

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

**YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ İLE MUTANT HCAII GENİNİN ELDESİ
VE MUTANT PROTEİNLERİN İNHİBİTÖRLERE KARŞI İLGİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜMEYYE AYDOĞAN

Balıkesir, Eylül 2006

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

YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ İLE MUTANT HCAII GENİNİN ELDESİ
VE MUTANT PROTEİNLERİN İNHİBİTÖRLERE KARŞI İLGİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜMEYYE AYDOĞAN

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

Sınav Tarihi: 01 Eylül 2006

Jüri Üyeleri: Doç.Dr.Feray KÖÇKAR
Yard.Doç.Dr.Ekrem DÜNDAR
Yard.Doç.Dr.Turgut KILIÇ

Balıkesir, Eylül 2006

**Bu yüksek lisans çalışması Balıkesir Üniversitesi 2006 / 35 No'lu
Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.**

ÖZET

YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ İLE MUTANT HCAII GENİNİN ELDESİ VE MUTANT PROTEİNLERİN İNHİBİTÖRLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sümeyye AYDOĞAN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı

(Yüksek Lisans tezi / Tez Danışmanı : Doç. Dr. Feray KÖÇKAR)

Yardımcı Danışman: Prof.Dr.Oktay Arslan

Balıkesir, 2006

Karbonik anhidraz enzimleri (Karbonat hidrolizaz, CA, E.C.4.2.1.1), CO₂ ve H₂O'den HCO₃⁻ iyonlarının geri dönüşümlü reaksiyonunu katalizleyen bir enzim ailesidir.

α , β , γ , δ ve ϵ -CA olarak bilinen evrimsel olarak ilgisiz beş CA gen ailesi vardır. Hayvanlar alemindeki bütün CA'lar α tipindedir. İnsanları da kapsayan yüksek omurgalılarda, çok farklı hücresel yerleşimler ve doku dağılımları ile 14 farklı α -CA izoenzimi saptanmıştır.

HCAII enzimi asetazolamid, sulfonamid, metazolamid ve diklorfenamid gibi glaucoma tedavisinde kullanılan ilaçların hedefidir. Fakat sulfonamidlerin 14 izoformu içeren CA izoenzimlerine karşı spesifikliğı düşüktür ve ilgili hastalıkların tedavi sürecinde yan etkilerle karşılaşılabilir. Bu yüzden enzimin inhibisyon mekanizmasının daha spesifik inhibitörlerin geliştirilmesi için aydınlatılması önemlidir.

Bu çalışmanın amacı katalitik merkezle ilgili olan bazı amino asitleri ortaya çıkarmaktır. PCR'a dayalı olarak kullanılan yönlendirilmiş mutageniz, Asparajin67 aminoasiti hidrofob İzolösin amino asitiyle, Lösin204 aminoasiti hidrofil Serin aminoasiti ile değiştirilmesinde kullanılmıştır. Mutant ve yabani tip proteinlerin ekspresyonu *E.coli*'de

optimize edilen koşullarda IPTG kullanılarak yapıldı. pET31b vektörü içerisindeki mutant HCAII proteinlerinin ekspresyonu BL21 hücresinde IPTG indüksiyonu ile yapıldı. Ekspre edilen proteinlerin saflaştırılması CA spesifik afinite kromatografisi ile yapıldı. Mutant ve yabani tip enzimlerin saflıkları SDS-PAGE elektroforezi ile kontrol edildi. Ekspre edilen proteinlerin miktarları Bradford yöntemi ile hesaplandı. Mutant ve yabani tip enzimlerin CO₂ hidrasyon aktivitesi ölçüldü. Mutant ve yabani tip enzimlerin, glaucoma hastalığı tedavisinde yaygın olarak kullanılan inhibitörlere (sülfonamid ve asetazolamid) karşı inhibisyonları ve IC₅₀ değerleri belirlendi.

Asn67Ileu mutant HCAII enziminin $2,1 \times 10^{-5}$ M ve $0,0285 \times 10^{-3}$ mM olan IC₅₀ değerleriyle mutant enzime göre inhibisyonu daha fazla olarak gözlendi. Tersine Leu204Ser mutant enzimin asetazolamid ve sülfonamid inhibitörlerine karşı inhibisyonu $2,52 \times 10^{-5}$ M ve $0,422 \times 10^{-3}$ mM IC₅₀ değerleriyle daha düşük olarak tespit edildi.

Anahtar sözcükler : HCAII, yönlendirilmiş mutagenез, ekspresyon, saflaştırma, inhibisyon

ABSTRACT

CONSTRUCTION OF MUTANT HCAII GENES by SITE DIRECTED MUTAGENESIS AND INVESTIGATION OF AFFINITY OF THESE MUTANT PROTEINS AGAINST SOME INHIBITORS

Sümeyye AYDOĞAN

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Thesis / Supervisor : Doç.Dr.Feray KÖÇKAR)

Co Supervisor : Prof.Dr.Oktay ARSLAN

Balıkesir-Turkey, 2006

Carbonic anhydrases (CAs) are a family of enzymes which catalyse the reversible reaction from H₂O and CO₂ to HCO₃⁻ ions. There are five evolutionarily unrelated CA families, designated α , β , γ , δ ve ϵ -CA. All known CAs from the animal kingdom are of the alpha type. There are fourteen mammalian CA isozymes with different tissue distributions and intracellular locations, in higher vertebrates, including human.

The HCAII enzyme is the target for drugs, such as acetazolamide, methazolamide and dichlorphenamide for the treatment of glaucoma. However, since the specificity of sulphonamides against CA enzymes that consist of 14 isoforms is low, the adverse effect could be encountered during the treatment of the related diseases. Therefore, it is important to elucidate the inhibition mechanism of the enzyme in order to develop more specific novel inhibitors.

Thus, the aim of the study is to identify some amino acids that may be involved in catalytic centre. PCR Site directed mutagenesis strategy has been performed replacing Asn67 to a hydrophobic amino acid, Isoleucin and Leu204 to hydrophilic amino acid, Serin. The expression of the mutant protein was performed in *E coli* with the optimized condition by inducing IPTG. Mutant HCAIIs in pET31b vector were expressed in BL21 cells by including

IPTG. The expressed proteins were purified by CA specific affinity chromatography. Integrity of mutant and wild type enzyme was checked by SDS-page analysis. Bradford assay was performed for determination of concentrations of expressed proteins. CO₂ hydration activity of mutant and wild-type enzymes was performed. Inhibition of these mutant and wild type enzyme was determined by IC₅₀ values against some inhibitors (sulphonilamide and acetazolamide) widely used for the treatment of glaucoma.

Asn67Ileu mutants has higher inhibition affinity than wild type with IC₅₀ values of $2,1 \times 10^{-5}$ M, $0,0285 \times 10^{-3}$ mM. In contrast Leu204Ser mutant has lower affinity to sulphonilamide and acetazolamide than the wild-type HCAII with $2,52 \times 10^{-5}$ M, $0,422 \times 10^{-3}$ mM.

Key words : HCAII, site directed mutagenesis, expression, purification, inhibition

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	i
ABSTRACT, KEY WORD	iii
İÇİNDEKİLER	v
SEMBOL LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖNSÖZ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi	2
1.1.1. Sınıflandırılması, Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	2
1.1.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	4
1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları	4
1.1.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	6
1.1.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	8
1.1.6. Karbonik Anhidraz II İzoenzimi	9
1.1.7. HCAII Geninde Yönlendirilmiş Mutagenез	11
1.2. Mutagenез Teknikleri	14

1.2.1. Rastgele Mutagenizasyon Teknikleri	14
1.2.2. Oligonükleotid-Yönlendirilmiş Mutagenizasyon Teknikleri	16
1.3. Prokaryotlarda Rekombinant Protein Ekspresyon Sistemleri	18
1.4. Protein Saflaştırma Teknikleri	24
1.4.1. Afinité Kromatografisi	24
1.4.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Afinité Kromatografisi ile Saflaştırılması	26
1.5. Amaç	26
2. MATERYAL VE METOD	29
2.1. MATERYAL	29
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	29
2.1.3. Bakteriyel Soylar ve Plasmidler	30
2.1.4. Tamponlar ve Çözeltiler	31
2.1.4.1. <i>E.coli</i> için Bakteriyel Kültür Ortamları	31
2.1.4.2. Antibiyotik Hazırlanması	31
2.1.4.3. Plasmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar	31

2.1.4.4. Agaroz Jel Elektroforez Tamponları	32
2.1.4.5. Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlama Tamponları	33
2.1.4.6. Protein Ekspresyonunda Kullanılan Tamponlar	34
2.1.4.7. Sepharoz 4B-L-tirozin-sulfonamid Afinite Jel Tamponları	34
2.1.4.8. CA-CO ₂ Hidrataz Enzim Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar	36
2.1.4.9. Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözelti	37
2.1.4.10. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez Tamponları	37
2.2. METOD	40
2.2.1. Cam Malzeme ve Plastik Malzemenin Hazırlanması	40
2.2.2. DNA ile İlgili Teknikler	40
2.2.2.1. Plasmid DNA İzolasyonu	40
2.2.2.2. Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu	40
2.2.2.3. Etanol Çöktürmesi	41
2.2.2.4. DNA Miktarı ve Kalitesinin Ölçülmesi	41
2.2.2.4.1. Spektrofotometrik Yöntemler	41
2.2.2.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi	41
2.2.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	42
2.2.3. Mikrobiyolojik Metodlar	43

