril edilir.

Bakterilerin Yıkanmasında Kullanılan Tris-Cl Tamponu Çizelge 2.10'da belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 2.10 Tris-Cl Tamponu [69]

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
Tris-base	20.19M
dH ₂ O	100mL'ye tamamlanır
Tris-base 90mL dH ₂ O 'da çözülür. pH=7.6 'ya ayarlanarak hacim 100mL 'ye tamamlanır. 121 °C 'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir.	

Bakteri hücrelerini lizise uğratmak amacıyla kullanılan lizis tamponu Çizelge 2.11 'de belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 2.11 Lizis Tamponu [69]

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-base	20mM
0.5M EDTA	0.5mM
0.5M EGTA	0.5mM
dH ₂ O	1L'ye tamamlanır.
Tris-base, 0.5M EDTA, 0.5M EGTA 800mL destile H ₂ O 'da çözülür. pH 8.7'ye ayarlanır. Otoklavlanır. +4° C 'de saklanır.	

PMSF (Fenilmetilsülfonil Florid) Stok Solüsyonu (100X=100mM) : 174mg PMSF 10ml 2-propanolde çözülür. Işık almayacak şekilde -20 °C 'de saklanır.

Lizozim Stok Solüsyonu: 50 mg/ ml olacak şekilde destile H₂O ile hazırlanır. -20 °C 'de muhafaza edilir.

2.1.7.6 Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

2.1.7.6.1 Sepharoz 4B-L-tirozin-sülfonamid Afinite Jel Tamponları

Afinite kromatografisinde kullanılan dengeleme tamponu, yıkama tamponu ve elüsyon tamponu Çizelge 2.12, 2.13, 2.14 'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 2.12 Dengeleme Tamponu

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
Na ₂ SO ₄	0.1M
Tris-Cl	25mM
EDTA	0.5mM
dH ₂ O	1L 'ye tamamlanır.
Na ₂ SO ₄ , EDTA ve Tris-Cl 950mL dH ₂ O 'de çözülür. pH 8.7'ye ayarlandıktan sonra 1L 'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.13 Yıkama Tamponu

Kimyasal Madde-Son Konsantrasyon	Miktar
Na ₂ SO ₄	22mM
Tris-Cl	25mM
EDTA	0.5mM
dH ₂ O	1L 'ye tamamlanır.
Na ₂ SO ₄ , EDTA ve Tris-Cl 950mL dH ₂ O 'de çözülür. pH 8.7'ye ayarlandıktan sonra 1L 'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.14 Elüsyon Tamponu

Kimyasal Madde-Son Konsantrasyon	Miktar
Na ₂ HPO ₄	50mM
NaCl	1M
EDTA	0.5mM
dH ₂ O	1L 'ye tamamlanır.
Na ₂ HPO ₄ , EDTA ve NaCl 950mL dH ₂ O 'de çözülür. 1M HCl ile pH=6.3 'e ayarlanarak toplam hacim 1L 'ye tamamlanır.	

2.1.7.6.2 Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Bradford yöntemi için gerekli çözeltiler Çizelge 2.15 ve 2.16 'da belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 2.15 Bradford Boyama Çözeltisi [35]

Kimyasal Madde	Miktar
Coomassie Brilliant Blue G-250	0.1g
Etanol	50mL
%95 'lik Fosforik Asit	100mL
dH ₂ O	1L'ye tamamlanır

Çizelge 2.16 Standart BSA Çözeltisi

Kimyasal Madde	Miktar
Serum Albumin	0.01g
dH ₂ O	10mL 'ye tamamlanır

2.1.7.6.3 Protein Elektrofrezinde Kullanılan Tamponlar

Protein elektrofrezinde kullanılan ayırma jeli, yığma jeli, tank tamponu, boyama ve arıtma çözeltileri bileşenleri ve son konsantrasyonları Çizelge 2.17, 2.18, 2.19, 2.20, 2.21 'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.17 %12 'lik Ayırma Jeli [35]

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon
%30 Akrilamid/ Bis Akrilamid karışımı	%12
1,5M Tris (pH:8.8)	375mM
%10 SDS	%0.1
%10 Amonyum per sülfat	%0.1
%99 TEMED	%0.4
20 ml toplam hacme sahip olacak şekilde dH ₂ O eklenir.	

Çizelge 2.18 Yığma Jeli (%5) [35]

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon
%30 Akrilamid karışımı	% 4.875
1 M Tris (pH 6,8)	125mM
%10 SDS	%0.1
%10 Amonyum per sülfat	%0.1
%99 TEMED	%0.1
20 ml toplam hacme sahip olacak şekilde destile H ₂ O eklenir.	

Çizelge 2.19 Tank Tamponu [35]

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon
1M Tris	25mM
1M Glisin	250mM
%10 SDS	%0.1

Çizelge 2.20 Numune Tamponu [35]

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon
1M Tris	50mM
%10 SDS	%1
0.5M EDTA pH 8	2mM
%99 Merkaptoethanol	%1
%100 Gliserol	%10
%99 Bromfenol Mavisi	%20

Çizelge 2.21 Boyama Çözeltisi [35]

Kimyasal Madde	Miktar
Coomassie Brilliant Blue 250	0.25g
%95 Etanol	100mL
%10 Asetik asit ile karıştırılır.	

Çizelge 2.22 Arıtma Çözeltilisi [35]

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
%99 Asetik asit	%5
%99 Etanol	%50

2.1.7.6.4 CA-CO₂ Hidrataz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Tamponlar

CO₂ Hidrataz Aktivite Tamponu, İndikatör Tamponu ve doygun CO₂ çözeltileri Çizelge 2.23, 2.24, 2.25 'te bileşenleri ve son konsantrasyonları ile verilmiştir.

Çizelge 2.23 CO₂ Hidrataz Aktivite Tamponu [35]

Kimyasal Madde-Son Konsantrasyon	Miktar
Na ₂ CO ₃	0.15M
NaHCO ₃	0.1M
dH ₂ O	1L 'ye tamamlanır
Na ₂ CO ₃ ve NaHCO ₃ 950mL dH ₂ O 'de çözülür. pH 10'a ayarlandıktan sonra 1L'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.24 İndikatör Tamponu [35]

Kimyasal Madde	Miktar- Son Konsantrasyon
Fenol kırmızı	0.01256g
NaHCO ₃	0.15M
dH ₂ O	1L 'ye tamamlanır

Çizelge 2.25 Doygun CO₂ Çözeltisi [35]

Kimyasal Madde	Miktar
dH ₂ O	500mL
0 ° C 'de 1 dakika süre ile CO ₂ geçirilerek hazırlanır. Ölçümler süresince yenilenir.	

2.1.7.6.5 Esteraz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Tamponlar

Esteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi günlük olarak hazırlanır. 27 mg ester (p-nitro fenil asetat) 1mL aseton içerisinde çözülür. Hızlıca karıştırılan 49 mL suya damla damla ilave edilir.

Aktivite tayininde 0.05 M'lık Tris-SO₄ (pH 7.4) tamponu kullanıldı [35].

2.2 Metot

2.2.1 Hücre Kültürü Deneyleri

2.2.1.1 Hücre Kültürü Laboratuvarının Temizliđi

Hücre kültürü laboratuvarı periyodik olarak virkonlu su ile temizlenerek steril edildi. Çalışma sonunda UV lamba açık bırakılarak ortamın steril hale gelmesi sağlandı.

2.2.1.2.1 Steril Kabinin Temizliđi

Steril kabinin çıkarılabilir özellikteki parçaları otoklavlanarak ve iç yüzeyi periyodik olarak virkonlu su ile silinerek steril edildi. Daha sonra %70 'lik etil alkol ile kabinin iç yüzeyinin temizliği yapıldı. Çalışma başlamadan en az yarım saat önce steril kabin çalıştırılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Çalışma sonunda UV lamba açık bırakılarak ortamın steril hale gelmesi sağlandı.

2.2.1.2.2 CO₂ 'li İnkübatörün Temizliđi

CO₂'li İnkübatörün çıkarılabilen bütün parçaları ve iç yüzeyi virkon içeren su ile temizlenip kurulandıktan sonra %70 'lik etil alkol çözeltisi ile temizlendi. Cihaza bağlı bulunan CO₂ tüpündeki CO₂ miktarı düzenli olarak kontrol edildi. İnkübatör filtrelerinin periyodik olarak değiştirilmesine dikkat edildi. İnkübatörün içerisindeki ortamın nemli kalmasını sağlamak amacıyla alt kısımdaki su tablasına steril edilmiş su koyuldu ve bu su düzenli olarak değiştirildi.

2.2.1.3 Kullanılan Malzemelerin Temizliđi

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cam pipetler öncelikle Kromik Asit çözeltisinde 1-2 saat bekletildi. Deterjanlı su ile yıkanıp iyice durulandıktan sonra üç kez dH₂O 'dan geçirildi. Sterilizasyon amaçlı kağıtlara sarılarak 180 °C 'de pastör fırınında 90 dakika steril edildi.

Isıya dayanklı ependorf, pipet ucu, solüsyonlar ve gerekli diğer malzemeler otoklavda 121°C 'de 20 dakika steril edildi.

Otoklavlanarak steril edilmeye uygun olmayan solüsyonlar için 0.22µm 'luk enjektör ucu filtre kullanıldı.

2.2.1.4 Hücre Kültürü Deneylerinde Kullanılacak Malzemenin Hazırlığı

2.2.1.4.1 Medyumun Hazırlanması

Hücre Kültürü deneylerinde, K562 ve HL60 hücre hatları için ticari olarak temin edilen RPMI 1640 medyumunu kullanıldı. Medyumun içine %10 FCS, son konsantrasyonu 100 ünite/mL olacak şekilde Penisilin, 10 µg/mL olacak şekilde Streptomisin ve 0.2 mM olacak şekilde L-Glutamin solüsyonu 0.22 µm 'luk filtreden geçirilerek eklendi.

2.2.1.4.2 FCS ' nin hazırlanması

Stok serum ilk kullanımdan önce 56 °C 'de 1 saat ısı ile inaktive edildi. 0.22 µm 'luk filtreden geçirilerek steril edildikten sonra kullanıldı. -20 °C 'de muhafaza edildi.

2.2.1.4.3 -80 °C Derin Dondurucuda Stoklanan Hücrelerin Açılması

Su banyosu önceden 37 °C 'ye ayarlanarak çalışmada kullanılacak olan RPMI 1640 medyum ve FCS su banyosunda ılıtıldı. Hücre soyu ile çalışmaya başlanılmadan en az yarım saat önce steril kabin çalıştırıldı. %70 'lik Etil alkol ile steril kabinin iç yüzeyi temizlendikten sonra ılıtılan FCS ve medyumun dış yüzeyleri %70'lik alkol ile temizlenerek steril kabin içine alındı. Kullanılacak olan medyuma %10 oranında FCS, filtreden geçirilerek eklendi. -80°C derin dondurucudan çıkarılan K562 ve HL60 hücre hatları su banyosunda çözüldükten sonra pastör pipeti yardımıyla falkon içindeki medyuma aktarıldı. 1000rpm 'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra üstte kalan medyum uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücre pelleti belli bir miktar taze medyumda çözülerek eşit oranda flasklara paylaştırıldı. Daha sonra gerekli miktarda medyum hücrelerin paylaştırıldığı flaskların içine eklendi. Hücreler %5 içeren 37 °C sıcaklıktaki inkübatörün içinde büyümeye bırakıldı.

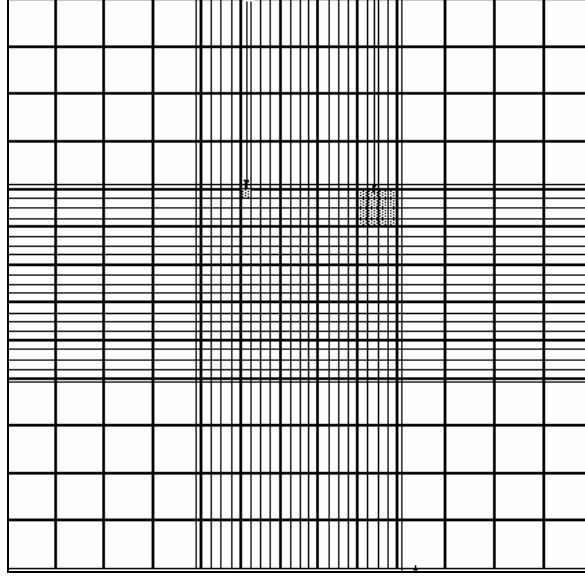
2.2.1.5 Hücrelerin Pasajlanması

Flask içinde belirli bir yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlandı. Bu amaçla flask içindeki süspansiyon hücre kültürü falkona aktarılarak 1000rpm 'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan medyum uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücre pelleti belirli miktarda taze medyumda (%10 FCS içeren) çözüldü. Hücre süspansiyonu flasklara eşit olarak paylaştırıldıktan sonra gerekli miktarda medyum flaskların içine eklendi.

2.2.1.6 Hücre Sayımının Yapılması

RNA izolasyonu için yeterli miktarda hücreyi alabilmek için Tripan Mavisi ve Toma Lamı yardımıyla hücre sayımı yapıldı. Bu işlem için şu yol izlendi: Flaskın içeriği falkona aktarıldıktan sonra 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Üstte kalan pellet uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan hücre pelleti 6 ml medyumda çözüldü. Hücreler falkonda homojen bir şekilde çözüldükten sonra hücre

süspansiyonundan 10µl alınarak bir ependorfa koyuldu. Aynı ependorfa 10µl Tripan Mavisi eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Pipetaj yapılarak hücrelerin ependorfta homojen bir şekilde karışması sağlandıktan sonra Bu karışımdan 10µl alınarak Toma lamına aktarıldı (Şekil 2.3). Mavi renge boyanan hücreler ölü olduklarından sayıma dahil edilmedi.



Şekil 2.3 Toma Lamı [78]

Görüntü alanındaki canlı hücrelerin sayımı yapıldı. Sayım sonucu 1 mL 'deki hücre miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

1mL deki hücre sayısı = Alanda sayılan hücre miktarı x 10^4 x Seyreltme faktörü

2.2.2 RNA ile İlgili Teknikler

2.2.2.1 RNA İzolasyonunun Yapılması

HL60 ve K562 hücre hatlarından Qiagen RNeasy Mini Kit 'te belirtilen prosedüre göre total RNA izolasyonu yapıldı [75]. İzolasyon için 3.500.000 hücre kullanıldı. İzole edilen RNA, 40 µl RNaz içermeyen steril destile H₂O ile elüe edildi.

2.2.2.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen RNA 1:40 oranında RNaz içermeyen dH₂O ile sulandırıldı. Kuvartz 96 well plate kullanılarak A₂₆₀ ve A₂₈₀ dalga boylarında absorbans alındı. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanarak RNA'nın saflığı belirlendi. RNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı [75].

$$\text{RNA miktarı} = 40\mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \mu\text{g/mL RNA}$$

2.2.2.3 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA örnekleri RNaz enziminin etkilerine karşı açık olduğundan kullanılan cam malzemeler, elektroforez tankı ve su RNaz enziminden arındırılmalıdır. RNaz içermeyen su Bölüm 2.1.7 'de belirtildiği gibi hazırlandı.

Cam malzemeler % 0.1 DEPC içeren suda 12 saat bekletildikten sonra otoklavlandı.

Elektroforez tankı önce % 0.5 'lik SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra RNaz içermeyen su ile durulandı. Saf etanolden geçirildikten sonra kurumaya bırakıldı.

İzole edilen RNA'nın jelde görüntülenmesi amacıyla %1 'lik Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi yapıldı. Jelin yapımı için 0.5 gr agaroz tartılıp 10X 'lik jel tamponunda (Çizelge 2.2) çözüldü. RNaz içermeyen steril dH₂O ile 50 mL 'ye tamamlandı.

Jel kaynatıldıktan sonra 50°C 'ye kadar soğuması beklendi. %37 'lik (12.3M) formaldehitten 0.9 mL eklendi ve homojen bir şekilde karışması sağlandı. 10mg/mL Et-Br stok solüsyonundan 1 µl eklendi. Jel elektroforezinin kasetine uygun büyüklükteki taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan jel kasete döküldü ve jelin polimerleşmesi beklendi [75].

RNA örnekleri önce 70°C 'de 10 dakika ısı ile denatüre edilip daha sonra 10 dakika buzda bekletildi. Örnekler jele yüklenerek 1X FA Jel tamponu (Çizelge 2.2) içerisinde 80 Voltta boya yürütüldü. Elektroforez sonucu dijital jel görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirildi ve fotoğraflandı.

2.2.2.4 RT- PCR Reaksiyonu

Reverse transkripsiyon reaksiyonu 20µL 'lik toplam hacimde Sigma Enhanced Avian HS RT-PCR kitinde belirtilen talimatlara göre Çizelge 2.26-a ve Çizelge 2.26-b'de belirtilen şekilde çalışıldı [79].

Çizelge 2.26 a Reverse Transkripsiyon Bileşenleri

Kit İçeriği	Miktar ve Son Konsantrasyon
dNTP karışımı (10 mM)	1µl (500µM her bir dNTP)
Anchored Oligo (dT) ₂₃ primer	1µl (3.5 µM)
RNA kalıbı	8µl (0.005-0.25µg/µl)
TOPLAM HACİM	10µl

70 °C 'de 10 dk ön inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda reaksiyon tüpüne Çizelge 2.26-b reverse transkripsiyon bileşenleri eklendi.

Çizelge 2.26 b Reverse Transkripsiyon Bileşenleri

Kit İçeriği	Miktar ve Son Konsantrasyon
dH ₂ O	6µl
AMV-RT Tamponu (10X)	2µl (1X)
Enhanced Avian RT	1µl (1U/µl)
RNase inhibitörü	1µl (1U/µl)
TOPLAM HACİM	20µl

Reaksiyon tüpü 42°C 'de 50 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda cDNA elde edildi. . Elde edilen cDNA -20 °C 'de kısa süreli saklandı.

PCR reaksiyonu, optimize edilerek ayarlanan cDNA, spesifik hCAI primerleri (0.4µM), Taq polimeraz tamponu (1X), dNTP karışımı (200µM) ve taq polimeraz enzimi (0.05u/µl) kullanılarak 50µl toplam hacimde Çizelge 2.27 'de belirtilen spesifik PCR döngüsü kullanılarak yapıldı. PCR sonuçları, % 0.8 'lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak, Bölüm 2.2.3.3 'de belirtildiği gibi, 80 voltta yarım saat boyunca yürütülerek dijital görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

Çizelge 2.27 PCR Döngü Koşulları

	Sıcaklık °C	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon/ RT İnaktivasyon	94 °C	15 sn	1
Denatürasyon	94°C	15 sn	35
Bağlanma	55°C	30 sn	
Uzama	68°C	1 dk	
Final uzama	72°C	5 dk	1

2.2.3 DNA ile İlgili Teknikler

2.2.3.1 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA nın jelde görüntülenmesi amacıyla % 0.8 'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla jel elektroforezi aparatına uygun miktarda 0.4 gr Agaroz tartılarak TBE tamponunda (0.5X) (Çizelge 2.9) çözüldükten sonra kaynatıldı. 45-50°C 'ye kadar soğutulduktan sonra son konsantrasyon 0,5µg/mL olacak şekilde Et-Br eklendi. Et-Br 'ün iyice karışması sağlandı. Tarakların önceden yerleştirilmiş olduğu agaroz jel elektroforezi aparatına jel döküldü. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarılıp aparat elektroforez tankına yerleştirildi 0.5X TBE tamponu ile elektroforez tankı dolduruldu. Örnekler yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. 80 Voltta yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve değerlendirildi [80].

2.2.3.2 PCR Ürünlerinin Jelden Geri Kazanılması

PCR ürünleri, Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit 'te belirtilen prosedüre göre geri kazanıldı [81]. 40µL dH₂O ile elüe edildi. Agaroz jelden kazanılan PCR ürünlerinin miktarı ve saflığı spektrofotometrik olarak belirlendi. Ayrıca örnekler %0.8 'lik Agaroz jel elektroforezinde Bölüm 2.2.3.1'de anlatılan şekilde yürütülerek kontrol edildi.

2.2.3.3 Plazmit DNA İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için QIAprep SpinMiniprep Kit ve alkalin lizis miniprep yöntemlerine göre yapıldı. Alkalin lizis miniprep yöntemi rutin klonlama basamaklarında kullanıldı. İzole edilen plazmit DNA 50 µl dH₂O ile elüe edildi [60]. Alkalin lizis plazmit mini prep izolasyonu aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

Tek koloniden 5mL LB sıvı besiyerine ekim yapılarak 37°C 'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Önkültür 1.5mL 'lik ependorflara aktarıldı. 10000 rpm 'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst fazdaki medyum uzaklaştırıldıktan sonra 110µL Solüsyon I (Çizelge 2.4) ile çözüldü. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Solüsyon II (çizelge 2.5) 'den 200 µl eklenip altüst edilerek karıştırıldı ve buzda 10 dakika inkübe edilerek lizisin olması sağlandı. Buzda bekletilmiş tübe, Solüsyon III (Çizelge 2.6) 'den 150 µL eklendi ve altüst edilerek karıştırıldı. 10000 rpm 'de 5 dakika santrifüjlendi. Supernatan, yeni bir 1.5 mL 'lik ependorfa aktarıldı. Fenol/kloroform ve etanol presipitasyonu yapıldıktan sonra plazmit DNA 30 µl 'de stereril dH₂O içinde çözümlenerek -20°C 'de saklandı [60].

İzole edilen plazmitin saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik olarak belirlendi. İzole edilen plazmit, Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi (Bölüm 2.2.3.1). Jel görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı.

2.2.3.4 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen DNA 1:40 oranında steril destile H₂O ile sulandırıldı. Kuvartz 96 well plate kullanılarak A₂₆₀ ve A₂₈₀ dalga boylarında absorbanans alındı. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanarak DNA 'nın saflığı belirlendi. DNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı [80].

$$\text{DNA miktarı} = 50\mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \mu\text{g/mL DNA}$$

2.2.3.5 Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim

Klonlamalar sırasında izole edilen plazmit, primer dizaynı sırasında eklenmiş olan restriksiyon bölgelerinden Restriksiyon Endonükleazlarla kesildi. Bu amaçla BamHI ve NdeI enzimleri kullanıldı. Kesim Çizelge 2.28 'de belirtilen şekilde gerçekleştirildi ve 37°C 'de 2 saat kesime bırakıldı. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, dijital görüntüleme sisteminde değerlendirildi (Bölüm 2.2.3.1).

Çizelge 2.28 Restriksiyon Endonükleaz Kesim Reaksiyonu

Kit içeriği	Miktar
Plazmit DNA	1 µg
Tampon R	5 µl (1X)
BamHI Enzimi	1 U/µl
NdeI enzimi	1 U/µl
dH ₂ O	x µl
TOPLAM	50 µl

2.2.3.6 PCR Ürünlerinin pGEM-T Vektör Sistem I 'e Ligasyonu

Agaroz jelden geri kazanılan PCR ürünlerinin pGEM-T vektör sistem I (Promega)'e ligasyonu kitle belirtilen talimatlara göre yapıldı [74]. Buna göre 10 µl toplam hacme; rapid ligasyon tamponu (2X), pGEM T vektör (5ng\ µl), jelden kazanılmış DNA (0.8ng/ µl) ve T4 DNA ligaz (0.3U/µl) eklendi. Eklenecek DNA miktarı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı [74].

$$\frac{\text{Vektör miktarı (ng)} \times \text{DNA fragmentinin büyüklüğü(kb)}}{\text{Vektörün Büyüklüğü(kb)}} \times \text{DNA} : \text{Vektör} = \text{DNA miktarı (ng/ µL)}$$

Ependorflara koyulan ligasyon reaksiyonları +4°C 'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ligasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için kitle sağlanan kontrol DNA fragmenti (4ng/µL) 1µl pGEM-T kullanılarak aynı şartlarda ligasyona bırakıldı. Aynı zamanda negatif kontrol olarak DNA içermeyen bir ligasyon reaksiyonu da ortamda denendi.

2.2.3.7 Ligasyon

PCR ürünleri haricinde yapılan alt klonlamalarda Fermentas T4 DNA ligaz sistemi kullanılmıştır. Bu sisteme göre ligasyon 20µl toplam hacimde T4 DNA ligaz tamponu (1X), yukarıda belirtilen formülde hesaplanan miktarlarda vektör ve DNA ve en son olarak da T4 DNA Ligaz enzimi (~0.2u/µl) kullanılmış ve 16 saat +4°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben Bölüm 2.2.4 'te belirtilen talimatlara göre önceden hazırlanmış kompetan hücrelere ligasyon ürünü transforme edilmiştir.

2.2.3.8 PCR 'a Dayalı Yönlendirilmiş Mutageniz

Yönlendirilmiş Mutagenizde PCR 'a dayalı strateji kullanılmıştır. Bunun için Stratagene Quick change yönlendirilmiş mutageniz kiti kullanılmıştır. 50µl 'lik

toplam hacimde; reaksiyon tamponu (1X), 125 ng 'lık forward ve revers mutagenез primerleri, pfu turbo (2.5U), dNTP karışımı (10mM) kullanılmıştır. Farklı plazmit DNA konsantrasyonları denenmiş sırasıyla 5ng, 10ng, 50ng ve 100ng kaynak plazmit kullanılmıştır. Sadece 50ng ve 100ng 'lık DNA konsantrasyonunda mutagenез başarılı olmuştur. Tüm PCR reaksiyonlarında olduğu gibi GAPDH pozitif kontrol olarak kullanılmış aynı zamanda kontaminasyon riskinin değerlendirilmesi için negatif kontrol çalışılmıştır. Yönlendirilmiş mutagenез koşulları kittede önerildiği gibi yapılmıştır (Çizelge 2.29) [56].

Çizelge 2.29 Yönlendirilmiş Mutagenез PCR Koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95 ⁰ C	30 sn
2	16	95 ⁰ C	30 sn
		62 ⁰ C	1 dk
		68 ⁰ C	5.5 dk

2.2.4 Bakteri Deneyleri

2.2.4.1 *XL1Blue* ve *DH5α* Hücrelerinin Kompetan Hale Getirilmesi

Klonlamada kullanılacak *XL1Blue* ve *DH5α* hücreleri aşağıda verilen protokole göre kompetan hale getirilmiştir [60].

Bir gece önceden 10 mL LB sıvı besiyerine tek koloni ekim yapılarak 37°C 'de 16 saat inkübasyona bırakılır. 100 mL taze LB sıvı besiyeri içerisine önkültürden 5 mL inoküle edilir. OD₆₀₀ = 0.5- 0.6 değerleri arasına ulaşınca bakteri süspansiyonu 4°C 'de, 3000rpm 'de 5dk santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırılır. Bakteri süspansiyonu ile eşit hacimde 0.1M CaCl₂ solüsyonundan eklenir ve dikkatlice pipetaj yapılarak pellet çözülür. 25dk buz üzerinde beklemeye bırakılır.

3000 rpm 'de 5 dk, 4°C 'de santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırılır. Başlangıç hacminin 1/10 'i kadar hacimde 0,1 M CaCl₂ ile tekrar hücre pelleti çözülür. 1–4 saat buz üzerinde bekletilir. Eşit hacimde %40 'lık gliserol eklenerek dikkatlice karıştırılır. Ependorflara paylaştırılarak -80°C 'de derin dondurucuda saklanır [60].

2.2.4.2 BL21(DE3) Kodon Plus Hücrelerinin Kompetan Hale Getirilmesi

BL21(DE3) Kodon Plus hücreleri aşağıda verilen protokole göre kompetan hale getirilmiştir.

Bir gece önceden 10 mL LB sıvı besiyerine tek koloni ekim yapılarak 37°C 'de inkübasyona bırakılır. 100 mL taze LB sıvı besiyeri içerisine önkültürden 5 mL inoküle edilir. OD₆₀₀= 0,2 'ye ulaşınca kadar bakteri süspansiyonu 37°C çalkalamalı etüvde (yaklaşık 2–3 saat) bekletilir. Son konsantrasyon 20mM olacak şekilde MgCl₂ ve son konsantrasyon yaklaşık olarak %0.2 olacak şekilde glukoz ilave edilip 37°C'de çalkalayıcı etüvde OD₆₀₀ = 0,5 olana kadar büyütülür. +4°C 'de 2 saat bekletilir ve +4°C'de 5000 rpm 'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır, hücre pelleti tritilasyon tamponu (Çizelge 2.8) ile çözüldükten sonra +4°C 'de 3000 rpm 'de 5 dk santrifüj edilir. Pellet %15 'lik gliserol içeren 25mL tritalasyon tamponu ile çözülür. Önceden buz üzerinde bekletilmiş ependorflara aktarılarak -80°C 'de derin dondurucuda saklanır [77].

2.2.4.3 Ampisilinli LB Agar Petrilerinin Hazırlanması

LB agar üretici firma tarafından belirtilen miktarda dH₂O 'da çözülür. 121 °C 'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. 50°C civarına kadar soğuması beklendikten sonra 100 mg/ml ampisilin stoğundan, son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde eklendi. Köpürmeyecek şekilde karıştırıldıktan sonra bek alevi yanında petri kaplarına dökülerek polimerleşmesi beklendi. Petrilerin etrafi parafilmlelenerek +4 °C buzdolabına ters vaziyette kaldırıldı.

2.2.4.4 Transformasyon

Transformasyon pGEM-T vektör sistem I de belirtilen prosedüre göre yapıldı [74]. Belirtilen prosedüre göre işlem basamakları şöyledir:

Her ligasyon reaksiyonu için 2 adet Ampisilinli LB Agar petri hazırlandı. Ampisilinli Agar petrilere bek alevi yanında önce 100mM IPTG stok solüsyonundan 100µl IPTG ve 50mg/mL X-Gal stok solüsyonundan konularak steril bir öze yardımıyla yayıldı. Kompetan hücreler -80 °C 'den çıkarılarak buza koyuldu ve 5 dakika hücrelerin çözünmesi beklendi. Transformasyon tüpüne 50-100ng plazmit DNA olacak şekilde 2 µl ligasyon reaksiyonundan konuldu. Kompetan hücrelerden de 50 µl eklendi. Yavaş bir pipetaj ile tüpün içindekilerin karışması sağlandıktan sonra 20 dakika buzda inkübasyona bırakıldı. Hücreler 42°C 'ye ayarlanmış su banyosunda 45-50 saniye çalkalanmadan tutularak ısı şokuna tabi tutulduktan sonra tekrar 2 dakika buzda bekletildi. Bu sürenin bitiminde, önceden 37 °C 'ye ılıtılmış olan LB medyumdan 950µl eklendi. 1.5 saat 37 °C 'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda transformasyon kültürünün 100 µl 'si petrilere yayıldı. Artan transformasyon kültürü 3000rpm 'de 5 dakika santrifüjlenip 100µl LB medyumda çözülmek suretiyle tekrar petriye yayıldı. 15-20 dakika petrilere kültürü emmesi beklendi. Daha sonra petrilere ters çevrilerek 37 °C 'deki inkübatörde hücrelerin büyümesi için 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Beyaz renkli kolonilerden gliserol stok hazırlandı [74].