2.2.3.1.Ön Kültür Hazırlanması	43
2.2.3.2. Bakteri Stoklarının Korunması	43
2.2.3.3. Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlanması	43
2.2.3.4. Transformasyon	44
2.2.3.5. Rekombinant Protein Ekspresyonu	44
2.2.3.5.1. IPTG Kullanılarak Hedef Proteinin İndüklenmesi	44
2.2.3.5.2. Bakterilerin Yıkanması	45
2.2.3.5.3. Bakteri Hücrelerinin Lizisi	45
2.2.4. Biyokimyasal Metodlar	45
2.2.4.1. Afinite Kromatografisi Metoduna Göre Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması	45
2.2.4.1.1. Diyaliz	45
2.2.4.1.2. Afinite Kromatografisi	46
2.2.4.1.2.1. Karbonik Anhidraz Afinite Jelinin Hazırlanması	46
2.2.4.2. Protein Karakterizasyon Metodları	47
2.2.4.1. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	47
2.2.4.2. SDS-PAGE	47

2.2.4.3. Aktivite Tayin Metodları	48
2.2.4.3.1. CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi	48
2.2.4.4. İnhibisyon Çalışması	49
3. BULGULAR	50
3.1. pET31-HCAII Plasmidi	50
3.2. HCAII Geninde Yönlendirilmiş Mutageniz Stratejisi	51
3.3 Mutasyonların Otomatik Dizi Analizi Sonuçları	52
3.4. HCAII'nin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	56
3.4.1. Yabani ve mutant HCAII'nin ekspresyon stratejisi	56
3.4.2. Yabani ve mutant HCAII'nin saflaştırılması	58
3.5. İnhibisyon Sonuçları	63
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	71
EK ŞEKİLLER	78
KAYNAKLAR	81

SEMBOL LİSTESİ

<u>Simge</u>	<u>Adı</u>
BSA	Sığır serum albumini
CA	Karbonik anhidraz enzimi
CNBr	Siyanojen bromür
DNA	Deoksiribonükleik asit
E.C.	Enzim kod numarası
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetrasedik asit
EGTA	Ethylenglikoltetrasedik asit
HCAII	İnsan karbonik anhidraz İzoenzim II
IOP	Yüksek göz içi basıncı
IPTG	İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit
Kb	Kilobaz
kDA	Kilodalton
OD	Optik Yoğunluk
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBS	Ribozomal Bağlanma Bölgesi
SD	Shine Dalgarno
SDS	Sodium dodesi sülfat
TIR	Translasyon başlangıç bölgesi
U	Enzim Ünitesi
UV	Ultra-viyole

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki lokalizasyonları	3
Şekil 1.2	Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri	6
Şekil 1.3	CA enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi	7
Şekil 1.4	HCA II enziminin aktif bölgesi	9
Şekil 1.5	<i>In vitro</i> mutagenезin temel basamakları	15
Şekil 1.6	Afinite kromotografisinin şematik gösterilişi	26
Şekil 1.7	HCAII enziminin aktif bölgesi ve seçilen aminoasitler	28
Şekil 2.1	pET 31 plasmidi	31
Şekil 3.1	Alkalin Lizis Miniprep Metodu ile Elde Edilen pET31-HCAII Plasmidin Agaroz Jel Elektroforez Sonucu	50
Şekil 3.2	Yönlendirilmiş Mutagenез Prosedürünün Temel Basamakları	53
Şekil 3.3	Yabani tip HCAII (Yab.Tip.) X Asparajin67İzolösün Mutant HCAII (Asn67Ileu) Nukleotit Karşılaştırılması	54
Şekil 3.4	Yabani tip HCAII (Yab.Tip.) X Lösın204Serin Mutant HCAII (Lös204Ser) Nukleotit Karşılaştırılması	55
Şekil 3.5	IPTG uygulaması ile rekombinant protinlerin ekspresyonu	57

Şekil 3.6	Ham ekstraktların SDS PAGE Sonucu	58
Şekil 3.7	Protein Miktarlarına Göre Afiniteye yüklenen ham ekstraktların ve saf enzimlerin SDS Page sonucu	59
Şekil 3.8	Yabani Tip HCA II saflaştırma grafiği	60
Şekil 3.9	Asparajin67İzolösün Mutant HCAII saflaştırma grafiği	61
Şekil 3.10	Lösın204Serin Mutant HCAII saflaştırma grafiği	62
Şekil 3.11	Sülfonamitin saflaştırılmış yabani tip HCA II enzimi üzerine inhibisyon grafiği	67
Şekil 3.12	Asetazolimid saflaştırılmış yabani tip HCA II enzimi üzerine inhibisyon grafiği	67
Şekil 3.13	Sülfonamitin saflaştırılmış Asparajin67İzolösün Mutant HCAII enzimi üzerine inhibisyon grafiği	68
Şekil 3.14	Asetazolimitin saflaştırılmış Asparajin67İzolösün Mutant HCAII enzimi üzerine inhibisyon grafiği	68
Şekil 3.15	Sülfonamitin saflaştırılmış Lösın204Serin Mutant HCAII enzimi üzerine inhibisyon grafiği	69
Şekil 3.16	Asetazolimitin saflaştırılmış Lösın204Serin Mutant HCAII enzimi üzerine inhibisyon grafiği	69
Şekil 4.1	Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması	72
Şekil 4.2	Sülfonamid ve Asetazolamid moleköl formülleri	76
Şekil A.1	Aminoasit kodon şifreleri ve kısaltmaları	78

Şekil A.2	20 aminoasidin sembol ve açık yapıları	79
Şekil A.3	DNA Marker	80
Şekil A.4	Protein Marker	80

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1	Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	4
Çizelge 1.2	α -CA'lar, CO ₂ hidrasyon aktiviteleri ve sülfonamide olan ilgileri	9
Çizelge 2.1	Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	29
Çizelge 2.2	Solusyon I	31
Çizelge 2.3	Solusyon II	32
Çizelge 2.4	Solusyon III	32
Çizelge 2.5	(0,5)xTBE (Tris-Borate) Tampon	32
Çizelge 2.6	6x DNA Yükleme tamponu	33
Çizelge 2.7	Kompetent Hücre İçin Kullanılan Solusyon	33
Çizelge 2.8	Kompetent Hücre İçin Kullanılan Tritilasyon tamponu	33
Çizelge 2.9	Bakteri Yıkama tamponu	34
Çizelge 2.10	Lizis Tamponu	34
Çizelge 2.11	Afinite Jeli Dengeleme Tamponu	34
Çizelge 2.12	Afinite Jeli Yıkama Tamponu	35
Çizelge 2.13	Afinite Jeli Elüsyon Tamponu	35
Çizelge 2.14	CO ₂ Hidrataz Aktivite Tamponu	36
Çizelge 2.15	CO ₂ Hidrataz Aktivitesi İndikatör Tamponu	36
Çizelge 2.16	CO ₂ Hidrataz Aktivitesi CO ₂ Çözeltisi	36
Çizelge 2.17	Breadford Boyama Çözeltisi	37
Çizelge 2.18	Standart BSA Çözeltisi	37
Çizelge 2.19	Ayırma Jeli (%12)	37
Çizelge 2.20	Yığıma Jeli (%5)	38
Çizelge 2.21	Tank Tamponu	38
Çizelge 2.22	Numune Tamponu	38
Çizelge 2.23	Boyama Çözeltisi	39
Çizelge 2.24	Arıtma Çözeltisi	39
Çizelge 2.25	Mutagenez PCR Reaksiyonları	42
Çizelge 2.26	Mutagenez PCR Koşulları	42
Çizelge 3.1	HCAII Mutagenez Primerleri	51
Çizelge 3.2	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan yabancı tip HCAII'nin	60

	saflaştırma tablosu	
Çizelge 3.3	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan Asparajin67İzolösün Mutant HCAII'nin saflaştırma tablosu	61
Çizelge 3.4	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan Lösın204Serin Mutant HCAII' saflaştırma tablosu	62
Çizelge 3.5	Kullanılan İnhibitörlerin Stok Çözelti Konsantrasyonları	63
Çizelge 3.6	Yabani Tip üzerinde çalışılan inhibitörlerin IC ₅₀ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları, bu değerlere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları ve hidrataz aktivitesi verileri	64
Çizelge 3.7	Asparajin67İzolösün 67 Mutant HCAII üzerinde çalışılan inhibitörlerin IC ₅₀ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları, bu değerlere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları ve hidrataz aktivitesi verileri	65
Çizelge 3.8	Lösın204Serin Mutant HCAII üzerinde çalışılan inhibitörlerin IC ₅₀ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları, bu değerlere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları ve hidrataz aktivitesi verileri	66
Çizelge 3.9	Yabani tip HCAII, Asparajin67İzolösün Mutant HCAII, Lösın204/Serin204 Mutant HCAII enzimlerinin IC ₅₀ değerleri	70

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmamın deneysel kısmı, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya laboratuvarlarında, Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr.Feray KÖÇKAR ve Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve dekanı Prof.Dr.Oktay ARSLAN yönetiminde gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın tamamlanmasında engin bilgilerinden yararlandığım, çalışmam süresince beni yönlendiren, benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım DoçDr.Feray KÖÇKAR ve Prof.Dr.Oktay ARSLAN'a ,

Çalışmalarımın deneysel kısmını gerçekleştirdiğim, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde çalışmamda katkıları bulunan başta merkez müdürü Doç.Dr.Hakan KÖÇKAR'a ve tüm personeline,

Çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen, yorulduğum anlarda her zaman yanımda olan; Dr.Selma SİNAN'a, Hatice YILDIRIM'a, Meltem AYDIN'a, Semra IŞIK'a, Serap BEYAZTAŞ'a ve Görkem DENİZ'e,

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini aldığım, hep yanı başımda olan sevgili aileme ve anlayışıyla beni yalnız bırakmayan nişanlım Melih TÜRKOĞLU'na,

En içten saygı ve sevgilerimi sunarım,
İyi ki varsınız.

1. GİRİŞ

Organizmada temel görevi asid-baz dengesini düzenlemek olan karbonik anhidraz Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir. Memelilerde α -CA ailesine bağlı aktif olan 14 karbonik anhidraz izoenzimi bulunmaktadır. Karbonik anhidraz izoenzimleri hücrel dağılımları, kinetik özellikleri ve inhibisyon profilleri açısından farklılık göstermektedirler. Ayrıca CA izoenzimlerinin doku dağılımları da farklılık göstermektedir [1-13].

Aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran karbonik anhidraz enzimi, canlılarda CO_2 molekülünün hidratasyonunu ve HCO_3^- iyonunun dehidratasyonunu katalizler. Karbonik Anhidraz enzimi, genel olarak metabolik CO_2 transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- birikiminde de rol oynamaktadır. Böylece vücuttaki birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- iyonlarının birikimini sağlayarak, vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında da önemli rolü vardır [1, 14-16].

CA II, kromozom 8'de lokalize olan ve 17 kb uzunluğunda bir gen tarafından kodlanan 29,3 kDa büyüklüğünde olan bir proteindir. CA II diğer izoenzimlere göre katalitik aktivitesi oldukça yüksektir, insan doku ve organlarında yaygın olarak rastlanmaktadır [17, 18].

Yüksek göz içi basıncı ile (IOP) ortaya çıkan glaucoma en ciddi göz hastalıklarından birisidir. Glaucoma göz hastalıkları içinde % 15-20 oranı ile körlüğe neden olan bir göz hastalığıdır. Göz retinasında bulunan HCAII göz içi basıncı oluşumunun başlıca sorumlusudur. Glaucomlu hastalarda IOP'yu düşürmenin en etkili yolu HCAII aktivitesini bloke etmektir. Bu amaçla başta asetazolamid olmak üzere heteroaromatik sülfonamidler uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Ancak oral yolla verilen söz konusu bileşiklerin HCAII yanında diğer izoenzimleride inhibe etmesi önemli yan etkiler ortaya çıkarmaktadır. Bu amaçla HCAII enzime spesifik diğer sülfonamid türevleri sentezlenmiş ve inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Ancak yapılan çalışmalar sonucu klinikte kullanılan asetazolamid bileşiğinden yan etkileri daha az daha güçlü bir inhibitör sentezi başarılamamıştır [19, 20].

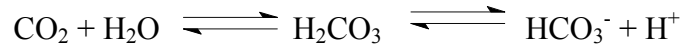
Araştırmamızda yönlendirilmiş mutagenез ile Asparajin 67 aminoasiti İzolösin, Lösin 204 aminoasiti Serin aminoasitine değiştirilecektir. Sülfonamidlere afinitesi yüksek mutant HCAII enzimleri elde edilecektir. Bu sayede daha düşük dozda ilaç kullanarak yan etkilerin

en aza indirileceği düşünülmektedir. Ayrıca araştırmamızda elde edilen bulguların inhibisyon mekanizmasının daha ayrıntılı aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz. Böylece HCAII'ye karşı daha güçlü ve etkili inhibitörlerin gelişimine katkı sağlanacaktır. [21, 22].

1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

1.1.1.Sınıflandırılması, Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (Karbonat Hidroliyaz E.C.4.2.1.1), bütün organizmalarda bulunan Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimdir. İlk olarak, sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz, canlılarda CO_2 molekülünün hidratasyonunu ve HCO_3^- iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen bir enzimdir [1, 2].

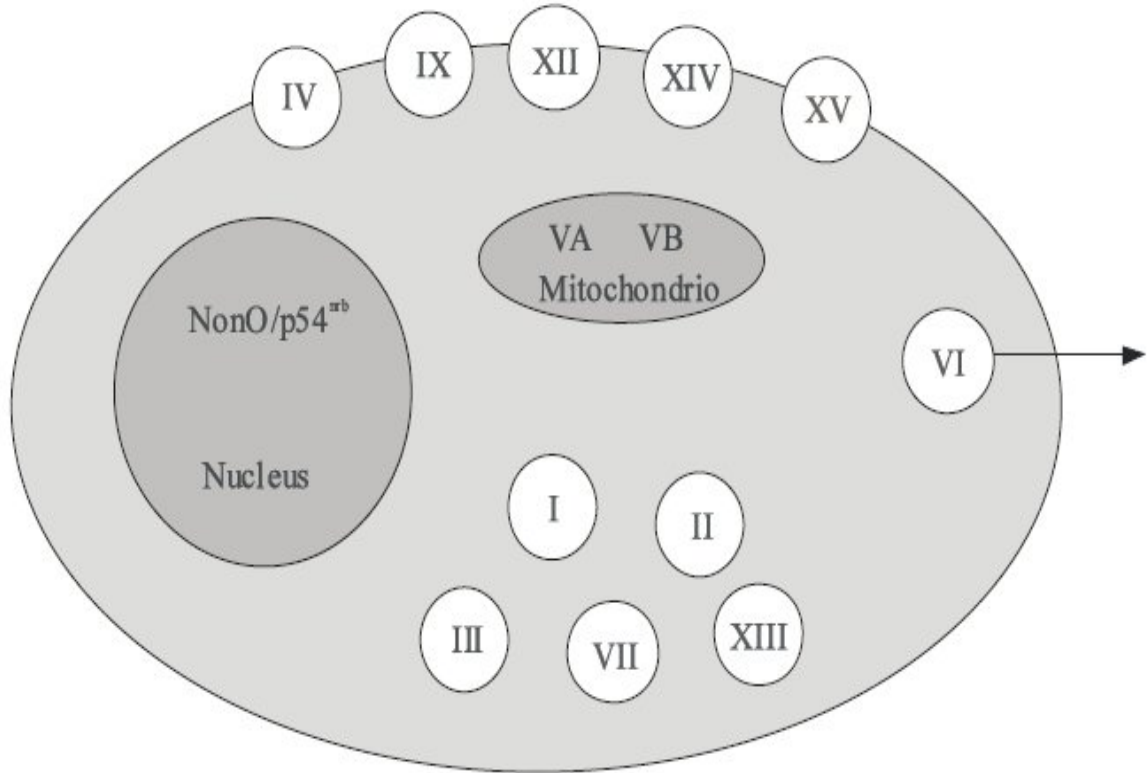


Karbonik Anhidraz enzimi, genel olarak metabolik CO_2 transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- birikiminde de rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metodlarla tükrük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA'ya rastlanmıştır. Balıkların solungaç ve salgı organlarında bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır [1, 14-16].

Bütün bilinen CA'lar, α -, β -, γ -, δ - ve ϵ -CA olmak üzere beş CA gen ailesi olarak sınıflandırılmıştır [3-7].

α -sınıfının birçok izoformu bütün omurgalı dokularda bulunur. Bunun dışında, β -sınıfının izoformları, yüksek bitkilerde ve siyanobakterileri de içeren alglerde yaygındırlar. β ve γ izoformları, başta bakteriler olmak üzere prokaryotların geniş bir aralığında bulunur. Tek δ -CA, marine diatom *Thalassosira weissfloggi*'de saptanmıştır [23-25]. ϵ -sınıfının temsilcisi son zamanlarda *Chemolithautrophic* bakteride keşfedilmiştir [7]. Bu sınıfların aminoasit dizileri düzeyinde önemli benzerliği yoktur ve bütün katlanmalar onların bağımsız orijinlerini belirtir.

Şimdiye kadar insanları da kapsayan yüksek omurgalılarda, çok farklı hücresel yerleşimler ve doku dağılımları ile, 14 farklı α -CA izoenzimi tanımlanmıştır. 5 tanesi sitoplazmada bulunur (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII), 5 tanesi hücre membranına bağlı olarak bulunur (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV), 2 tanesinin mitokondriyal (CA VA ve CA VB) ve bir tanesinin ise salgılanan bir enzim (CA VI) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, henüz sınıflandırılmamış formu olan NonO/p54^{nb} tanımlanmıştır [8-13, 16].