2.2.4.5 Gliserol Stoğun Hazırlanması

100 µg/mL ampisilin içeren LB medyuma tek koloniden ekim yapılarak önkültür hazırlandı. %30 'luk steril gliserol çözeltisi hazırlandı. Bek alevi yanında ependorflara önkültür ile eşit hacimde gliserol çözeltisi eklenerek -80°C 'ye kaldırıldı.

2.2.5 Rekombinant Proteinin Ekspresyonu, Analizi ve Saflaştırılması

2.2.5.1 Ekspresyonun IPTG ile İndüklenmesi

Rekombinant plazmit, ekspresyon amacıyla BL_21(DE3) Codon Plus hücrelerine transforme edildi. 100 µg/mL Ampisilin içeren LB medyuma tek koloniden ekim yapılarak 16 saat 37°C 'de inkübasyona bırakılmak suretiyle önkültür hazırlandı. Hazırlanan bu önkültürün 10 mL 'si son konsantrasyonda 12.5 µg/mL ampisilin içeren 100 mL LB besiyerine inoküle edildi. 37°C 'de inkübasyona bırakıldı. Bakteri kültürü $OD_{550} = 0.6-0.8$ 'e ulaştığında son konsantrasyonu 0.4 mM-1mM arasında değişen konsantrasyonlarda IPTG ile indüklendi [69]. Son konsantrasyonu ~250 µM olacak şekilde $ZnCl_2$ kültüre eklendi. İnkübatörün sıcaklığı 30°C 'ye indirilerek indükleme süresi 3, 4, 5 ve 6 saat olacak şekilde çalışıldı.

2.2.5.2 Hücrelerin Yıkınması

İndükleme süresi sonunda bakteri kültürü 3000rpm 'de +4°C 'de 10 dakika santrifüjlendi. Hücre pelleti yıkama tamponunda (çizelge 2.10) çözüldükten sonra tekrar santrifüjlendi. Bu işlem iki kez tekrarlanmak suretiyle hücreler yıkanarak kurutuldu. -20 °C 'ye kaldırıldı [69].

2.2.5.3 Lizis İşlemi

Bakteriyal hücre pelleti buz üzerine alınıp çözünmesi beklendi. 10 mL soğuk lizis tamponunda (Çizelge 2.11) çözümlenerek vortekslendi ve buzda inkübasyona bırakıldı. Son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde PMSF eklendi. Taze olarak hazırlanmış 10 mg/mL lizozim stok solüsyonundan 250 µl eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Kültüre 50 µM son konsantrasyonda $ZnCl_2$ eklenip 10 dakika buz üzerinde bekletildi. 30 mg/mL Protamin Sülfat stok solüsyonundan

1 mL eklenerek santrifüj tüpü 2 dakika süreyle alt üst edildi. 3000rpm 'de +4°C 'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan kısım temiz bir tüpe alındı [69].

2.2.5.4 Diyaliz

Lizis sonrası ham ekstrakt saf suya karşı 12 saat kadar üç defa suyu değiştirilerek ve daha sonra dengeleme tamponuna (Çizelge 2.12) karşı 3-4 saat diyalize bırakıldı [35].

2.2.5.5 Afinite Jelinin Sentezlenmesi

Afinite jeli Sepharose-4B matriksi üzerine hazırlandı. Sepharose-4B 'nin serbest -OH grupları CNBr ile aktifleştirildi ve tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfonamid diazolanarak tirozine kenetlendirildi [35].

2.2.5.5.1 Sepharose -4B 'nin Aktifleştirilmesi ve Tirozin Takılması

20 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki distile su ile birleştirildi. 4gr CNBr karışmakta olan jel süspansiyonuna eklendi. Süspansiyonun sıcaklığı buz katılarak 20°C 'de ve pH 'sı 4M NaOH ile 11 'de sabit tutuldu. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi. Süspansiyon bir buhner hunisine aktarıldı. 250 mL soğuk 0.1M NaHCO₃ tampon çözeltisi ile (pH:10) yıkandı ve bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL 'sinde 8mg tirozin çözüldü ve behere ilave edildi. Tirozinin bağlanması amacıyla 1.5 saat karıştırıcıda çok yavaş tempoda karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat +4°C 'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol soğuk su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0.2M NaHCO₃ tamponu (pH:8.8) ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel, aynı tamponun 40mL 'si içine alındı [35].

2.2.5.5.2 Sülfanilamidin Kenetlenmesi

25 mg Sülfanilamid 0°C civarında 10 mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ içeren 0°C 'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika sonra reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH:9.5 'a çıkarılarak sabit tutuldu ve üç saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1lt saf su ve 200 mL 0.05 M Tris-SO₄ (pH:7.5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi [35].

2.2.5.6 Örneğin Kolona Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1.5 x 15 cm boyutunda bir kolona paketlenerek dengeleme tamponu ile (Çizelge 2.12) dengelendi. Ham ekstrakt kolona tatbik edilerek yıkama tamponu (Çizelge 2.13) ile yıkandı. Böylece istenmeyen diğer proteinler uzaklaştırılmış oldu. Kolona tutunmuş olan hCAI enzimi elüsyon tamponu ile (Çizelge 2.14) 1.5mL 'lik ependorflara alındı [35].

2.2.5.7 Bradford Yöntemi ile Total Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Coomassie Brilliant Blue G-250 'nin farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilen Bradford yöntemi ile ham ekstrakt ve saflaştırılan enzimdeki protein miktarı belirlendi. Bu amaçla tüplere 1 mg/mL BSA (Sığır Serum Albumini) stok çözeltisinden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70,80, 90, 100 'er µl koyuldu. 100µl olacak şekilde saf su ile tamamlandı. 5 mL Coomassie Brilliant Blue eklendikten sonra 1-2 dakika köpürtmeden vorteksledi. 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 595 nm 'de absorbans alınarak protein miktarı belirlendi [82].

2.2.6 SDS PAGE

Ekspresyon sonucunsa elde edilen protein ekstraktaları proteinleri moleküler ağırlığın ayrılmasında kullanılan bir method olan SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde değerlendirildi.

Öncelikle, %12'lik ayırma jelini oluşturan çözeltiler (Çizelge 2.17), APS hariç karıştırıldı. APS eklendikten sonra karışım, jel kasetine çizgi hizasına kadar döküldü. Jelin yüzeyini düzgünleştirmek için 0.3 mL saf su ile doyurulmuş n-butanol kaset kenarından enjekte edildi. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra yüzeydeki butanol döküldü ve distile su ile yıkandı. Diğer bir erlende % 5'lik yığma (yükleme) jeli (Çizelge 2.18) hazırlandı. Yine APS hariç tüm malzeme manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. APS de eklenerek polimerize haldeki ayırma jelinin üzerine döküldü ve jelde kuyular oluşturmak için tarak yerleştirildi.

Jel polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirilerek tank tamponu (Çizelge 2.19) ile dolduruldu. Örnek numune tamponu (Çizelge 2.20), proteinle % 50 oranında karıştırıldı ve 2 dakika 95°C' de kaynatıldı.

Protein örnekleri kuyulara yüklendi. Akım, proteinler % 5'lik yığma jeline ilerlerken 80 volta, % 12'lik ayırma jeline ulaştıktan sonra 150 volta ayarlandı. Yükleme tamponundaki Bromfenol mavisi, jelin altına 1 cm kalana dek işleme devam edildi. Bu işlem bitiminde, düzenek açıldı ve cam plaklar birbirinden ayrıldı. %5'lik yığma jeli uzaklaştırıldı. Ayırma jeli, bir kesikle işaretlendi ve boyama çözeltisi (Çizelge 2.21) içine alındı. Protein bantları net bir şekilde görünene kadar çalkalayarak boyandı. Daha sonra arıtma çözeltisine (çizelge 2.22) alınarak hafifçe karıştırıldı. Böylece boyanın fazlası alınmış oldu. Daha sonra UV ışığı altında protein bantları incelendi. Jel, distile suya alınarak saklandı [49, 83].

2.2.7 Karbonik Anhidraz Aktivite Tayin Metodları

2.2.7.1 Hidrataz Aktivitesi

Bu yöntem, CO₂ 'in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ nedeniyle pH değerinin 10.0 'dan 7.4 'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi hesabına dayanır. İndikatör olarak pH:7.4te renk değişimi gösteren fenol kırmızısı tampon olarak pH 'sı 10 olan karbonat tamponu kullanıldı.

Reaksiyon tüpüne önce 2 mL indikatör ve 1,5 mL doymuş CO₂ çözeltileri koyuldu. Bu karışımın üzerine enzim çözeltisinden 100 µl ilave edildi. Aynı anda karbonat tamponu koyularak rengin kırmızıdan sarıya dönmesi için geçen süre belirlendi (tc). Aynı işlemler, enzim çözeltisi yerine 0,1mL destile su eklenerek yapıldı (to). Yönteme göre CA enzim aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Buna göre;

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

Formülü uygulanarak, kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi değeri hesaplandı [35].

2.2.7.2 Esteraz Aktivitesi

Kinetik çalışmalarda CA aktivitesi ölçümleri bu yöntemle belirlenmektedir. Bu yöntemde CA enzimi, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitrofenol ve p-nitrofenolata hidroliz eder ve bu da 348 nm dalga boyunda absorbans vermektedir.

Tayin işleminde 1 ml'lik kuvarz küvetlere 500 mL tamponlanmış enzim çözeltisi ve 500 mL sübstrat ve konulmasından 3 dakika sonra 25 °C 'de 348 nm'de absorbansı okundu. 348 nm'deki absorbans artışı beşe bölünerek hidrolizlenen p-nitrofenil asetat miktarı mmolar cinsinden bulundu. Bu değer 3 dakika için olduğu

için 1 dakikada oluşan p-nitrofenil miktarını bulmak için 3'e bölünür. EU aşağıda verilen formüle göre hesaplanır [35].

$$EU = \text{Küvet hacmi} \times \text{Enzim miktarı} \times \text{p-nitrofenilvasetat miktarı (mmolar)} / \epsilon \times d$$

ϵ = p-nitrofenolün molar ekstrikasyon katsayısı

d = 1 cm (ışık yolu)

2.2.7.3 İnhibisyon Çalışmaları

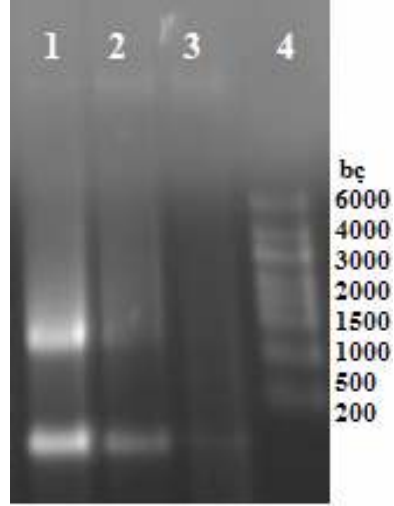
HCA I enziminin ve mutant proteinin IC₅₀ değerlerini hesaplamak için hidrataz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonu sabit tutulmak suretiyle farklı konsantrasyonlarda sülfonamid ve asetozolamid inhibitörleri çalışıldı. Enzimlerin inhibitörsüz ortamdaki aktiviteleri % 100 aktivite olarak kullanıldı. Enzimlerin farklı konsantrasyonlardaki inhibitörler varlığında hidrataz aktiviteleri ölçülerek % aktivite değerleri hesaplandı. Çizilen % Aktivite-[I] grafiklerinden yararlanılarak her bir inhibitör için IC₅₀ değeri hesaplandı.

3. BULGULAR

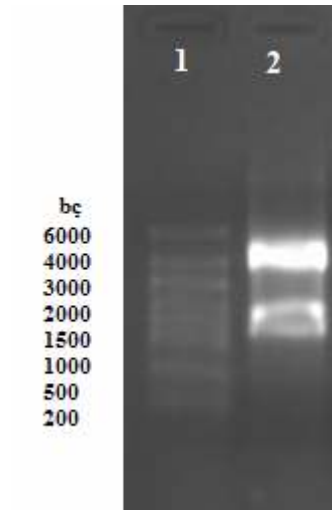
3.1 hCAI Geninin Klonlanması

hCAI geninin izolasyonu için RT PCR 'a dayalı strateji kullanılmıştır. Bunun nedeni genin transkribinin büyük intronları içermesidir. Bu nedenle hCAI 'in en bol bulunduğu yer eritrosit hücreleri olduğu için ekspres olduğunu düşündüğümüz Kronik Myeloid Lösemi hücre hattı olan K562 hücreleri ve Akut Myeloid Lösemi hücre hattı olan HL60 hücreleri kullanılmıştır. İki farklı hücre hattı kullanılmasının nedeni hCAI geni ekspresyonunun iki farklı modelde farklı olabileceği ihtimalidir. K562 hücreleri kemik iliğinin farklılaşmasının geç dönemine karşılık gelmekte ve aynı zamanda kronik myeloid lösemide model teşkil etmektedir. HL60 hücreleri de kemik iliği farklılaşmasının erken dönemi için ve akut myeloid lösemi için model teşkil etmektedir.

Buna göre hücre kültüründe RPMI 1640 medyumunda yetiştirilen K562 ve HL60 hücre hatlarından Bölüm 2.2.2.1 'de belirtilen şekilde total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA 'nın varlığı ve saflık derecesi % 1 'lik formaldehit agaroz jel elektroforeziyle belirlendi. RNA 'nın konsantrasyonu ve saflık derecesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sırasıyla Şekil 3.1 'de K562 hücrelerinin ve Şekil 3.2 'de ise HL60 hücrelerinin total RNA formaldehit agaroz jel elektroforezi görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.1 K562 Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü
(1; 1.eluant, 2; 2.eluant, 3; 3.eluant, 4; RNA marker)



Şekil 3.2 HL60 Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü
(1; RNA marker, 2; HL60 total RNA)

RT-PCR reaksiyonu Bölüm 2.2.2.4 'te belirtilen şekilde uygulandı. hCAI geninin 5' ve 3' ucuna spesifik primerler, genin NCBI (National Center for Biotechnology Information) 'da yer alan mRNA nükleotid dizisinden yararlanılarak tasarlandı. Primerler tasarlanırken genin klonlanacağı vektörlerin restriksiyon kesim bölgeleri de göz önünde bulunduruldu. %GC içeriğine, primerlerinin Tm değerlerinin birbirlerine yakın olmasına ve saç tokası oluşumunun meydana gelmemesine dikkat edildi. Klonlanmayı kolaylaştırmak amacıyla forward primerine

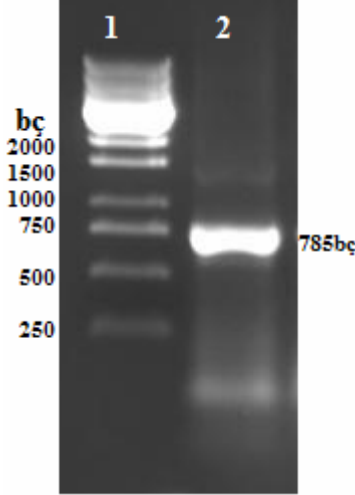
NdeI, revers primerine de BamHI kesim bölgesi yerleştirildi. Tasarlanan primerler Çizelge 3.1 'de verilmiştir [84].