Şekil 1.1 Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki lokalizasyonları [18]

Karbonik anhidrazın değişik izoenzimleri farklı dokulara dağılmış olarak bulunur. Bazı izoenzimler aynı dokuda birlikte bulunduğu gibi (eritrosit CA-I ve CA-II), diğer bazı dokularda tek bir izoenzim bulunmaktadır (membrana bağlı CA-IV).

1.1.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO₂ molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyamide, aldehidin geminal diol hidratasyon reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında, çizelge 1.1’de gösterildiği gibi elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat, ve alkil piruvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile, organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir. [26, 27]

(1)	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
(2)	$O=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
(3)	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
(4)	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
(5)	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
(6)	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
(7)	$ArOPO_3^{-2} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{-2} + ArOH$
(8)	$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$ (Ar= 2,4 dinitrofenil)
(9)	$PhCH_2OCOC l + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
(10)	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$ (R=Me;Ph)

Çizelge 1.1 Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları

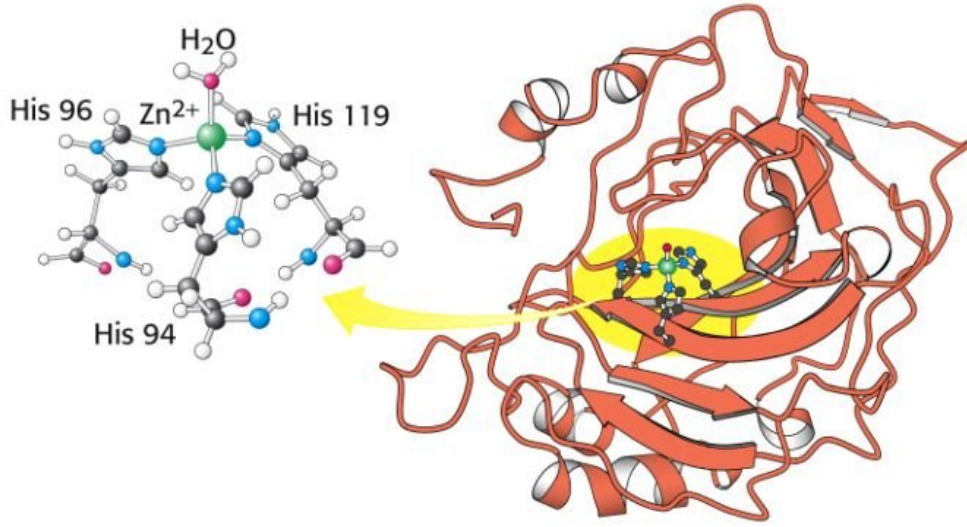
Karbonik anhidraz izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarında büyük farklılıklar gözlenmektedir. İzoenzimlerinin üç boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına karşın, aktif bölgelerindeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. Şekil 1.2’te gösterildiği gibi, her bir izoenzimin aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü koordine olmuştur. Zn⁺² iyonun kataliz

olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA enzimleri, tam anlamıyla aktiviteden yoksundurlar [4, 16, 28, 29].

İnsan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin aminoasit dizilişlerinin tespiti, bu konudaki çalışmaların başlangıcı olmuştur. Daha sonraki yıllarda sığır, at, şempanze ve rhesus maymunlarına ait CA-I izoenzimleri ve yine sığır, at, koyun ve tavşan kaynaklı CA-II izoenzimlerinin amino asit dizilişleri tam olarak tayin edilmiştir. Kas izoenzimi olarak da bilinen CA-III izoenziminin amino asit dizilişi ise, insan için belirlendiği gibi sığır ve atlarda da araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, üç izoenzimin amino asit dizilişleri ve üç boyutlu yapıları yönünden büyük ölçüde benzerliğe sahip olduğu gösterilmiştir [30, 31].

Karbonik anhidrazın sözü edilen üç izoenzimi, yapıları yönünden çok benzemesine rağmen, aktiviteleri açısından farklılık göstermektedir. CA-II izoenzimi CA-I izoenziminden 60 ile 100 kat daha fazla aktif olup, bilinen enzimler arasında katalitik aktivitesi en yüksek olanıdır. CA-III ise, en az aktif olan izoenzimdir ve CO₂-hidrataz aktivitesi CA-I izoenziminin %5 kadardır [32, 33].

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin memelilerdeki molekül ağırlıkları, 28.000 dalton, bitki kloroplastlarından elde edilen ve hegzamerik bir yapıya sahip olan CA'nın ise 180.000 dalton olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, insan böbreğinde hücre zarına bağlı 66.000 dalton molekül ağırlığında ve yine tavşan eritrositlerinde 54.000 dalton molekül ağırlığında, karbonik anhidraz aktivitesine sahip proteinlere rastlanmıştır [34, 35].



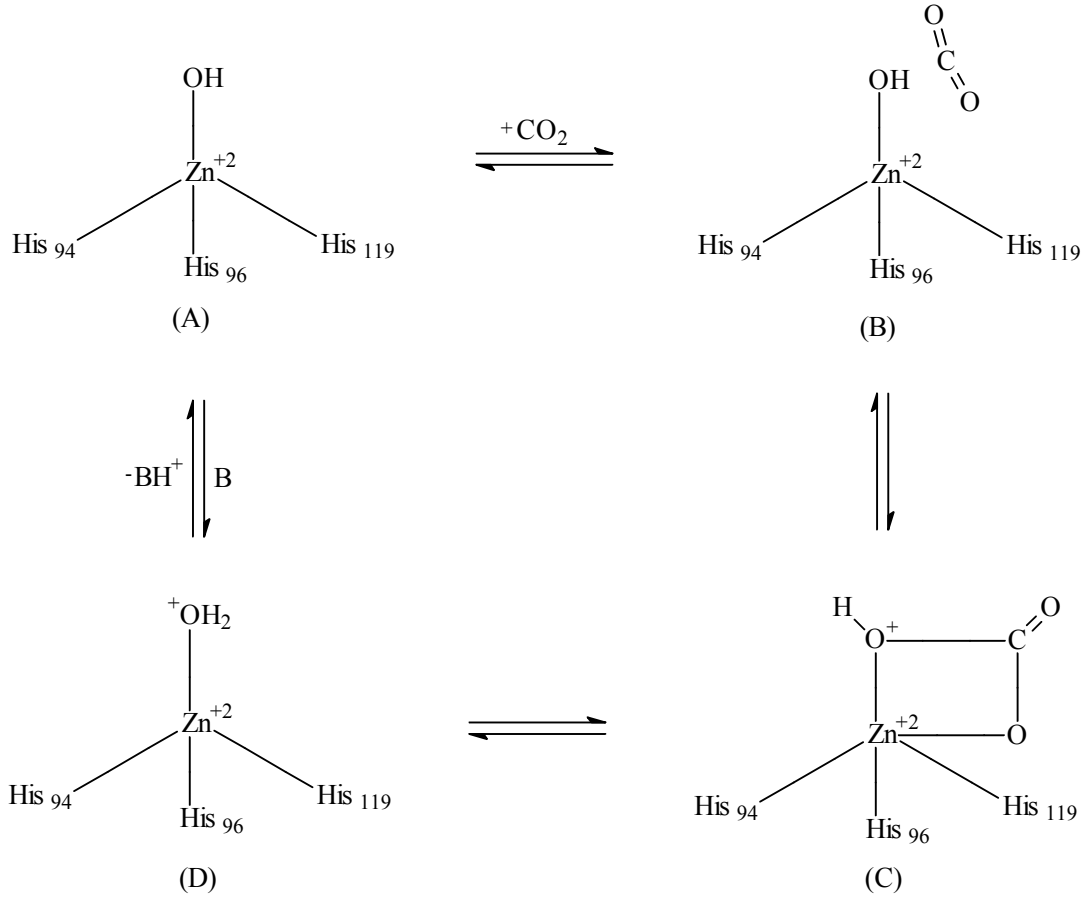
Şekil 1.2 Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119) [36]

1.1.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

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

CA enziminin reaksiyonları katalizinde, Zn^{+2} iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-ray kristalografi sonuçları, metal iyonunun bir H_2O veya OH^- iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96, His 119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 \AA derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir. Çinko bağlı H_2O , Glu106'nın karboksilat grubuna sırasıyla köprü oluşturan Thr199'un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu

tutunmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilitesini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun yerdeki CO_2 ' e doğru hareket etmektedir [1]. Zn^{+2} iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur (Şekil 1.3-A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne saldırır (Şekil 1.3-B). Bu da, Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 1.3-C). Daha sonra, HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Bunun sonucunda, Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da Şekil 1.3-D 'de görüldüğü gibi enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar [37].

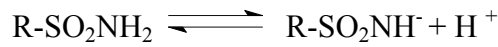


Şekil 1.3 CA enziminin CO_2 -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi [4].

1.1.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

İki ana karbonik anhidraz inhibitör sınıfı bulunmaktadır; metalle kompleks yapan anyonlar ve aromatik-heteroaromatik sülfonamidlerdir [38].

Karbonik anhidrazın en güçlü inhibitörleri aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler R-SO₂NH₂ kimyasal yapısına sahiptir. Bu formüldeki R grubu, genellikle aromatik veya heteroaromatik halka sistemidir. Sülfonamidlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi:



denklemine göre kolaylıkla iyonik yapı kazanmaktadırlar. Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidlerin bu hidrofilik bölgesine ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere sahiptir. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle R-SO₂NH⁻ bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn⁺² ile iyonik bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur [39, 40].

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

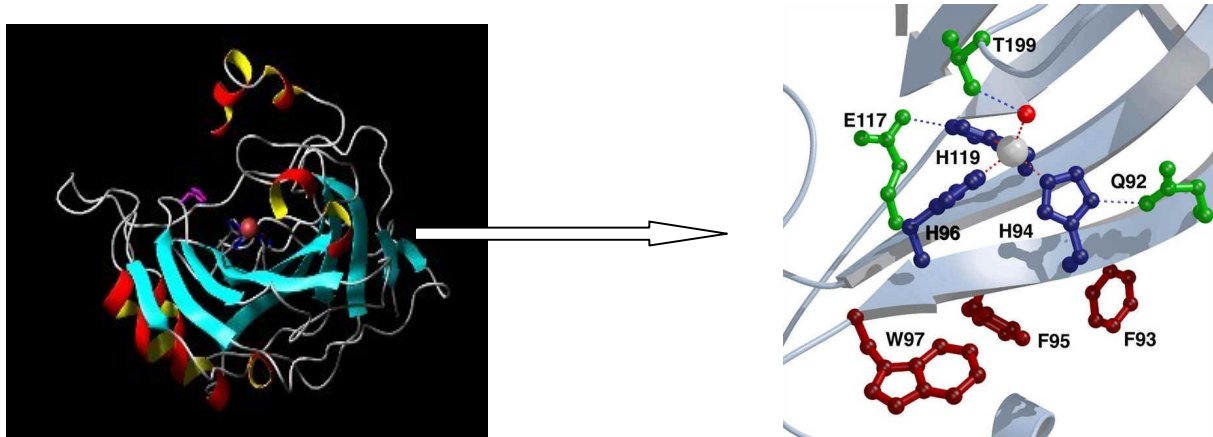
Hastalıkların tedavi ve teşhisinde, CA inhibitörlerinin önemi, Glaucoma hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış, bunun sonucunda da CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta Glaucoma tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans (MRI) belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların geliştirilmesinde yol gösterici olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple, CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi çok büyük önem kazanmıştır. Farklı CA izoenzimlerinin aktivitelerinin temel prosesinin anlaşılması, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine fırsat vermektedir [22, 41].

Çizelge 1.2 α -CA'lar, CO₂ hidratasyon aktiviteleri ve sülfonamide olan ilgileri [22].

Izoform	Katalitik Aktivite	Sülfonamide İlgisi
CA I	Düşük-Orta	Orta
CA II	Yüksek	Çok Yüksek
CA III	Çok Düşük	Çok Düşük
CA IV	Yüksek	Yüksek
CA VA	Orta	Yüksek
CA VB	Yüksek	Yüksek
CA VI	Orta	Orta-Düşük
CA VII	Yüksek	Çok Yüksek
CA IX	Yüksek	Yüksek
CA XII	Düşük-Orta	Yüksek
CA XIII	Düşük-Orta(fare)	Yüksek
CA XIV	Düşük(İnsan) / Yüksek(Fare)	Yüksek (İnsan)

1.1.6. Karbonik Anhidraz II İzoenzimi

CA II 29,3 kDa büyüklüğünde bir proteindir. CA II geni kromozom 8'de lokalize olmuştur ve 17 kb uzunluğundadır. İnsan CA II geninin protein kodlayan bölgesi insan CA I ve CA III ile %64-65 benzerlik göstermektedir. Bu durumun gen duplikasyonları sonucu oluştuğu düşünülmektedir.



Şekil 1.4 HCAII enziminin aktif bölgesi [42, 43].

CA II ilk olarak sığır eriositlerinde bulunmuştur [1]. CA II izoenzimler arasında en hızlı olanıdır, insan doku ve organlarında yaygın olarak rastlanmaktadır. Sindirim sistemi dış salgı bezlerinde bikarbonat salgısı oluşumuna katıldığı düşünülmektedir. Mide de, gastrik mukozanın yüzeyindeki epitelyal ve periyatel hücrelerde ekspre olur ve gastrik sıvının asiditesinin düzenlenmesinde görev alır. Onikiparmak bağırsağı, ince bağırsağın üst ve alt yarısı, kör bağırsak, rectum da ve Brunner bezlerinde ekspre olmaktadır.

Mide ve onikiparmak bağırsağı yüzey epitelyal hücreler, HCO_3^- içeren mukus tabakası oluşturmak için mukus ve bikarbonat salgılar. Böylece epitelyumu çevirir ve onu sindirimden korur. CA II karaciğer hepatositlerinde ve safra kanalı epitel hücrelerinde varlığı gösterilmiştir. Pankreasta, kanal epitelyal hücrelerinde immünohistokimyasal olarak gözlenen CA II pozitif sinyallerine rastlanmıştır. Böbrek tübuler hücrelerinde ve üriner asidifikasyona dağıldığı, böbrek toplama kanallarında ekspre olur.

Yukarıda anlatılanlara ilave olarak CA II merkezi sinir sistemi, insan adrenal ve pitüitrin bezleri, akciğer alveollerini astarlayan epitel hücreleri, insan plasenta, cenin membranları, üreme sisteminin birçok dokusu ve osteoklast gibi birçok farklı doku ve organda ekspre olur. CA II hücreler arası pH ve Ca^{2+} seviyesini düzenleyerek osteoklast farklılaşması ve kemik emiliminde görev alır. Ayrıca *in vitro* osteoklast oluşumu için gereklidir [17, 18].

CA II, choroid plexus (gözün damar tabakasının arka parçasındaki sinir ağı)'da üretilen sıvının pH'ını düzenler ve gözdeki humor aközün oluşumuna katılır. HCAII izoenzimi humor aközün oluşumuna katılması ile glaucoma hastalığında etkisi olan bir enzimdir. Glaucoma, göz içi sıvı kanallarının kısmen ya da tamamen tıkanması sonucu, göz içi basıncının anormal boyutlarda yükselmesiyle oluşur. Basıncın bu derece artması retina ve optik sinirlere zarar vererek dönüşümsüz körlüğe neden olabilmektedir. Göz içi basıncının yegane kontrol noktası, göz içi sıvısı yani humor aközdür [17, 19, 20].

Humor aköz şeffaf ve *in vivo* olarak incelenebilen, göz içi basıncının sağlanmasında, lens ve korneanın beslenme ve metabolik faaliyetlerinde büyük rol oynamaktadır. İçerisinde birçok metabolik materyal bulunur. Komşu dokuların metabolizmasında olduğu kadar, aközün kendisine ait bazı önemli fonksiyonların görülmesinde de önemli rol alır. Göz içi sıvısı (humor aköz) yüksek miktarda Na^+ , Cl^- , laktat ve askorbat ile birlikte HCO_3^- iyonlarını da

içerir. Glukoz miktarı sadece kornea ve lens metabolizması için gerekli olduğundan plazmadakinden daha azdır.

Humor aköz boşaltım kanallarının tıkanması ile humor aköz arka kamarada birikmeye başlar. Artan osmotik basıncı azaltmak amacıyla plazmadan arka kamaraya su salgılanmaya başlar. Osmotik basınç dengeye gelirken, göz küresinin çeperlerine uygulanan göz içi basınç artar. Basıncın yüksek değerlere ulaştığında göz küresinin arkasında bulunan optik sinirlerde atrofi meydana gelir ve görüntü kayıpları başlar.

Humor aközün salgılanmasında CA enzimi, HCO_3^- iyonu birikimini sağladığından, uyarıcı bir etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu sonucu göz içi sıvısının salgılanma oranı yaklaşık yarı yarıya azalmakta, göz içerisindeki osmotik basınç ve dolayısıyla göz içi basıncı kontrol altında tutulabilir. Bu bilgiler ışığında karbonik anhidraz inhibitörleri 40 yılı aşkın bir süredir Glaucoma hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [19, 20].

1.1.7. HCAII Geninde Yönlendirilmiş Mutagenез

İnsan Karbonik anhidraz II enziminin reaksiyon mekanizmasını açıklayabilmek için çok sayıda araştırmacı tarafından enzimde çeşitli mutasyon çalışmaları yapılmıştır. 1988 yılında Forsman ve arkadaşları tarafından HCAII enziminin CO_2 hidratasyonu için Histidin 64 aminoasitinin gerekli olmadığı çeşitli mutasyon çalışmalarıyla tespit edilmiştir. Bu çalışmada $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ dönüşümünde HCAII'de Histidin 64 aminoasitinin önemli bir proton transfer vektörü olduğu hipotezini test etmek için Histidin 64 aminoasiti yönlendirilmiş mutagenез ile lizin, glutamin, glutamik asit ve alanin aminoasitlerine dönüştürülmüştür. Yapılan mutasyonlar sonucu enzim yüksek CO_2 hidratasyon aktivitesi göstermiştir [44].