Çizelge 3.1 hCA I ve GAPDH genine Spesifik Olarak Tasarlanan Primerler .
(Kesim bölgeleri kırmızı harfle gösterilmiştir)

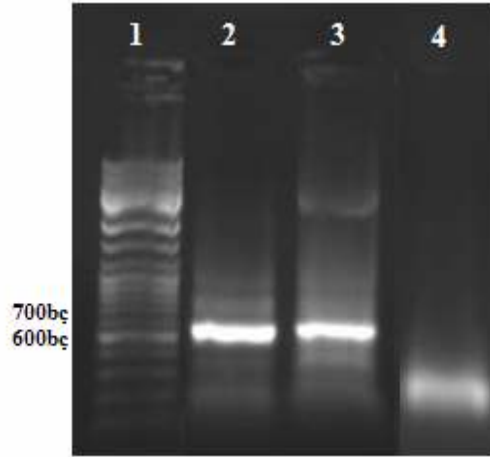
Primerin Adı	Tm (°C)	Uzunluk (bç)	Primer Dizisi (5'- 3')
hCA I F.primier	62,86	24	ACATATGATGGCAAGTCCAGACTG
hCA I R.primier	61,57	27	AGGATCCTCATTAAAATGAAGCTCTCA
hGAPDH F.primier	64,58	25	CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG
hGAPDH R.primier	66,33	23	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG

hCAI genine spesifik PCR Reaksiyonu yukarıda belirtilen primerler ve Bölüm 2.2.4 'te açıklandığı gibi 2 mM, 4 mM ve 6 mM MgCl₂ son konsantrasyonları denenerek optimize edildi. RT-PCR reaksiyon şartlarının test edilmesi amacıyla insan hücrelerinde sürekli olarak ekspre olan GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) amplifikasyonu da çalışmalara dahil edildi. Ayrıca PCR şartlarının test edilmesi amacıyla herhangi bir DNA kaynağı içermeyen negatif kontrol de kullanıldı. İlk PCR denemelerinde 230 ng/µl RNA kullanılarak sentezlenen cDNA 'dan 1 µl kullanıldı fakat her iki hücre hattında da herhangi bir amplifikasyon gözlenmedi. Son olarak, ilk denemenin yaklaşık 8 katı kadar fazla RNA kalıbı kullanılarak çalışılan PCR amplifikasyonunda HL60 hücre hattından elde edilen cDNA kalıp olarak kullanıldığında 785bç 'lik bölgede hCA I genine ait bant elde edilebilmiştir (Şekil 3.3). K562 hüce hattından elde edilen cDNA kalıp olarak kullanıldığında agaroz jelde sadece primer dimerleri gözlenmiştir (Şekil 3.4). Tüm spesifik PCR reaksiyonlarında GAPDH 'de reaksiyona dahil edilmiştir ve sürekli olarak amplifikasyon gözlenmesi şartların uygunluğunu doğrulamıştır. K562 hücre

hattından sentezlenen cDNA kullanılarak çalışılan PCR amplifikasyonlarında hCAI genine ait bant elde edilememesinin deneysel hata olmayıp hCAI 'e ait mRNA ekspresyonunun olmaması ya da oldukça az olmasına bağlı olduğu tespit edilmiştir.

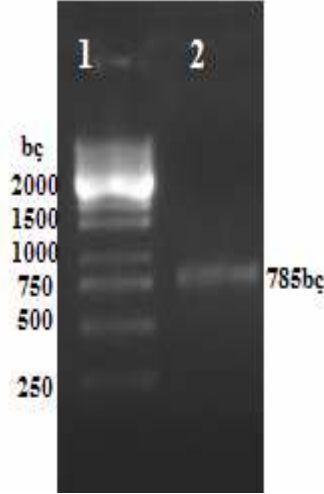


Şekil 3.3. hCA I geni PCR Amplifikasyonu Agaroz Jel Elektrofrez Görüntüsü
(1: 1kb DNA marker, 2; hCAI geni)



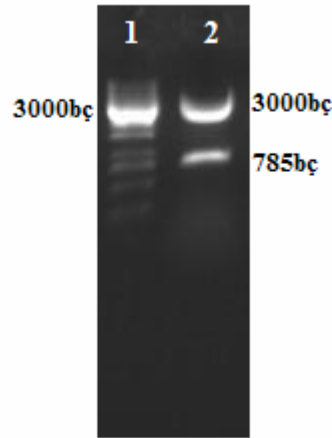
Şekil 3.4 K562 cDNA 'sı kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonu Agaroz Jel Elektrofrez görüntüsü (1; 1kb DNA marker, 2; GAPDH primerleri [2mM MgCl₂], 3; GAPDH primerleri [4mM MgCl₂], 4; hCAI primerleri)

PCR ile amplifiye edilen 785bp 'lik DNA fragmenti Bölüm 2.2.3.2 belirtilen şekilde jelden kazanılmış ve pGEM-T içerisine klonlanmıştır. Şekil 3.5 'te jelden geri kazanılan hCA I geni agaroz jel elektroforezi görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.5 Jelden geri kazanılan hCAI geni Agaroz jel elektroforezi görüntüsü (1: 1kb marker, 2:jelden geri kazanılan hCAI geni)

Jelden geri kazanılan hCAI geni pGEM-T(promega) vektörüne, bölüm 2.2.3.6 'da belirtilen şekilde klonlandı. Mavi-beyaz seleksiyonu uygulandı [85]. Seçilen beyaz koloniler BamHI/NdeI restriksiyon kesimi ile kontrol edilerek rekombinant olup olmadığı bir kez daha doğrulandı (Şekil 3.6). Bu rekombinant kolonilerden uzun dönemli stok olarak korunması için gliserol stok hazırlandı.



Şekil 3.6 : pGEM-T ligasyonunun kontrolü (1kb marker, 2: pGEM-T vektör ve hCAI geni)

3.2 hCAI Geninin Biyoinformatik Analizi

pGEM-T 'ye klonlanan ve hCAI olduğu düşünölen DNA fragmenti LARCK Technologies (UK) firmasına dizi analizine gönderildi. Bunun nedeni her ne kadar spesifik primerler kullanılsa da PCR 'a dayalı amplifikasyonlarda yanlış hibridizasyonlar olabileceğidir. İkinci önemli nokta daha sonra ekspresyon çalışmalarında kullanılacak olan ORF 'de taq polimeraza bağılı olarak oluşan tesadüfi mutasyonların bulunup bulunmadığının kontrol edilmesidir. Elde edilen diziler NCBI(National Center for Biotechnology Information) 'a ait internet adresi kullanılarak biyoinformatik olarak karşılaştırıldı [86]. 785 bç 'lik PCR amplifikasyon ürününün gerçekte de hCAI olduğu doğrulanıp, PCR 'a dayalı olarak herhangi bir mutasyon oluşmadığı da bir kez daha belirlendi.

```

hCAI      1 ATGGCAAGTCCAGACTGGGGATATGATGACAAAAATGGTCCTGAACAATGGAGCAAGCTG 60
|
|
|
BC02789  61 ATGGCAAGTCCAGACTGGGGATATGATGACAAAAATGGTCCTGAACAATGGAGCAAGCTG 144

hCAI      61 TATCCCATTGCCAATGGAAATAACCAGTCCCCTGTTGATATTTAAAACAGTGAAACCAAA 120
|
|
|
BC02789  145 TATCCCATTGCCAATGGAAATAACCAGTCCCCTGTTGATATTTAAAACAGTGAAACCAAA 204

hCAI      121 CATGACACCTCTCTGAAACCTATTAGTGTCTCCTACAACCCAGCCACAGCCAAAGAAATT 180
|
|
|
BC02789  205 CATGACACCTCTCTGAAACCTATTAGTGTCTCCTACAACCCAGCCACAGCCAAAGAAATT 264

hCAI      181 ATCAATGTGGGGCATTCTTCCATGTAAATTTTGAGGACAACGATAACCGATCAGTGCTG 240
|
|
|
BC02789  265 ATCAATGTGGGGCATTCTTCCATGTAAATTTTGAGGACAACGATAACCGATCAGTGCTG 324

hCAI      241 AAAGGTGGTCCTTTCTCTGACAGCTACAGGCTCTTTCAGTTCATTTTACTGGGGCAGT 300
|
|
|
BC02789  325 AAAGGTGGTCCTTTCTCTGACAGCTACAGGCTCTTTCAGTTCATTTTACTGGGGCAGT 384

hCAI      301 ACAAATGAGCATGGTTCAGAACATACAGTGGATGGAGTCAAATATTCTGCCGAGCTTCAC 360
|
|
|
BC02789  385 ACAAATGAGCATGGTTCAGAACATACAGTGGATGGAGTCAAATATTCTGCCGAGCTTCAC 444

hCAI      361 GTAGCTCACTGGAATTCTGCAAAGTACTCCAGCCTTGCTGAAGCTGCCTCAAAGGCTGAT 420
|
|
|
BC02789  445 GTAGCTCACTGGAATTCTGCAAAGTACTCCAGCCTTGCTGAAGCTGCCTCAAAGGCTGAT 504

hCAI      421 GGGTTGGCAGTTATTGGTGTTTTGATGAAGGTTGGTGAGGCCAACCCAAAGCTGCAGAAA 480
|
|
|
BC02789  505 GGGTTGGCAGTTATTGGTGTTTTGATGAAGGTTGGTGAGGCCAACCCAAAGCTGCAGAAA 564

hCAI      481 GTACTTGATGCCCTCCAAGCAATTTAAAACCAAGGGCAAACGAGCCCCATTACAAAATTTT 540
|
|
|
BC02789  565 GTACTTGATGCCCTCCAAGCAATTTAAAACCAAGGGCAAACGAGCCCCATTACAAAATTTT 624

hCAI      541 GACCCCTCTACTCTCCTTCCCTCATCCCTGGATTCTTGACCTACCCTGGCTCTCTGACT 600
|
|
|
BC02789  625 GACCCCTCTACTCTCCTTCCCTCATCCCTGGATTCTTGACCTACCCTGGCTCTCTGACT 684

hCAI      601 CATCCTCCTCTTTATGAGAGTGTAACCTGGATCATCTGTAAGGAGAGCATCAGTGTGAGC 660
|
|
|
BC02789  685 CATCCTCCTCTTTATGAGAGTGTAACCTGGATCATCTGTAAGGAGAGCATCAGTGTGAGC 744

hCAI      661 TCAGAGCAGCTGGCACAATTCGCGAGCCTTCTATCAAATGTTGAAGGTGATAACGCTGTC 720
|
|
|
BC02789  745 TCAGAGCAGCTGGCACAATTCGCGAGCCTTCTATCAAATGTTGAAGGTGATAACGCTGTC 804

hCAI      721 CCCATGCAGCACAACAACCGCCCAACCCAACCTCTGAAGGGCAGAACAGTGAGAGCTTCA 780
|
|
|
BC02789  805 CCCATGCAGCACAACAACCGCCCAACCCAACCTCTGAAGGGCAGAACAGTGAGAGCTTCA 864

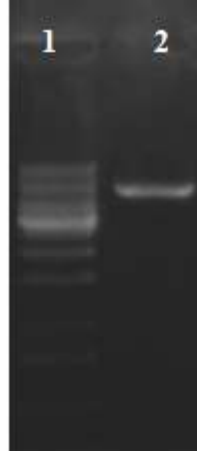
hCAI      781 TTTTAATGA 789
|
|
|
BC02789  865 TTTTGATGA 873

```

Şekil 3.7 Otomatik Dizi Analizi Sonuçlarının hCA I Geni ile Karşılaştırılması
(ORF 'nin başlangıç kodonu ve sonlanma kodonu kırmızı ile belirtilmiştir.)

3.3. hCAI Geninin pET 21a(+) Vektörüne Alt Klonlanması

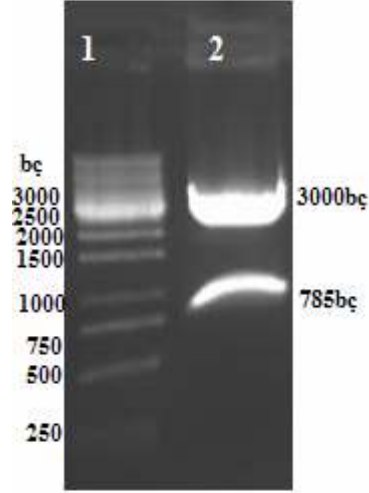
hCAI 'in ekspresyonu için pET ekspresyon sistemi kullanılacaktır. Bu amaçla, ekspresyon amacıyla kullanılacak olan pET21a(+) plazmit vektörü *DH5α* kompetan hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonucu oluşan kolonilerden kontrol ve alt klonlama amacıyla Bölüm 2.2.3.3 'te belirtilen yöntemle plazmit DNA izolasyonu yapıldı ve BamHI/NdeI enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirildi (Şekil 3.8). Jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildikten sonra iki enzimle kesilmiş olan vektör jelden geri kazanıldı.



Şekil 3.8 pET21a(+) Restriksiyon Kesimi Sonucu

(1; 1kb Marker, 2; Doğrusal hale getirilmiş pET21a(+) vektörü)

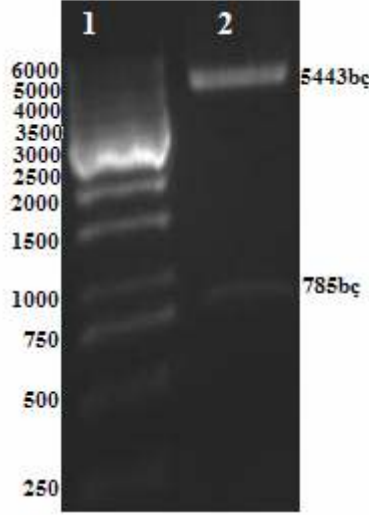
Aynı strateji pGEM-T vektörüne klonlanan ve dizi analizi ile doğrulanan hCAI geni için de uygulandı. hCAI geni BamHI/NdeI restriksiyon enzimleri ile Çizelge 2.28'de belirtilen şekilde ve koşullarda kesildikten sonra %0.8 'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi (Şekil 3.9). Restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılan hCAI geni bölüm 2.2.3.2 'de belirtildiği gibi jelden geri kazanıldı ve 785bp 'lik hCAI geni pET21 a(+) vektörü içine Bölüm 2.2.3.7 'de belirtilen koşullarda ligasyona bırakıldı. Ligasyon reaksiyonu bekletilmeden ekspresyon amacıyla BL_21(DE3) Codon Plus hücre hattına transforme edildi. 16 saat 37 °C inkübasyondan sonra oluşan kolonilerden gliserol stok yapıldı. -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.



Şekil 3.9 hCAI Genini İçeren pGEM-T Plazmitinin BamHI/NdeI Kesiminin Agaroz Jel Elektrofrez Görüntüsü

(1; 1kb Marker, 2; pGEM-T vektörü vehCA I geni)

Vektör beta galaktozidaz geni içermediği için mavi beyaz seleksiyon uygulanamadı. hCAI geninin pET21a (+) vektörüne klonlanıp klonlanmadığını kontrol etmek amacıyla tesadüfi olarak seçilen kolonilerden alkelen lizis yöntemi ile plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Rekombinantların tespiti için BamHI/NdeI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile çizelge 2.28 'de belirtilen şekilde kesildi. Kesim sonucunun tamamı %0.8 'lik agaroz jel elektrofrezinde değerlendirildi. Buna göre incelenen 4 koloni içinde, 2 tanesinin rekombinant olduğu tespit edildi. Bu kolonilerin gliserol stokları yapıldı.



Şekil 3.10 pET21a(+) hCAI Geni Agaroz Jel Elektrofrez Görüntüsü
(1; 1kb DNA Marker,2; hCAI geni ve pET21a(+)-vektörü)

3.4 hCAI Geninde Yönlendirilmiş Mutageniz Stratejisi

HCA I izoenzimi üzerinde bulunan ve sülfonamidlere bağlanmada etkili olduğu düşünülen hidrofobik karakterdeki Phe91 aminoasit rezidüsünün daha polar bir rezidü olan Asparajine dönüştürülmesi planlanmıştır. Bu şekilde sülfonamidlere karşı daha az ilgi duyan mutant hCA I enziminin elde edilmesi amaçlanmaktadır. Yönlendirilmiş mutageniz Stratagene®'s QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kitle PCR 'a dayalı strateji kullanılarak gerçekleştirilmiştir [56].

pET21a (+) vektörüne klonlanmış olarak bulunan hCA I geninde Phe91Asn değişikliği aşağıda belirtilen şekilde tasarlanan mutant primerlerle bölüm 2.2.3.8'de belirtilen şekilde ve Çizelge 3.2 'de belirtilen koşullarda çalışıldı. Ayrıca farklı plazmit DNA konsantrasyonları denenmiş sırasıyla 5ng, 10ng, 50ng ve 100 ng kaynak plazmit DNA kullanılmıştır. Sadece 50 ve 100ng 'lık DNA konsantrasyonlarında mutageniz başarılı olmuştur.

Mutageniz primerleri kitle önerildiği üzere primer X programı yardımıyla aşağıda belirtilen kriterlere dikkat edilerek hazırlanmıştır [87].

Primerler tasarlanırken baz içeriğinin 25 ile 45 bç arasında olmasına, erime sıcaklığının 78°C ve üzerinde olmasına, değiştirilecek bazın primerin ortasında olmasına, %GC içeriğinin en az %40 olmasına ve primerin bir Guanin ya da Sitozin bazı ile sonlanmasına ve ayrıca saç tokası oluşumunun olmamasına dikkat edildi(Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Mutant Primer Dizileri

Primerin Adı	Tm (°C)	Uzunluk (bç)	Primer Dizisi (5'- 3')
Phe91Asn Primer	67,14	30	GACAGCTACAGGCTCAATCAGTTTCATTTTCAC
Phe91Asn Primer	67,14	33	GTGAAAATGAAACTGATTGAGCCTGTAGCTGTC

3.4.1 Phe91Asn Mutantının Otomatik Dizi Analizi ile Doğrulanması

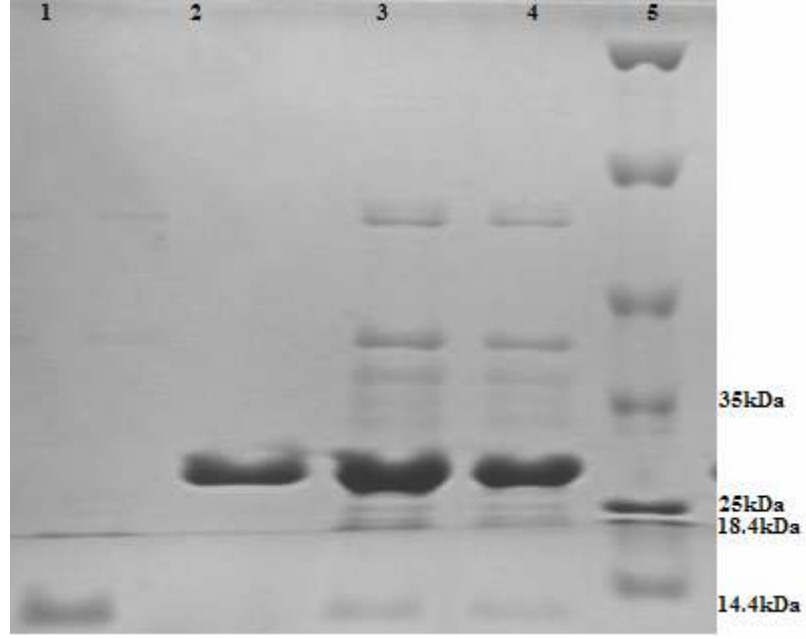
Mutagenез yapılan hCAI geninin istenilen mutasyonu taşıyıp taşımadığı otomatik dizi analizi ile kontrol edildi. Bu amaçla mutant plazmitlerden bölüm 2.2.3.3 'te belirtildiği gibi plazmit DNA izolasyonu yapıldı ve hCAI geninin amplifikasyonuna spesifik primerler (Çizelge 3.1) kullanılarak REFGEN(ODTU) firması tarafından yapılan dizi analizi ile doğrulandı. Elde edilen dizi analizi sonuçları biyoinformatik olarak NCBI 'da analiz edildi ve yabancı tip hCAI geni ile karşılaştırıldı (Şekil 3.11).

3.5 Yabani ve Mutant hCAI Genlerinin Ekspresyon Stratejisi

Rekombinant plazmit ekspresyon amacı ile BL_21(DE3) Codon Plus hücrelerine transforme edildi.

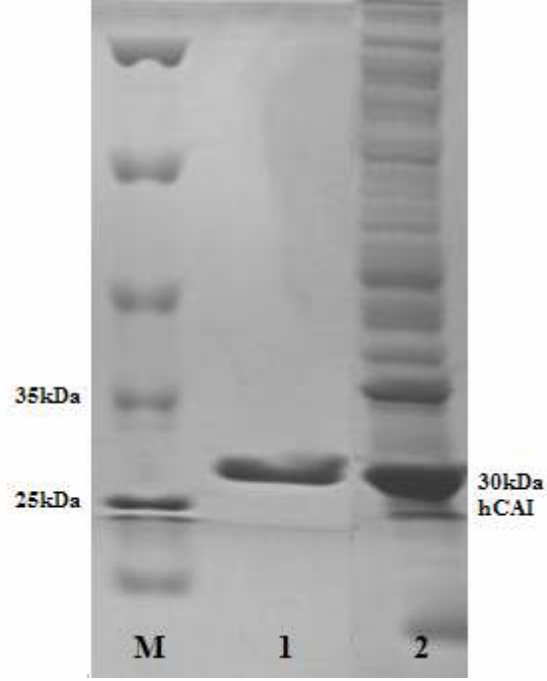
Öncelikle ekspresyon ve saflaştırma şartlarının optimizasyonu için pET21a(+) vektörüne klonlanmış olan yabani tip hCA I vektörü ile çalışıldı. pET21a(+) vektörünün özelliği IPTG ile indüklenebilmesidir. Buna göre bölüm 2.2.4.6.1 'de belirtilen şekilde farklı IPTG konsantrasyonları (0.4mM ve 1mM) ile farklı inkübasyon sürelerinde (3, 4, 5 ve 6 saat) indüklenme gerçekleştirildi. İndüklenmeler karşılaştırıldı ve en iyi ekspresyon şartlarının, 1mM IPTG kullanılarak 5 saat inkübasyon olduğu tespit edildi. Kısaca (i)indüklenme gerçekleşikten sonra, (ii)hücreler lizise uğratıldı, (iii)Lizisden sonra afinite jelinin yapısının bozulacağı düşünülerek ek diyaliz aşaması da dahil edildi.(iv)Diyaliz uygulanan rekombinant proteinler Sepharose 4-B-L Tirozin Sülfonamid afinite kolonu kullanılarak saflaştırıldı. Kolona örneğin tatbikinden sonra kolonun yıkanması süresince örnekler tüplere toplandı ve yıkama işlemi boyunca 280nm'de her tüpün absorbansı alındı. Protein gelmeyinceye kadar yıkama işlemine devam edildi ve 289nm 'de absorbansın düşüşü izlendi. Daha sonra kolona tutulan örneğin elüsyonu yapıldı. Kolonun yıkanması ve elüsyon işlemleri süresince tüplere toplanan örneklerin 280nm 'deki protein miktarları ve hidrataz aktiviteleri ölçüldü. Saflaştırma sırasında ve sonucunda elde edilen ürünler SDS jel ile görüntüledi.

Öncelikle plazmit içermeyen ve içeren BL-21(DE3) Codon Plus hücrelerinden elde edilen ham ekstraktlar ve afinite sonuçları karşılaştırılmıştır. Şekil 3.12 'de görüldüğü gibi plazmit içeren BL-21(DE3) Codon Plus ham ekstraktları indüklenme olmamasına rağmen yüksek düzeyde hCAI ekspre ettiği gözlenmiştir.

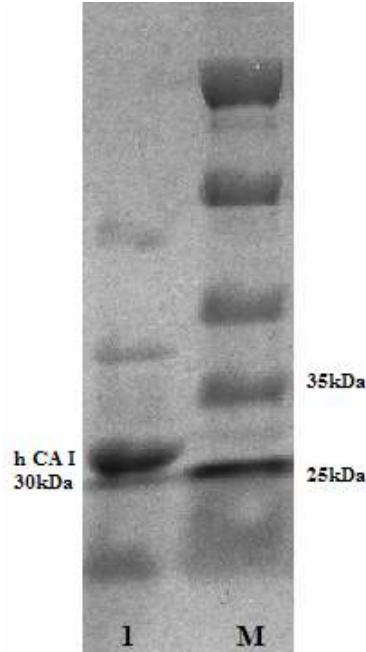


Şekil 3.12 Plazmit içeren ve içermeyen BL-21(DE3) Codon Plus hücrelerinden elde edilen ham ekstrakt ve afinite ürünlerinin SDS PAGE görüntüsü. (1; Plazmit içermeyen hücreden elde edilen ham ekstrakt, 2; HCA I enzimi afinite ürünü, 3; HCA I enzimi diyaliz sonrası ham ekstraktı, 3; HCA I enzimi diyaliz öncesi ham ekstraktı, 4: protein marker)

Ayrıca plazmit içeren IPTG ile indüklenmiş ve indüklenmemiş BL-21(DE3) Codon Plus hücrelerinin ham ekstraktları karşılaştırıldığında IPTG indüklenmesinin protein ekspresyonunu beklenildiği tarzda arttırdığı görülmektedir (Şekil 3.13 ve Şekil 3.14)



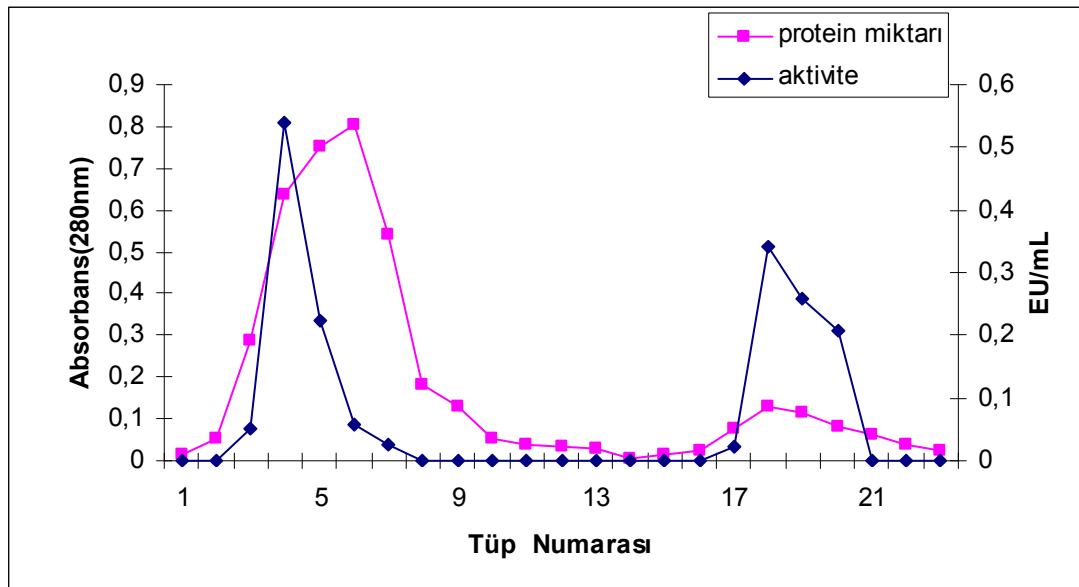
Şekil 3.13 İndüklenmiş HCA I İzoenzimi SDS PAGE görüntüsü
(M: Protein marker, 1: Afinite sonrası saf HCA I enzimi, 2: Diyaliz öncesi ham ekstrakt.)



Şekil 3.14 İndüklenmemiş HCA I enzimi SDS PAGE görüntüsü
(M; Marker, 1: İndüklenmemiş HCA I ham ekstraktı.)

Yabani tip HCA I enzimine ait saflaştırma grafiği ve çizelgesi şekil 3.15 ve çizelge 3.3 'te verilmiştir. Buna göre elüsyon sırasında 17 ile 21. tüpler arasında maksimum hidrataz aktivitesi belirlenmiştir. Maksimum protein konsantrasyonu da yıkama aşamasına denk gelen 2 ile 5. tüpler arasındadır. Sonuç olarak saflaştırma tablosuna baktığımızda afinite kromatografisinde gerçekleşmesi gereken saflaştırma katsayısının oldukça düşük olduğu görülmektedir. Yıkama sırasında HCA I kaybının olup olmadığını kontrol etmek amacıyla yıkama sırasında alınan örnekler de SDS PAGE jeline yüklenmiştir.

Buna göre şekil 3.16 'da görüldüğü gibi, yıkamada en yüksek protein konsantrasyonuna rastladığımız tüplerden biri de SDS 'e dahil edilmiş, ve bu tüpte HCA I proteinini yıkama sırasında yüksek düzeyde kaybettiğimizi anlayabiliriz.



Şekil 3.15 Yabani HCA I Enziminin Saflaştırma Grafiği

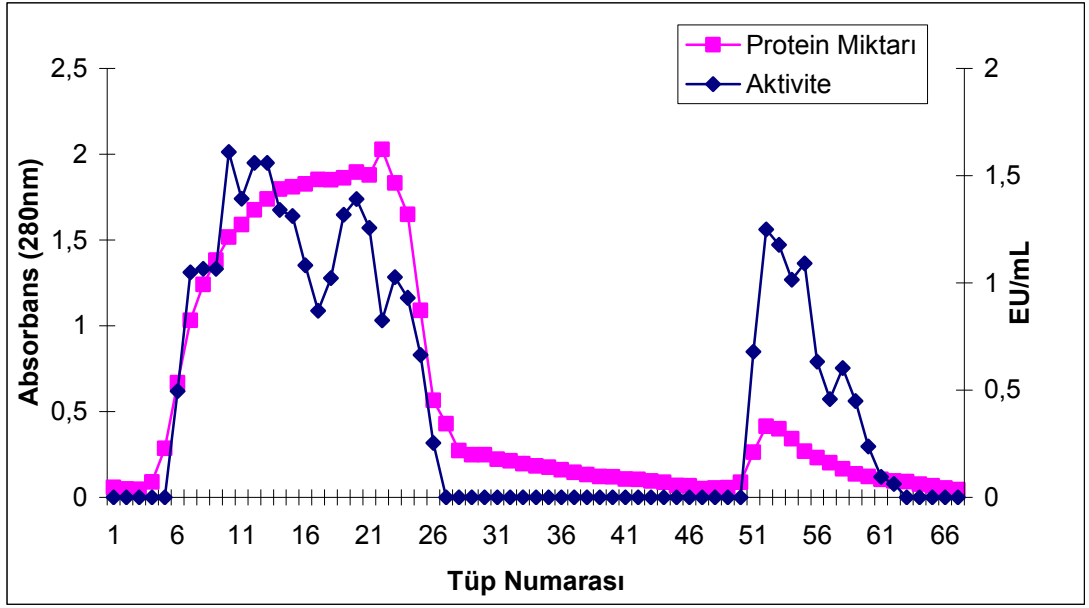


Şekil 3.16 HCA I Yıkamada Alınan Örneğin SDS PAGE Görüntüsü
(1; Protein Marker, 2; HCA I ham ekstraktı,3; HCAI Yıkama Tüp No:4)