1989 yılında Tu ve arkadaşları HCAII enziminin katalitik mekanizmasında proton transfer grup olan Histidin 64 aminoasitinin rolünü açıklamak amacıyla enzimde yönlendirilmiş mutagenез ile Histidin 64'ü Alanin aminoasitine dönüştürmüşlerdir. Bu mutasyon sonucunda enzimin katalizlediği $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ dönüşümü pH 7'den büyük olduğu durumda değişmemiştir. Ayrıca yabani tip enzim Cu^{2+} 'nin mikromolar düzeyde uygulanan konsantrasyonu ile inhibe olurken, mutant enzim bu konsantrasyondan etkilenmemektedir. Oluşturulan mutasyonun aktif bölge ile reaksiyon tamponu arasındaki proton transfer oranını

etkilediği tespit edilmiştir. Ayrıca enzimde aktif bölge ile tampon arasındaki proton transferinin, tampon içeriğinin kimyasal yapısına bağlı olduğu tespit edilmiştir [45].

1991 yılında Fransson ve arkadaşları prolin izomeraz varlığında HCAII enziminin yeniden aktivite kazanmasından yola çıkarak mutant enzimler üzerinde prolin izomerazın rolünü araştırmışlardır. Enzimin reaktivasyon prosesinde prolin izomerazların rolü mutasyonlar oluşturularak araştırılmıştır. Prolin 202'nin Asparajin amino asitine dönüştürülmesiyle oluşturulan mutant enzimde prolin izomerazın varlığında ve yokluğunda mutant enzim yabancı tip enzim gibi davranmıştır [46].

Freskgard ve arkadaşları HCAII enziminin polipeptid zincirin C-terminal bölgenin katlanma prosesini araştırmışlardır. Kunkel metodu kullanılarak [47] mutasyonlar oluşturulmuştur. Sonuçta proteinin içinde yer alan β zincirinin çok hızlı bir şekilde yapı kazandığı bulunmuştur [48].

1992 yılında Engstrand ve arkadaşları HCAII enziminde proton transferinde rolü olan Histidin 64'ü Lizin, Alanin ve Glutamik asit aminoasitlerine değiştirmişlerdir. Çeşitli tamponlarda ve pH aralıklarında mutant enzimlerin CO₂ hidrasyon aktiviteleri ölçülmüştür [49].

1992 yılında Taoka ve arkadaşları HCAII enziminin katalitik aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmak için hidrofobik aminoasit olan Lösin198 ve Lösin204 aminoasitlerini yönlendirilmiş mutagenез ile Fenilalanin198 ve Glutamik asit 204 aminoasitlerine değiştirilmiştir. Mutant enzimlerin CO₂ hidrasyon aktiviteleri ve 4-nitrofenil asetat hidroliz aktiviteleri yabancı tip enzim ile karşılaştırıldığında düşük sonuçlar elde edilmiştir [50].

1994 yılında Xue ve arkadaşları HCAII enziminde yönlendirilmiş mutagenез ile Histidin 94'ü Glutamik asit aminoasitine değiştirmişlerdir. HCAII enzimin aktif bölgesinde üç histidin aminoasiti yer almaktadır (His64, His94, His 119). Bu çalışmada His94'ün seçilme sebebi diğer iki histidin amino asitine göre daha yüksek yüzey ulaşılabilirliği vardır ve bu pozisyon proteinin yapısında çok büyük bir değişikliğe neden olmaksızın değiştirilebilir. Oldukça sıkı bir şekilde korunmuş çinko ligandlardan olan His94'ün Glutamik asite dönüşümü çok küçük yapısal değişime sebep olmuştur. Ayrıca çinko iyonu ile Glutamik asit94 etkileşimde bulunmuştur ancak ilgisinin oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. [51].

1994 yılında Ippolito ve arkadaşları HCAII enziminde Histidin94 aminoasitini Aspartik asit aminoasiti ile değiştirmişlerdir. Mutant enzimin kristal yapısı incelenmiştir [52].

1995 yılında Lesburg ve arkadaşları HCAII aktif bölgesinde çinko iyonu ile koordineli olan Histidin 94 ve Histidin 119'u Asparajin ve Glutamin aminoasitleri ile değiştirmişlerdir. Elde edilen mutantların yapısal ve fonksiyonel analizleri yapılmıştır. Mutant enzimlerin X-Ray kristilografisi yapılmıştır [53].

1997 yılında Hammarström ve arkadaşları 3. β zincirde yer alan Asparajin 67 aminoasitini Sistein amino asitine değiştirmişler ve 7. β zincirde yer alan Sistein206 amino asitini pürin prob için bağlanma bölgesi olarak kullanılmıştır. N67C/C206 mutant enzimi spesifik enzimatik aktivitesi yabancı tip enzim ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta %88 enzimatik spesifik aktivitenin yabancı tip enzim ile aynı olduğu tespit edilmiştir [54].

2000 yılında Doyon ve arkadaşları HCAII enziminde Fenilalanin131 aminoasitini Valin aminoasiti ile değiştirmişler ve floroaromatik inhibitörlerin mutant enzim üzerindeki etkisini incelemişlerdir [55].

2000 yılında Vince ve arkadaşları HCAII'nin amino terminal bölgesinde Cl^-/HCO_3^- anyon değiştiren bağlanma bölgesinin lokalizasyonu araştırmışlar ve AE1 bağlanma bölgesinin CAII'nin ilk 17 residüsünde yer aldığını tespit etmişlerdir [56].

2001 yılında Huber ve arkadaşları tarafından HCAII'nin 7 farklı pozisyonunda yönlendirilmiş mutagenез yapılmıştır. 7 farklı pozisyonadaki aminoasitler sistein aminoasitine dönüştürülmüştür. Mutant proteinlerin yapısal analizleri işaretleme metodu ile yapılmıştır [57].

2002 yılında Huang ve arkadaşları HCAII'de Kunkel metodu ile T199P/C206S mutasyonu oluşturmuşlardır. Bu mutasyonların yapı-fonksiyona bağlı mekanizmaya etkisini araştırmışlardır. Mutant enzimin aktivitesinde düşüş gözlemişlerdir. Substrat olarak bikarbonat, inhibitör olarak tiyosiyanat ve β -merkaptotanol kullanarak mutant enzimin X-ray kristolografik yapısı belirlenmiştir [58].

2003 yılında Elder ve arkadaşları proton transferinde önemli olan His64 aminoasiti Alanin amino asitine değiştirilmiştir. Ayrıca H64A-C206S mutasyonu taşıyan plazmid kullanılarak Triptofan 5, Asparajin 62, İzolösin 91 ve Fenilalanin 131 Sistein aminoasitlerine değiştirilmiştir. Modifiye edilmiş Sistein 131, modifiye edilmemiş mutasyon taşıyan Sitein 131 içeren enzimle karşılaştırıldığında proton transferinde artma gözlenmiştir. Diğer pozisyonlardaki değişimler CO₂ hidratasyon oranının değişmesine neden olmuştur [59].

2005 yılında Elder ve arkadaşları proton transferinde önemli olan His64 aminoasiti Alanin amino asitine değiştirerek 4-methylimidazole ile kataliz aktive edilmiştir [60].