Çizelge 3.3 Yabani HCA I Enziminin Saflaştırma Çizelgesi

Yabani HCA I	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Total Aktivite (U)	Protein (mg/mL)	Total Protein	Spesifik Aktivite (E/mg/mL)	%Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Ekstrakt	19mL	1.34	25.46	0.076	1.444	17.6315	%100	-
Saf HCA I	3mL	1.90	5.7	0.0245	0.735	77.551	%22.38	4.39

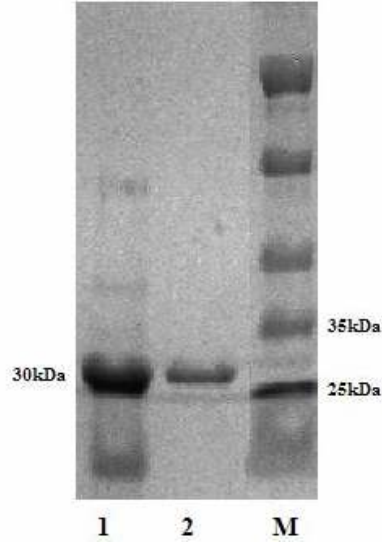
Phe91Asn mutantını içeren rekombinant plazmit ekspresyon amacı ile BL_21(DE3) Codon Plus hücrelerine transforme edildi. Bölüm 2.2.4.6.1 'de belirtilen şekilde 1mM IPTG ile 5saat indüklendi. Phe91Asn mutantına ait saflaştırma grafiği ve çizelgesi şekil 3.18 ve çizelge 3.4 'te verilmiştir. Mutant proteinin saflaştırılması sırasında yıkama aşamasında benzer şekilde HCA I proteininin kaybı gözlemlendi. Şekil 3.19 'da Phe91Asn mutantına ait SDS PAGE görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.17 Phe91Asn Mutantı Saflaştırma Grafiği

Çizelge 3.4 Phe91Asn Mutantı Saflaştırma Çizelgesi

Phe91Asn Mutantı	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Total Aktivite (U)	Protein (mg/mL)	Total Protein	Spesifik Aktivite (E/mg/mL)	%Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Ekstrakt	30mL	1.842	55.26	0.1356	4.068	13.58	%100	-
Saf Phe91Asn Mutantı	3mL	1.177	3.531	0.0118	0.0354	99.745	%6.39	7.34



Şekil 3.18 Phe91Asn Mutantı SDS PAGE Görüntüsü
(M: Marker, 1: Phe91Asn mutantı ham ekstraktı, 2: Afinite sonrası saf Phe91Asn mutantı)

3.6 İnhibisyon Çalışmaları

İnhibisyon çalışmalarında sülfonamid ve asetozolamid bileşikleri kullanıldı. Bu iki tip inhibitörün IC_{50} değerlerinin belirlenmesi amacıyla substrat konsantrasyonu sabit tutulmak suretiyle farklı konsantrasyonlarda inhibitör çözeltileri kullanılarak enzimlerin hidrataz aktiviteleri belirlendi. %Aktivite-[I] grafiği çizilerek oluşturulan eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan stok inhibitör solüsyonlarının konsantrasyonları çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5 Stok İnhibitör Çözelti Konsantrasyonları

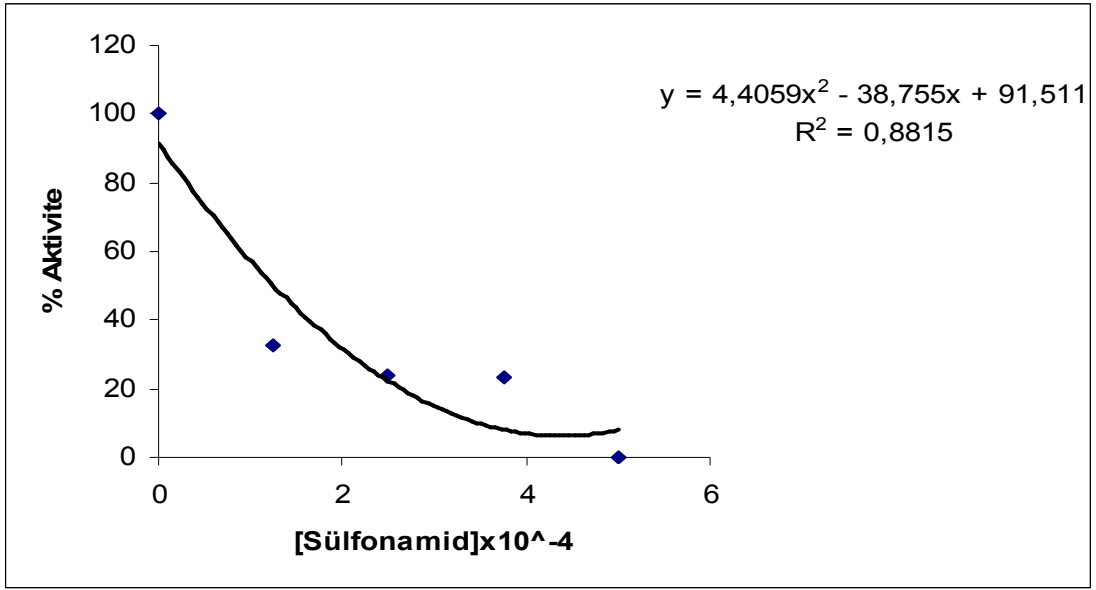
İnhibitör	Stok Çözelti Konsantrasyonu
Sülfonamid	1×10^{-2} M
Asetozolamid	1×10^{-3} M

Çizelge 3.6 Yabani HCA I Enzimi Üzerinde Çalışılan Sülfonamid Konsantrasyonu, Hidrataz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Miktarı ve %Aktiviteleri

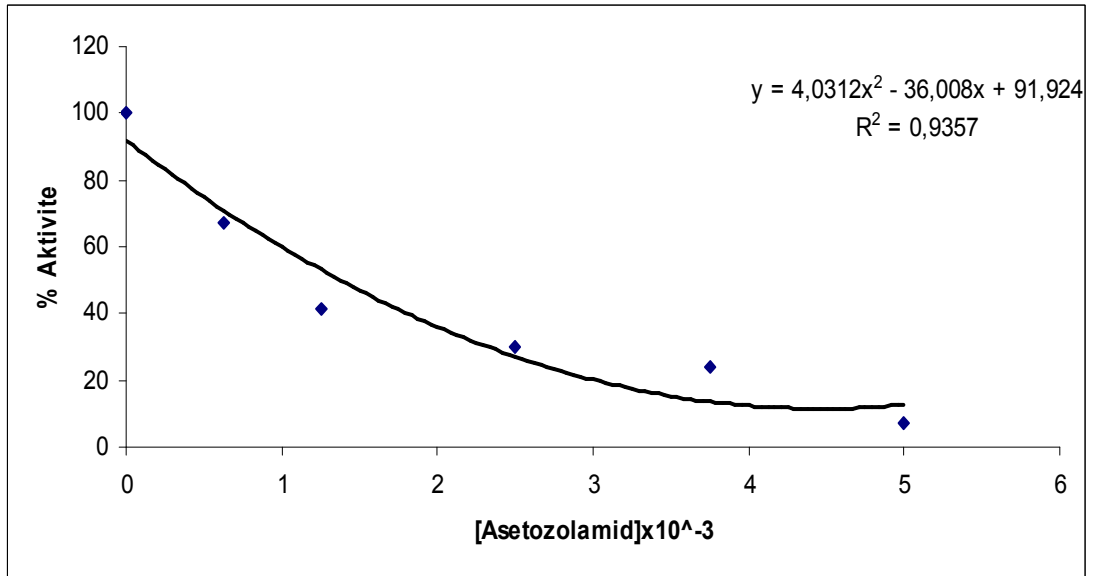
pH=10 Tamponu	Enzim (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Fenol Red Çözeltisi (µL)	Saf Su (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL) (Sülfonamid)	İnhibitör Çözeltisinin Konsantrasyonu (M)	Aktivite [(t ₀)-(t _c)]/(t _c)	% Aktivite
400	hCA-I	100	2000	200	1200	-	-	1.81	100
				150		50	1.25×10^{-4}	0.586	32.37
				100		100	2.5×10^{-4}	0.434	23.97
				75		125	3.75×10^{-4}	0.422	23.31
				50		150	5×10^{-4}	0	0

Çizelge 3.7 Yabani HCA I Enzimi Üzerinde Çalışılan Asetozolamid Konsantrasyonu, Hidrataz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Miktarı ve %Aktiviteleri

pH=10 Tamponu	Enzim (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Fenol Red Çözeltisi (µL)	Saf Su (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL) (asetozolamid)	İnhibitör Çözeltisinin Konsantrasyonu (mM)	Aktivite [(t ₀)-(t _c)]/(t _c)	% Aktivite
400	hCA-I	100	2000	200	1200	-	-	1.81	100
				175		25	0.625×10^{-3}	1.22	67.40
				150		50	1.25×10^{-3}	0.75	41.43
				100		100	2.5×10^{-3}	0.538	29.72
				50		150	3.75×10^{-3}	0.434	23.97
				-		200	5×10^{-3}	0.126	6.96



Şekil 3.19 Saf HCA I Enzimi Üzerinde Sülfonamidin Farklı Konsantrasyonları İçin Elde Edilen%Aktivite-[Sülfonamid] Grafiği



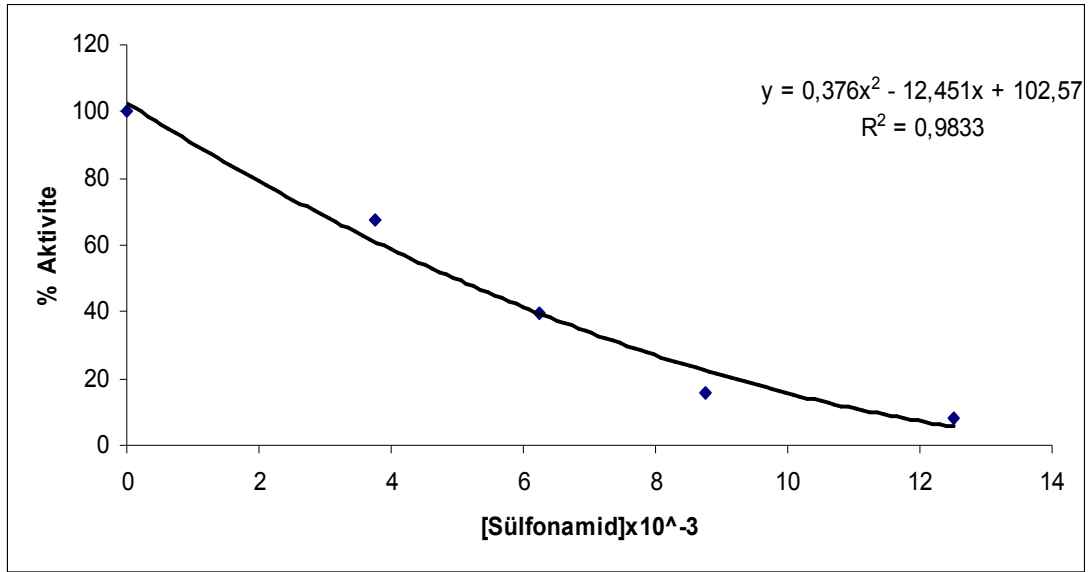
Şekil 3.20 Saf HCA I Enzimi Üzerinde Asetozolamidin Farklı Konsantrasyonları İçin Elde Edilen%Aktivite-[Asetozolamid] Grafiği

Çizelge 3.8 Phe91Asn Mutantı Üzerinde Çalışılan Sülfonamid Konsantrasyonu, Hidrataz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Miktarı ve %Aktiviteleri

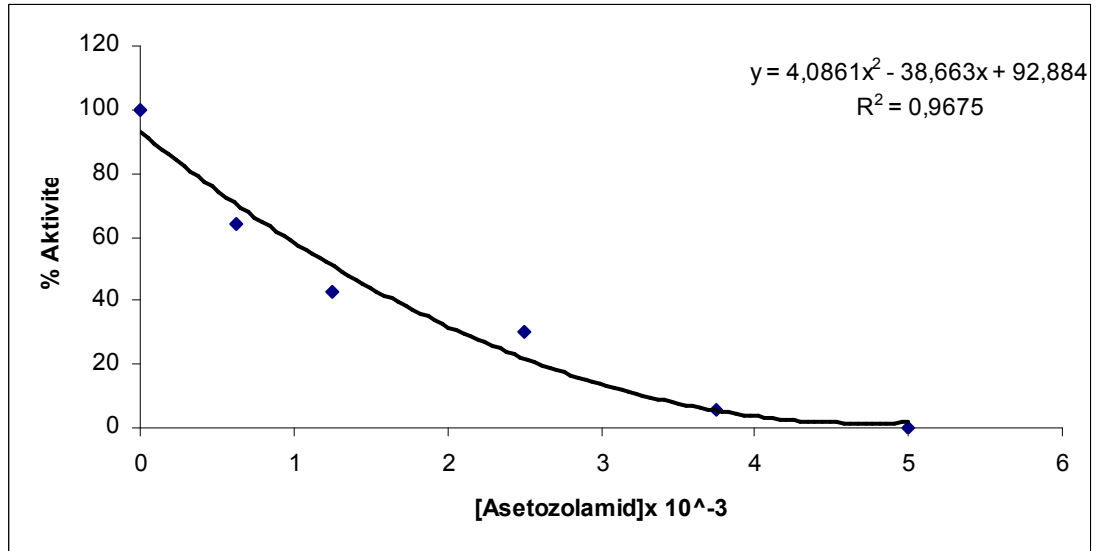
pH=10 Tamponu	Enzim (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Fenol Red Çözeltisi (µL)	Saf Su (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL) (sülfonamid)	İnhibitör Çözeltisinin Konsantrasyonu (M)	Aktivite [(t ₀)-(t _c)]/(t _c)	% Aktivite
400	hCA-I	100	2000	200	1200	-	-	1.923	100
				185		15	3.75×10^{-5}	1.300	67.60
				175		25	6.25×10^{-5}	0.759	39.46
				165		35	8.75×10^{-5}	0.307	15.96
				150		50	12.5×10^{-5}	0.159	8.26
				100		100	25×10^{-5}	0.0918	4.77

Çizelge 3.9 Phe91Asn Mutantı Üzerinde Çalışılan Asetozolamid Konsantrasyonu, Hidrataz Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Miktarı ve %Aktiviteleri

pH=10 Tamponu	Enzim (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Fenol Red Çözeltisi (µL)	Saf Su (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL) (asetozolamid)	İnhibitör Çözeltisinin Konsantrasyonu (mM)	Aktivite [(t ₀)-(t _c)]/(t _c)	% Aktivite
400	hCA-I	100	2000	200	1200	-	-	1.923	100
				175		25	0.625×10^{-3}	1.234	64.17
				150		50	1.25×10^{-3}	0.824	42.84
				100		100	2.5×10^{-3}	0.582	30.26
				50		150	3.75×10^{-3}	0.110	5.72



Şekil 3.21 Saf Phe91Asn Mutantı Üzerinde Sülfonamidin Farklı Konsantrasyonları İçin Elde Edilen %Aktivite-[Sülfonamid] Grafiği



Şekil 3.22 Saf Phe91Asn Mutantı Üzerinde Asetozolamidin Farklı Konsantrasyonları İçin Elde Edilen %Aktivite-[Asetozolamid] Grafiği

Çizelge 3.10 Yabani HCA I Enzimi ve Phe91Asn Mutantı IC₅₀ değerleri

Enzim	Sülfonamid	Asetozolamid
Yabani HCA I	IC ₅₀ = 1.257x 10 ⁻⁴ M	IC ₅₀ = 1.376x 10 ⁻⁶ M
Phe91Asn Mutantı	IC ₅₀ = 0.468x10 ⁻⁴ M	IC ₅₀ = 1.283x10 ⁻⁶ M

3.6.1 Yabani ve Mutant HCA I Enzimlerinin Esteraz Aktivitelerinin Ölçülmesi

Yabani ve mutant HCA I enzimlerinin esteraz aktiviteleri bölüm 2.2.5.9.2 'de belirtien şekilde ölçüldü ve aşağıdaki formüle ve bradford tayininde belirlenen mg/mL protein değerinden spesifik aktiviteleri hesaplandı [35].

$$EU = \frac{\text{Küvet hacmi} \times \text{Enzim miktarı} \times \text{p-nitrofenilvasetat miktarı (mmolar)}}{\epsilon \times d}$$

ϵ = p-nitrofenolün molar ekstrikasyon katsayısı

d = 1cm (ışık yolu)

Yabani HCA I enzimi için spesifik aktivite 1.053×10^{-3} , mutant HCA I enzimi için spesifik aktivite ise 0.428×10^{-3} olarak hesaplanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Karbonik Anhidraz Prokaryot, Ökaryot ve *Archaea* 'da yaygın olarak bulunan ve yapısında Zn^{+} iyonu bulunduran bir metaloenzimdir. 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. 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, CA VA - CA VB mitokondride, CA VI tükürük ve süt salgılarında ve NonO/p54^{nrb} nükleusta bulunmaktadır [1-3, 7, 11-13, 15, 16, 28, 43, 48].