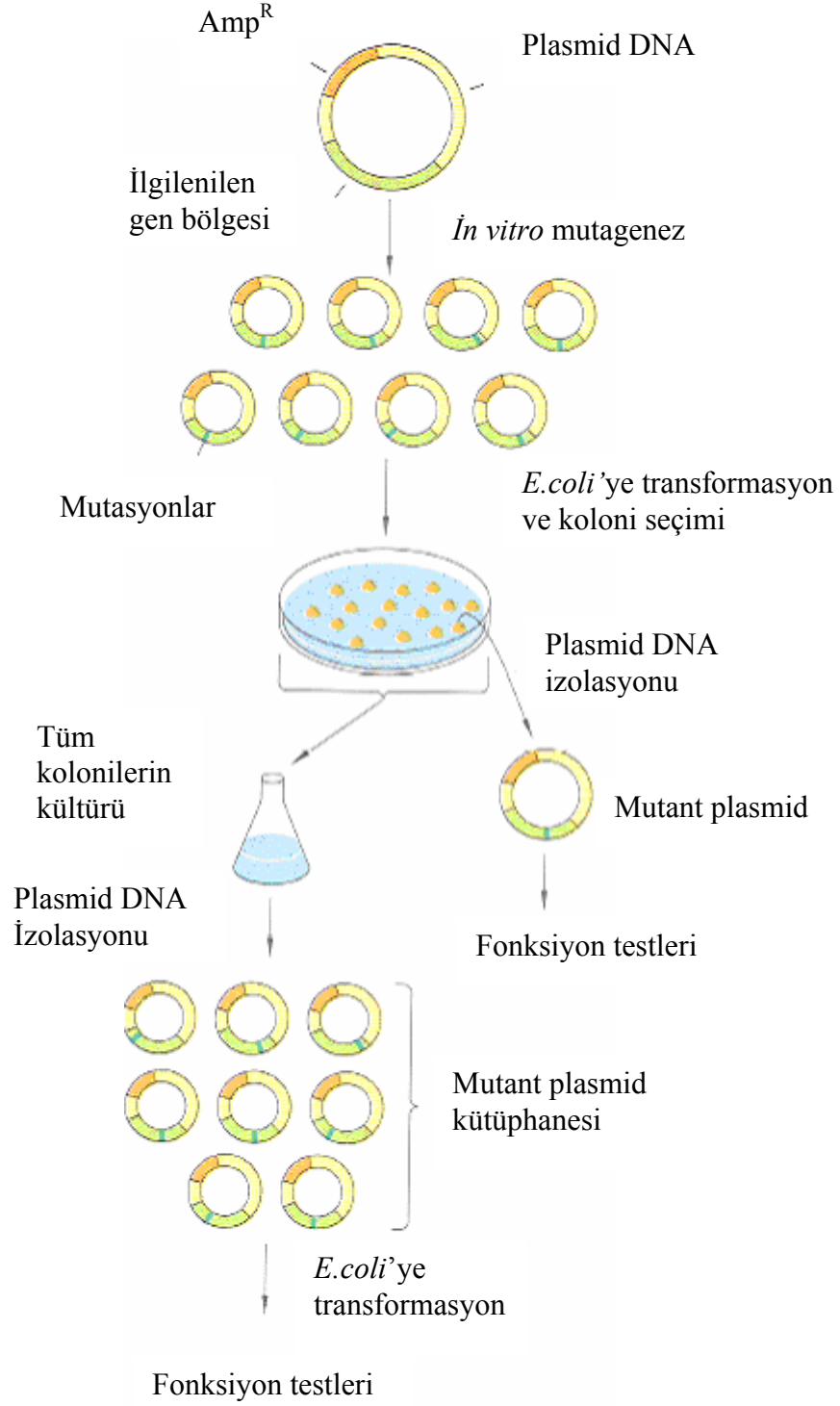
1.2. Mutageniz Teknikleri

Moleküler genetik tekniklerin ilerlemesiyle, ilgili protein ve genin üç boyutlu yapısının ve fonksiyonel aminoasitlerinin aydınlatılması için protein mühendisliği denilen yeni bir alt dal doğmuştur. Buna göre fonksiyonel ve yapısal öneme sahip aminoasitlerin aydınlatılmasında DNA dizisi bilinen gen üzerinde değişiklikler yani mutasyonlar yapılması ve fonksiyonel olarak mutant proteinin aydınlatılması mümkün hale gelmiştir. Mutageniz olarak da adlandırılan bu teknikler, tesadüf olarak bir defada sayısı ve tam yeri belirsiz farklı bölgelerinde kapsayan rastgele mutageniz teknikleri ve sadece belirli hedef aminoasitlerin delesyonu, insersiyonu ve değişimini ifade eden yönlendirilmiş mutageniz teknikleri olarak ikiye ayrılabilir.

1.2.1. Rastgele Mutageniz Teknikleri

Rastgele mutageniz teknikleri kullanılarak plazmitte herhangi bir yere mutasyon yerleştirilir. Rastgele metodlar klonlanmış DNA dizisinde genlerin lokasyonunun belirlenmesinde, genel fonksiyonların sınırlarının tanımlanmasında ve basit genetik seçimin sağlanabildiği amaçlar için kullanılırlar. Rastgele mutageniz, belirli DNA dizisi tarafından kodlanan, fonksiyonu hakkında bilgilerin az olduğu durumlarda ilk basamak olarak kullanılır. Rastgele oluşturulan mutantların analizleri genellikle sadece fonksiyonel bölge hakkında basit bilgiler sağlar. Moleküler seviyede nasıl çalıştığını açıklamaz. Böyle bir stratejinin değeri büyük bir DNA dizisindeki bölgeden daha sonra detaylı şekilde aydınlatılacak küçük bir bölgeyi çalışmak için ön basamak olmasıdır.

In vitro mutagenез prosedürlerinin birçoğu temelde aynı basit planı izler; (i)Plazmit DNA'da ilgilenilen bölgede mutasyon, (ii)Mutasyona uğratılmış plazmitin kompetant hücreye transformasyonu, (iii) Mutant plazmiti içeren kolonilerin ayrılması [61]



Şekil 1.5 *In vitro* mutagenезin temel basamakları [61].

Restriksiyon Endonükleaz bölgeleri mutasyon oluşturabilmek için gen dizisine basit giriş sağlar. Klonlanmış DNA ile yapılan ilk deneylerden biri, farklı enzimlerin kullanılarak yapılmış olan restriksiyon kesim bölgelerinin haritalanmasıdır. Restriksiyon Endonükleaz kesim bölgeleri, *in vitro* da DNA'yı modifiye etmede kolaylık sağlar. Plazmit DNA'sını spesifik olarak tek bir noktadan tanıyarak kesen restriksiyon enzimi kullanılarak, plazmit DNA'sı lineer hale getirilebilir. Böylece restriksiyon kesim bölgeleri civarında, DNA'yı modifiye etmek için giriş sağlanmış olur. Bazı restriksiyon enzimleri hedef DNA 'da çentik oluşturma yeteneğine sahiptir. Restriksiyon enzimleri ile oluşturulan uçlar, yeni düzenlemeden sonra tekrar ligaz enzimleri ile birleştirilebilir. Uçları birleştirme yöntemlerinden biri ticari olarak elde edilebilen, sıklıkla bir restriksiyon bölgesini kodlayan sentetik oligonükleotidlerin kullanılmasıdır. Linkerlar yeni restriksiyon kesim bölgeleri oluşturmak için kullanılabilir. Linker'ın insersiyonu gen dizisini bozar. Linker'ın yeri, plazmitte restriksiyon enzimi uygulaması ile belirlenebilir [62].

DNA'yı modifiye etmenin basit yollarından biri de kimyasalların kullanımınıdır. Genel strateji; plazmit DNA veya DNA parçaları kimyasallarla muamele edilir, mutasyona uğrayan plazmidler *E.coli* 'ye transforme edilir ve mutant plazmitler çoğalarak mutant plazmit kütüphanesini oluşturur. *In vitro* mutagenizde yaygın olarak kullanılan kimyasal madde sodyum bisülfittir. Sodyum bisüfit Sitozin bazlarını Urasil bazlarına dönüştürür. Sonuçta yabancı tipteki C-G baz çifti T-A baz çiftine dönüşmüş olur.

Rastgele mutagenizasyon yöntemlerinin avantajı seri mutasyonlar oluşturarak genin fonksiyonel ve yapısal önemi açıklanabilir. Ancak şimdiye kadar anlatılan rastgele mutasyon yöntemlerinin genel problemi birden fazla değişim ile mutasyon oluşturmalarıdır. Tek mutantta gözlenen birden fazla değişim, mutantta gözlenen özelliklerin yorumlanmasında zorluk yaratır. Çünkü hangi değişimin buna neden olduğu açık değildir.

1.2.2. Oligonükleotid-Yönlendirilmiş Mutagenizasyon Teknikleri

Yönlendirilmiş mutagenizasyon, istenilen bölgeye tam olarak mutasyonun yerleştirilmesidir. Bu yöntem ile spesifik DNA dizilerinin rolü tam olarak tanımlanabilmektedir. Yönlendirilmiş mutagenizasyon, protein yapı-işlev ilişkilerinin incelenmesi ve protein mühendisliğinde kullanılan güçlü bir araçtır. Bu yöntem araştırmacılara proteinin yapısında spesifik değişimler yapabilmeyi sağlar. Protein yapı-fonksiyon ilişkilerinin aydınlatılması,

moleküller arası bölgelerin tanımlanması, aminoasitlerin fonksiyonel önemini aydınlatılmasına olanak sağlamaktadır.

Bir proteinin işlevi, aktif üçüncül yapısı yada diğer biyolojik moleküllerle olan etkileşiminin anlaşılmasında bu teknikten yararlanılabilmektedir. Ayrıca, yeni özellikteki bir enzimin oluşturulmasında bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır. Yönlendirilmiş mutagenез, protein-yapı işlev ilişkisi'nin incelenmesinden başka gen ekspresyonunu etkileyen faktörlerin anlaşılmasında, vektör modifikasyonlarında ve bulaşıcı hastalıklar, kanser gibi bazı kompleks mekanizmalar hakkında bilgiye ulaşmada başvurulmaktadır [63, 64, 65].

In vitro'da yönlendirilmiş mutantları oluşturmak için çok sayıda strateji geliştirilmiştir ancak günümüzde yönlendirilmiş mutagenез en iyi şekilde sentetik oligonükleotidler kullanıldığında başarılmıştır. Oligonükleotidler ile yabani tipteki çatıda istenilen dizi basit bir şekilde oluşturulur. Günümüzde sentetik oligonükleotidlerin sağlanması ucuz ve kolaydır. Oligonükleotid-yönlendirilmiş mutagenез reaksiyonları doğru sonuçlar vermektedir [61, 65, 66].