Canlılarda geniş bir dağılım gösteren Karbonik Anhidraz izoenzimleri metabolizma için büyük önem taşıyan temel görevlerde rol oynamaktadır. Omurgalıları da içeren yüksek organizmalarda, CA I, II, ve IV izoenzimleri asit-baz dengesinin sağlanmasında ve solunumda görevlidir [47]. CA II izoenzimi osteoklastın farklılaşmasını sağlar ve kemik gelişiminde de rol oynar [48, 52]. Doku ve organlardan elektrolitlerin salgılanmasında, koku ve tat almada da CA izoenzimleri görevlidir. Bu sayede gastrointestinal sistem çok yüksek ya da çok düşük pH koşullarından korunmuş olur [47, 48]. CA V gibi bazı izoenzimler hücre içi sinyal iletim sürecinde görev alır [7]. (Pankreasın β hücrelerinden insülin salgılanması). II ve V numaralı izoenzimler glukoneogenez için bikarbonat sağlarlar ayrıca yağ asitlerinin *de-novo* biyosentezi ve primidin bazı sentezi sürecinde de rol oynarlar. Son çalışmalar ise IX, XII, CARP VIII izoenzimlerinin tümörlerle bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur [7].

Karbonik Anhidrazın sülfonilamid I ile inhibisyonunun Mann ve Keilin tarafından keşfi bazı önemli ilaçların dizayn edilebilmesini sağlamıştır [38]. İnhibitör özelliği taşıyan sülfonamidlerden göz tansiyonu, tiroid, nörolojik ve

nöromusküler düzensizliklerin tedavisinde yararlanılmaktadır. Ayrıca sülfonamidler diüretik, anti-epileptik, anti-ülser ve anti kanser ajanı olarak da kullanılmaktadır.

α -CA ailesine ait bazı izoenzimlerin aktivasyonunun sağlanmasıyla Alzheimer, yaşlanma, hafıza kaybı terapisi gibi durumlar için yeni bir tedavi yaklaşımının oluşturulabileceği düşünülmektedir. Yaşlılarda ve Alzheimer hastalarında HCA I enzimi ekspresyon seviyesinin düşük olduğu bulunmuştur.

Hipertiroidizm görülen kişilerde tiroid hormonu artışı ile bağlantılı olarak karbonik Anhidraz I enzimi seviyesinde de artış tespit edilmiştir.

Ayrıca Glokom hastalığında Karbonik Anhidraz enzimlerinin etkili bir şekilde rol oynadığı bulunmuştur [4, 50, 51].

Karbonik Anhidraz İnhibitörleri yukarıda da değinildiği gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak izoenzime spesifik olmayan inhibitörlerin tedavi amaçlı kullanılmasıyla canlı sistemde varolan diğer CA izoenzimleri de inhibe olmaktadır. Özellikle glokom hastalığının tedavisinde HCA II enzimini inhibe etmek amacıyla sıklıkla kullanılan sülfonamidler HCA I enzimini de inhibe etmektedir [35].

Çalışmamızda sülfonamidlere karşı ilgisi az olan aynı zamanda hidrataz aktivitesini kaybetmemiş mutant HCA I enzimlerinin elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda sülfonamidlere bağlanmada etkili olduğu düşünülen hidrofobik cepte bulunan Phe91 aminoasitinin yönlendirilmiş mutagenез yoluyla daha polar olan Asn aminoasiti ile değiştirilmesine karar verilmiştir.

Bu plan doğrultusunda hCAI genini elde etmek için RT-PCR'a dayalı strateji kullanılması uygun görülmüştür. Bunun nedeni ise hCAI geninin transkribinin oldukça büyük intronlar içeriyor olmasıdır. hCA I in en bol bulunduğu yerlerden biri eritrosit hücreleri olduğu için ekspre olduğunu düşündüğümüz kronik myeloid lösemi hücre hattı olan K562 hücreleri ve akut myeloid lösemi hücre hattı olan HL60 hücreleri kullanılmıştır. İki farklı hücre hattı kullanılmasının nedeni hCAI ekspresyonunun iki modelde farklı olabileceği ihtimalidir. K562 hücreleri kemik

iliğinin farklılaşmasının geç dönemine karşılık gelmekte ve aynı zamanda kronik myeloid lösemide model teşkil etmektedir. HL60 hücreleride kemik iliği farklılaşmasının erken dönemi için ve akut myeloid lösemi için model teşkil etmektedir.

K562 ve HL60 hücre hatlarından yapılan total RNA izolasyonunu takiben hCAI genine ait primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. K562 hücre hattına ait total RNA kullanılarak kurulan PCR amplifikasyonunda agaroz jel elektroforezi sonucunda hCAI genine ait herhangi bir bant gözlenemezken HL60 hücre hattına ait total RNA kullanılarak çalışan amplifikasyonlarda 785bp 'lik bölgede hCAI geninin amplifiye olduğu gözlenmiştir. Yukarıdaki bulgulara bağlı olarak Kronik Myeloid Lösemi hastalarında CAI enzimi aktivitesi görülmesine karşın bunun bir modelini teşkil eden K562 hücre hattında hCA I geninin ekspresyonunun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın daha sonraki basamaklarında HL60 total RNA'sı kullanılarak amplifiye edilen hCA I geni sırasıyla önce pGEM-T vektörüne daha sonra mutagenез ve ekspresyon amacı ile pET21a(+) vektörüne klonlanmıştır. 1mM IPTG ile 5 saat indüklenen örnekler diyalize tabi tutularak afinite kolonuna tatbik edilmiştir. Yıkama ve elüsyon işlemlerinin her basamağındaki örnekler toplanmış 280nm 'deki absorbansları ve hidrataz aktiviteleri ölçülmüştür. Örneklerin toplam protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiş SDS PAGE ile görüntülenmiştir.

Çizelge 3.3 'deki saflaştırma tablosunda belirtildiği gibi saflaştırma katsayısı oldukça düşük olduğu gözlenmektedir. Bunun nedenini belirleyebilmek için yıkama basamağında gözlenen yüksek protein miktarı ve hidrataz aktivitesi dikkate değer bulunduğundan bu aşamadaki bazı tüpler de SDS PAGE 'e dahil edilmiştir. Bunun sonucunda HCA I enziminin afinite kromatografisinden beklenenin aksine daha düşük bir saflaştırma derecesi ile elde edilmesinin nedeninin yıkama işlemi sırasında enzimin kaybı olduğu sonucuna varılmıştır.

Bunun yanı sıra lizis ve ekspresyon basamakları süresince kullanılan Zn^{+2} iyonunun sülfonamidin yapısını bozabileceği ihtimali göz önünde bulundurularak afinite kromatografisi boyunca kullanılan tüm tamponlara 0.5mM son

konsantrasyonda EDTA eklenmiştir. Böylece EDTA'nın Zn^{+2} iyonunu ile kompleks yapması sağlanarak ligandın korunması amaçlanmıştır. Lizis basamaklarında kullanılan bazı maddelerin afinite jelinin yapısını bozmasını engellemek amacıyla elde edilen ham ekstrakt kolona uygulanmadan önce 12 saat saf suya ve 3 saat dengeleme tamponuna karşı diyaliz edilmiştir. Ancak diyalizle uzaklaştırılmayan bazı moleküllerin enzimin liganda tutunmasını belirli ölçüde engellediği ve bunun doğal sonucu olarak verimini düşürdüğü kanaatindeyiz.

Phe91Asn mutantının ekspresyonu yabani tip HCAI enzimi ile aynı koşullarda çalışılmış diyaliz işlemi sonrasında kolona tatbik edilmiştir.

Ölçülen mutant ve yabani tip hCAI enzimi hidrataz aktiviteleri arasında belirgin bir fark görülmemiştir.

İnhibisyon çalışmaları sırasında HCA I enzimini güçlü bir şekilde inhibe ettiği bilinen sülfonamid ve asetozolamid inhibitörleri kullanılmıştır. Yabani ve mutant HCA I enzimlerinin IC_{50} değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla substrat konsantrasyonu sabit tutularak farklı konsantrasyonlarda sülfonamid ve asetozolamid uygulanmıştır. Çizilen %Aktivite- [I] grafiği eğrisinden yabani tip HCA I enziminin Sülfonamid için IC_{50} değeri $1.257 \times 10^{-4} M$, Asetozolamid içinse IC_{50} değeri $1.376 \times 10^{-6} M$ olarak hesaplanmıştır.

Aynı inhibitörler mutant enzim ile de substrat konsantrasyonu sabit tutulmak suretiyle farklı konsantrasyonlarda denenmiş çizilen %Aktivite- [I] grafiği eğrisinden sülfonamid için IC_{50} değeri $0.4968 \times 10^{-4} M$, Asetozolamid için IC_{50} değeri $1.283 \times 10^{-6} M$ olarak hesaplanmıştır.

Bu değerler doğrultusunda elde edilen mutant enzimin asetozolamid ile inhibisyonunda IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında belirgin bir fark tespit edilememiştir. Benzer şekilde yabani ve mutant enzimlerin Sülfonamid ile inhibisyonu IC_{50} değeri göz önünde bulundurularak karşılaştırıldığında mutant enzimin sülfonamid ile daha fazla inhibe olduğu tespit edilmiştir.

Bu değerler, söz konusu değişikliğin enzimin sülfonamide karşı ilgisinin çok fazla değiştiiğini göstermez. Phe91Asn rezidüsünün söz konusu inhibitörle etkileşmediği söylenebilir.

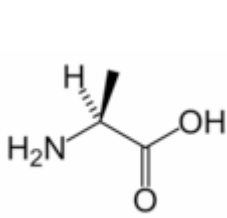
Ancak özellikle enzimin esteraz aktivitelerinin inhibisyonu ile yapılacak çalışmalar, söz konusu mutasyonun sonuçları hakkında daha güvenilir bilgiler verecektir.

Elde edilen bu sonuçların bile enzimin inhibisyonunun aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.

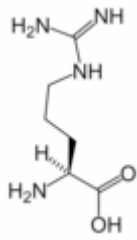
EK ŞEKİLLER

Aminoasit	Kısaltma	Tek harf kısaltma	mRNA kodonları
Alanine	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Arginine	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Asparagine	Asn	N	AAC AAU
Aspartic acid	Asp	D	GAC GAU
Cysteine	Cys	C	UGC UGU
Glutamic acid	Glu	E	GAA GAG
Glutamine	Gln	Q	CAA CAG
Glycine	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidine	His	H	CAC CAU
Isoleucine	Ile	I	AUA AUC AUU
Leucine	Leu	L	CUA CUC CUG CUU UUA UUG
Lysine	Lys	K	AAA AAG
Methionine	Met	M	AUG
Phenylalanine	Phe	F	UUC UUU
Proline	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Serine	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Threonine	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Tryptophan	Trp	W	UGG
Tyrosine	Tyr	Y	UAC UAU
Valine	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Stop codons			UAA UAG UGA

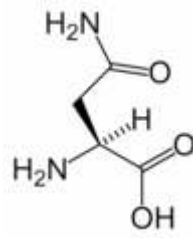
Şekil A.1 Aminoasit kodon şifreleri ve kısaltmaları [88]



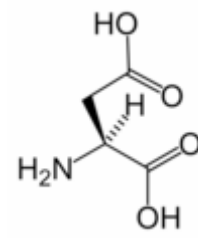
L-Alanine (Ala / A)



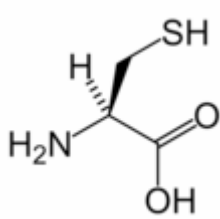
L-Arginine (Arg / R)



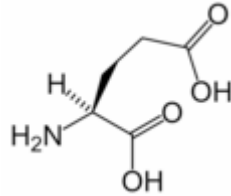
L-Asparagine (Asn / N)



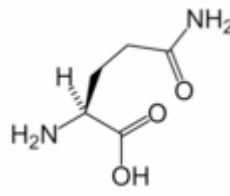
L-Aspartic acid (Asp / D)



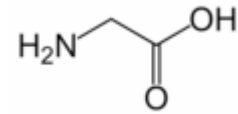
L-Cysteine (Cys / C)



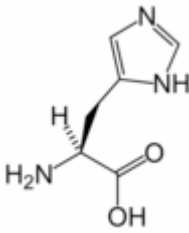
L-Glutamic acid (Glu / E)



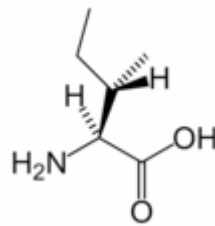
L-Glutamine (Gln / Q)



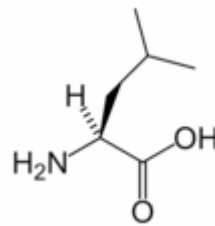
L-Glycine (Gly / G)



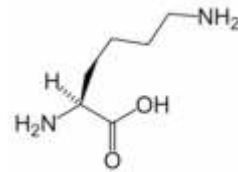
L-Histidine (His / H)



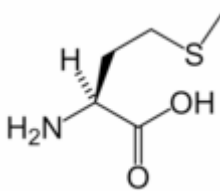
L-Isoleucine (Ile / I)



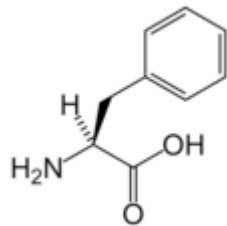
L-Leucine (Leu / L)



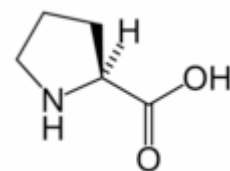
L-Lysine (Lys / K)



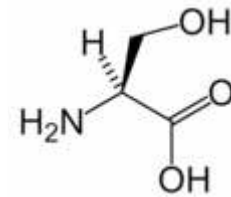
L-Methionine (Met / M)



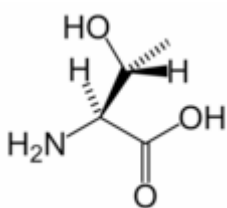
L-Phenylalanine (Phe / F)



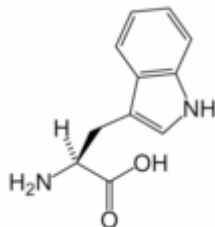
L-Proline (Pro / P)



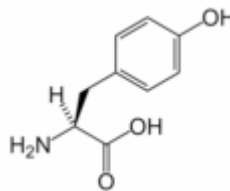
L-Serine (Ser / S)



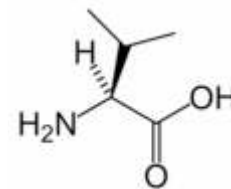
L-Threonine (Thr / T)



L-Tryptophan (Trp / W)



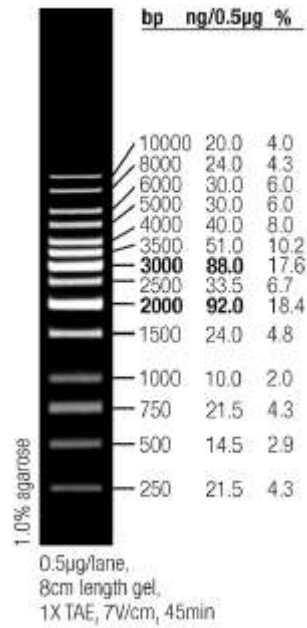
L-Tyrosine (Tyr / Y)



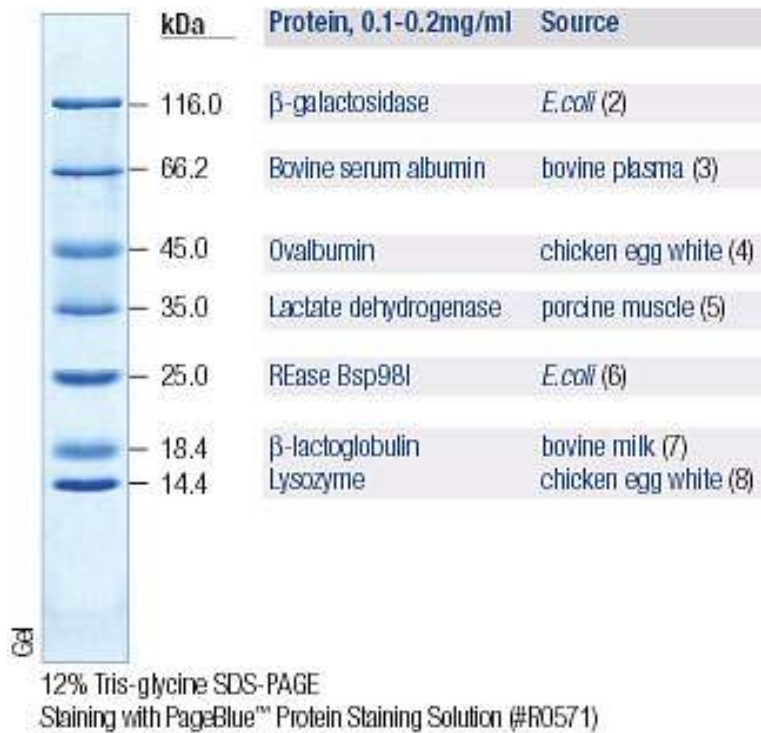
L-Valine (Val / V)

Şekil A.2 . Aminoasitlerin Açık Formülleri[88]

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder,
ready-to-use



Şekil A.3 1kb DNA Marker [89]



Şekil A.4 Protein Marker[90]

5. KAYNAKLAR

- [1] 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.
- [2] Scozzafava, A., Supuran, C.T, "Carbonic Anhydrase and Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Sulfonylated Amino Acid Hydroxamates with Mmp Inhibitory Properties Act as Efficient inhibitors of CA Isozymes I, II, and IV, and N-Hydroxysulfonamides Inhibit Both These Zinc Enzymes 1", *J. Med. Chem*, (2000), **43**, 3677.
- [3] Lindskog, S., "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase", *Pharmacol. Ther.*, (1997), **74**, (1), 1.
- [4] Supuran, C. T., Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Curr. Med. Chem. Imm., Endoc. & Metab. Agents*, (2001), **1**, 61.
- [5] http://en.wikipedia.org/wiki/Carbonic_anhydrase (16.07.2007).
- [6] Supuran, C.T., Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase as Targets for Medicinal Chemistry", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2007), In Press.
- [7] Leppilampi, M., Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX, Ph.D Thesis, Oulu, U., Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, Finland, (2006).
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.

- [11] Smith, K. S., Ferry, J.G., "A Plant-Type (B-Class) Carbonic Anhydrase in the Thermophilic Methanoarchaeon *Methanobacterium Thermoautotrophicum*", *Journal of Bacteriology*, (1999), **181**, (20), 6247.
- [12] Smith, K. S., Jakubzick, C., Whittam, T.S., Ferry, J.G., "Carbonic Anhydrase Is an Ancient Enzyme Widespread in Prokaryotes", *PNAS*, (1999), **96**, (26), 15184.
- [13] Smith, K. S., Coper, 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.
- [14] Smith, K. S., Ferry, J.G., "Prokaryotic Carbonic Anhydrases." *FEMS Microbiol Rev.*, (2000), **24**, (4), 335.
- [15] 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.
- [16] Cox, E. H., McLendon, G.L., Morel, F.M.M., Lane, T.W., Prince, R.C., Pickering, I.J., George, G.N., "The Active Site Structure of *Thalassiosira Weissflogii* Carbonic Anhydrase 1", *Biochemistry*, (2000), **39**, 12128.
- [17] Hiltonen, T., Bjorkbacka, H., Forsman, C., Clarke, A.K., Samuelsson, G., "Intracellular B-Carbonic Anhydrase of the Unicellular Green Alga *Coccomyxa*", *Plant Physiol*, (1998), **117**, 1341.
- [18] Park, H., Hall, G., Morel, F.M.M., "Diversity of the Cadmium-Containing Carbonic Anhydrase in Marine Diatoms and Natural Waters", *Environmental Microbiology*, (2007), **9**, (2), 403.
- [19] Breton, S., "The Cellular Physiology of Carbonic Anhydrases", *JOP. J. Pancreas*, (2001), **2**, (4), 159.
- [20] 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.
- [21] 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.

- [22] 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 Benzenesulfonamides", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2007), **17**, 987.
- [23] Supuran, C. T., "Carbonic Anhydrases as Drug Targets-an Overview." *Curr Top Med Chem.*, (2007), **7**, (9), 825.
- [24] 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**.
- [25] 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.
- [26] Vince, J.W., Carlsson, U., Reithmeier, R.A.F., "Localization of the Cl⁻/HCO₃⁻ Anion Exchanger Binding Site to the Amino-Terminal Region of Carbonic Anhydrase II", *Biochemistry*, (2000), **39**, 13344.
- [27] Loferer, M.J., Tautermann, C.S., Loeffler, H.H., Liedl, K.R., "Influence of Backbone Conformations of Human Carbonic Anhydrase II on Carbon Dioxide Hydration: Hydration Pathways and Binding of Bicarbonate", *J. Am. Chem. Soc.*, (2003), **125**, 8921.
- [28] Lindskog, S., Coleman, J.E., "The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (1973), **70**, (9), 2505.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.

- [32] 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.
- [33] Drummond F.J., S. J., Morrison K., Edwards Y.H., "Colon Carbonic Anhydrase 1: Transactivation of Gene Expression by the Homeodomain Protein Cdx2", *FEBS Letters*, (1998), **423**, (2), 218.
- [34] Sowden, J., Edwards, M., Morrison, K., Butterworth, P.H.W., Edwards, Y.H., "Erythroid Expression and DNAase-Hypersensitive Sites of the Carbonic Anhydrase 1 Gene", *Biochem J.*, (1992), **288**, (2), 545.
- [35] 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).
- [36] Beyaztaş, S., Bazı Bitki Gelişim Düzenleyici Bileşiklerin, Paraoksonaz Ve Karbonik Anhidraz İzoenzimler Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [37] Fiscella, R. G., Green, A., Patuszynski, D. H., and Wilensky, J., "Medical Therapy Cost Considerations for Glaucoma", *Elsevier Science Inc.*, (2003), **136**, 18.
- [38] Bayram, T., Köpek Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamidlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- [39] Barnebey, H., Kwok, Y.S., "Patients' Acceptance of a Switch from Dorzolamide to Brinzolamide for the Treatment of Glaucoma in a Clinical Practice Setting", *Clinical Therapeutics*, (2000), **10**, 1204.
- [40] Maren, T.H., Jankowska, L., Sanyal, G., and Edelhauser, H. F., "The Transcorneal Permeability of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Effect on Aqueous Humor Secretion", *Exp. Eye. Res.*, (1983), **36**, 457.
- [41] Maren, T.H., "HCO⁻³ Formation in Aqueous Humour; Mechanism and Reltion to the Treatment of Glaucoma", *Invest. Ophthalmol.*, (1974), **13**, 479.
- [42] Tarun, A. S., Bryant, B., Zhai, W., Solomon, C., Shusterman, D., "Gene Expression for Carbonic Anhydrase Isoenzymes in Human Nasal Mucosa", *Chem. Senses*, (2003), **28**, 621.

- [43] Karhumaa, P., Parkkila, S., Waheedi, A., Parkkila, A.K., Kaunisto, K., Tucker, P.W., Huang, C.J., Sly, W.S., Rajaniemi, H., "Nuclear Nono/P54nrb Protein Is a Nonclassical Carbonic Anhydrase", *The Journal of Biological Chemistry*, (2000), **275**, (21), 16044.
- [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] Park, Y., Karlsson, J., Rojdestvenski, I., Pronina, N., Klimov, V., Oquist, G., Samuelsson, G., "Role of a Novel Photosystem Ii Associated Carbonic Anhydrase in Photosynthetic Carbon Assimilation in *Chlamydomonas Reinhardtii*." *FEBS Letters*, (1999), **444**, 102.
- [46] Esbaugh, A. J., Tufts, B.L., "The Structure and Function of Carbonic Anhydrase Isozymes in the Respiratory System of Vertebrates", *Respiratory Physiology & Neurobiology*, (2006), **152**, (1-2), 185.
- [47] Maren, T. H., "Carbonic Anhydrase : Chemistry, Physiology and Inhibition", *Physiological Reviews*, (1967), **47**, 595.
- [48] Supuran, C. T., Scozzafava, A., Casini, A., "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Medicinal research reviews*, (2003), **23**, 146.
- [49] Özensoy, Ö. Eritrositlerden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı, Balıkesir, (2002).
- [50] Temperini, C., Scozzafava, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase Activators the First X-Ray Crystallographic Study of an Adduct of Isoform I", *Bioorg Med Chem Lett.*, (2006), **16**, (19), 5152.
- [51] Kikuchi, K., Yoshida, K., Endo, K., Aizawa, Y., Fukazawa, H., Mori, K., Abe, K., "Effects of Thyroid Hormone on Carbonic Anhydrase I Levels in Human Erythroid (YN-1) Cells", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, (1994), **79**, (1), 71.
- [52] Chegwidde, W. R., Wagner, L. E., Venta, P. J., Bergenhem, N. C. H., Yu, Y.-S. L., Tashian, R. E., "Marked Zinc Activation of Ester Hydrolysis by a Mutation, 67-His (CAT) to Arg (CGT), in the Active Site of Human Carbonic Anhydrase I", *Human Mutation*, (1994), **4**, (4), 294.

- [53] Engstrand, C., Jonsson, B.-H., Lindskog, S., "Catalytic and Inhibitor-Binding Properties of Some Active-Site Mutants of Human Carbonic Anhydrase I", *European Journal of Biochemistry*, (1995), **229**, (3), 696.
- [54] http://www.promega.com/pnotes/61/6222_12/6222_12_core.pdf (15.07.2007).
- [55] <http://wheat.pw.usda.gov/~lazo/methods/lazo/pcr-mut.html> (15.07.2007).
- [56] <http://www.stratagene.com/manuals/200133.pdf> (15.07.2007).
- [57] Yin, J., Li, G., Rena, X., Herrler, G., "Select What You Need: A Comparative Evaluation of the Advantages and Limitations of Frequently Used Expression Systems for Foreign Genes", *Journal of Biotechnology*, (2007), **127**, 335.
- [58] Aydoğan, S., Yönlendirilmiş Mutagenезle Mutant HCAII Genin Eldesi ve Mutant Proteinlerin İnhibitörlere Karşı İlgisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [59] Köçkar, F., Biyoteknoloji Ders Notları, Balıkesir, (2001), p. 22.
- [60] Köçkar, F. T., Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene, Ph. D. Thesis, University, C., Cardiff School of Biosciences, Cardiff, (1999).
- [61] Sorensen, H. P., "Advanced Genetic Strategies for Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli*", *J. Biotech.*, (2005), **115**, 113.
- [62] <http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/ehrmann/tools/geneexpression.htm> (15.07.2007).
- [63] Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., Mierendorf, R., "Overcoming the Codon Bias of *E. Coli* for Enhanced Protein Expression", *In Novations*, (2001), (12), 1.
- [64] Baneyx, F., "Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli*", *Current Opinion In Biotechnology*, (1999), **10**, 411.
- [65] Baneyx, F., Mujacic, M., "Recombinant Protein Folding and Misfolding in *Escherichia Coli*", *Nature Biotechnology*, (2004), **22**, (11), 1399.
- [66] Hannig, G., Makrides, S. C., "Strategies for Optimizing Heterologous Protein Expression in *Escherichia Coli*", *focus*, (1998), **16**, 54.

- [67] Yokoyama, S., "Protein Expression Systems for Structural Genomics and Proteomics", *Current Opinion*, (2003), 7, 39.
- [68] <http://www.merckbiosciences.com/g.asp?f=NVG/pETtable.htm> (15.07.2007).
- [69] Silverman, D., *Molecular techniques: Protein Chemistry and Molecular Cloning*, Interdisciplinary Center for Biotechnology Research University, Florida., "Molecular Techniques: Protein Chemistry and Molecular Cloning", *Laboratory Manual*, (2002).
- [70] Klug, W. S., Cummings, M. R., *Genetik Kavramlar*, Öner, C., Palme Yayıncılık, Ankara, (2003), p. 416.
- [71] <http://en.wikipedia.org/wiki/HL60> (15.07.2007).
- [72] <http://www.tcd.ie/Genetics/staff/Noel.Murphy/recombinant%20dna%20ge4021/pgem.pdf> (15.07.2007).
- [73] http://www.fhrc.org/science/labs/hahn/methods/biochem_meth/pet.pdf (15.07.2007).
- [74] <http://www.promega.com/faq/pgemt.html> (15.07.2007).
- [75] <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000291> (15.07.2007).
- [76] www.cf.ac.uk/biosi/staff/ramji/man1.html (15.07.2007).
- [77] <http://www.protocol-online.org> (15.07.2007).
- [78] <http://images.google.com.tr> (15.07.2007).
- [79] <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/HSRT20bul.pdf> (15.07.2007).
- [80] Temizkan, G., *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel tıp kitabevleri, İstanbul, (2004).
- [81] <http://molecool.wustl.edu/krolllab/PDFs/Gel%20extraction-Qiagen.pdf> (15.07.2007).

- [82] Bradford, M., "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Anal. Biochem*, (1976), **72**, (248).
- [83] Laemmli, U. K., "Cleavage of the Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, (1970), **227**, (229), 680.
- [84] <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer> (15.07.2007).
- [85] http://en.wikipedia.org/wiki/Blue_white_screen (15.07.2007).
- [86] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (15.07.2007).
- [87] <http://bioinformatics.org/primerx/> (15.07.2007).
- [88] http://www.hgmd.cf.ac.uk/docs/cd_amino.html (15.07.2007).
- [89] <http://www.fermentas.com/profiles/electrophoresis/pdf/generuler1kb031> (18.02.2007).
- [90] <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/marksm0441.htm> (14.02.2007).