Çalışılacak gen sekansı biliniyorsa, gen içinde tam olarak istenilen bölgede mutasyon oluşturulabilir. Yabani sekanstan farklı olarak, istenilen mutasyonu taşıyan kısa oligonükleotidler kimyasal olarak sentezlenir.

Dut-Ung metodu olarak bilinen oligonükleotid mutagenез yöntemi ilk kez Kunkel tarafından 1987 yılında ortaya atılmıştır. 1993 yılında Kimya alanında Nobel ödülü Karry B. Mullis, Michael Smith'e verilmiştir. Smith PCR metodunu icat etmiş, oligonükleotid-yönlendirilmiş yöntemini kurmuş ve böylece protein çalışmalarını geliştirmiştir. Yönlendirilmiş mutagenез protein fonksiyon çalışmalarında geniş olarak kullanılmaktadır [61, 67].

Dut-Ung veya Kunkel metodu olarak bilinen yönlendirilmiş mutagenез yönteminde dUTPase (dut-) ve Urasil N-glikozilaz (ung-) enzimlerini içermeyen bir *E.coli* hücresinde DNA kalıbı büyütülür. Dut geni dUTP'yi degrades eden dUTPaz enzimini kodlar. Ung geni ise DNA'da Urasil bazını uzaklaştıran N-glikozilaz enzimini kodlar. Böylece *E.coli* hücresinde DNA'da Timin yerine Urasil yerleştirilir. Mutajenik bir durum değildir ve bu hata düzeltilmez. Mutant oligonükleotit, kalıp DNA ile *in vitro* olarak bağlanır. DNA polimeraz ve

dNTP'ler ortama eklenir. Ancak ortama dUTP eklenmez. Ligasyondan sonra heterodubleks DNA molekülü ung+ *E.coli* soyuna transforme edilir. Yabani tip zincir replike olamadan urasil deglikozidaz enzimi ile degrede olur. Mutant diziyi taşıyan zincir urasil içermediğinden enzim tarafından degrede olmaz ve çoğaltılır. Bu prosedür sonunda oluşan kolonilerden %50'den fazlası mutant plazmiti içerir [47, 63].

Günümüzde ek klonlama işlemi gerektirmeyen, başlangıç materyali olarak tek zincirli DNA'ya olan gereksinimi ortadan kaldıran yeni stratejiler geliştirilmiştir. Oligonükleotid-Yönlendirilmiş Mutagenез tekniği kısaca şu basamaklardan oluşur;

- 1) PCR koşullarında mutasyonu taşıyan sentetik oligonükleotidler plazmit DNA 'ya bağlanır.
- 2) Plazmid replike olur. Mutant diziyi taşıyan plasmidler ile yabani diziyi taşıyan plasmidler Dpn I enzimi ile muamele edilir. DpnI enzimi metilenmiş DNA'ya spesifiktir ve metilenmiş yabani tip plazmiti keser. *In vitro* oluşan mutant plazmiti kesmez.
- 3) Mutant plazmit konakçı hücreye, çentiklerin tamamlanması için transforme edilir.

1.3. Prokaryotlarda Rekombinant Protein Ekspresyon Sistemleri

Prokaryot ekspresyon sistemleri ekspresyonun daha ucuz ve ekonomik olmasından dolayı ilk tercih edilen sistemlerdir. Ekspre edilen proteinin kompleks post translasyonel modifikasyonları gerekli değilse prokaryot ekspresyon sistemleri kullanılır. Rekombinant ekspresyon sisteminin oluşturulmasında çok sayıda elementin merkezi önemi vardır. Ekspresyonda ekspre edilecek geni taşıyan plasmid uygun bir sistemde teşvik edilir. Ekspresyonu etkileyen çok sayıda parametre vardır. Bunlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.

Ekspresyon vektörünün seçimi: Çok farklı ekspresyon sistemleri olsa da ekspresyon plasmidi replikasyon orjini (*ori*), antibiyotik direnç geni, transkripsiyon promoterları, translasyon başlangıç bölgeleri (TIR) ve transkripsiyon-translasyon sonlanma bölgeleri gibi genetik elementleri içermelidir [68-74].

Plasmidin replikon bölgesi replikasyon orjini ve bazı durumlarda cis-acting element (promoter) içerir. Rekombinant protein ekspresyonunda, ColE1 ve p51A replikonları ile çoğaltılan plasmid vektörler kullanılır. Plasmidin kopya sayısı replikasyon orjini tarafından kontrol edilir. ColE1 replikonu, kopya sayısı 15-20 olan pBR322'den veya kopya sayısı 500-700 olan pUC plasmid ailelerinden köken alan modern ekspresyon plasmidlerinde yer alır. p51A replikonu ise kopya sayısı 10-12 olan pACYC184 plasmidinden köken alan modern ekspresyon plasmidlerinde yer alır. Bu çok kopyalı plasmidler kararlı olarak çoğalırlar ve seçici şartlarda korunurlar. Aynı hücre içerisinde iki plasmidin kararlı olarak kalamaması plasmid uyumsuzluğu olarak tanımlanır. ColE1 ve p51A replikonları içeren plasmidler birlikte ekspresyon yapmak amacıyla kullanılabilir [68].

Rekombinant ekspresyon plasmidlerindeki en yaygın ilaç direnç genleri ampisilin, kanamisin, kloromfenikol ve tetrasikline karşı etkilidir. Direnç genleri plasmidler için seçici bir özellik sağlar. Plasmidin ampisiline karşı direnci bla genindeki β -laktamazın ekspresyonu ile başarılır. Bu enzim ampisilin antibiyotiğindeki β -laktam halkasının hidrolizini katalizler. Kültür ortamında bulunan ampisilin β -laktamaz enzimi ile degrades edilir, bu durum ampisilin direnç geni içeren plasmidler için seçici bir özelliktir. Kanamisin antibiyotiği periplazmaya salgılanan aminoglikozit fosfotransferaz enzimi ile inaktive edilir. Kloromfenikol antibiyotiği ise *cat* geni ürünü olan kloromfenikol asetil transferaz enzimi ile inaktive edilir. Çeşitli genler tetrasiklin antibiyotiğine direnç özelliği sağlar[68].

Rekombinant ekspresyon plasmidi yüksek seviyede gen ekspresyonunu kontrol eden güçlü bir transkripsiyonel promoter içermelidir. İndükleyici yokluğunda bazal transkripsiyon uygun bir represörün varlığı ile minimum seviyede tutulur. Bazal transkripsiyonun minimum seviyede tutulması özellikle , hedeflenen ekspresyon hücrel bir stres ile karşılaştığında ve plasmid kaybı gerçekleştiği durumlarında önemlidir. Promoter indüklenmesi ya termal yada kimyasal yolla olur ve en yaygın kullanılan indükleyici ajan bir şeker molekülü olan izopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit (IPTG)'tir.

Transkripsiyona uğrayan m-RNA'nın translasyon başlangıç bölgesinden (TIR) translasyona başlaması için Shine Dalgarno (SD) dizisini ve bir translasyon başlangıç kodonu içeren bir ribozomal bağlanma bölgesine (RBS) ihtiyacı vardır. SD dizisi başlangıç kodonundan 7 ± 2 nükleotid yukarıda olmalıdır. Optimal translasyonun başlaması UAAGGAGG diziliş içeren shine dalgarnolu m-RNA'lardan elde edilir. Ribozom bağlanma

bölgesinin sekonder yapısı translasyonun başlaması için oldukça önemlidir ve etkinliği yüksek adenin ve timin varlığıyla olur. Translasyonun başlangıcının etkinliği temelde başlangıç kodonunu takip eden kodon tarafından etkilenir ve adenin yüksek seviyede ekspre olan genlerde bolca bulunur.

Bir transkripsiyon terminatörü plasmidde hedef geni kodlayan dizinin alt bölgesinde yer alır, replikasyon orjinine doğru transkripsiyonu ve plasmitteki ilgisiz promoterları önleyerek plasmit kararlılığını artırır. Transkripsiyon terminatörleri 3' ucunda bir katlanma oluşturarak m-RNA'yı kararlı hale getirirler. Translasyon sonlanması *E.coli*'de UAA stop kodonu aracılığıyla olur. Translasyonun durdurulmasının etkinliğinin artışı arka arkaya stop kodonları ekleyerek ve UAA stop kodonunu UAAU şeklinde uzatarak başarılıdır.

***E.coli* Soyları:** Rekombinant protein ekspresyonunda soyun genetik özellikleri oldukça önemlidir. Ekspresyon için seçilen soy doğal olarak zararlı olan proteazları içermemeli ve ekspresyon sistemine uygun elementleri içermelidir. *E.coli*'nin BL-21 soyu rekombinant protein ekspresyonunda sahip olduğu özellikleri açısından yaygın olarak kullanılır. Genomunda T7 RNA polimeraz geni bulunur. IPTG ile teşvik edilebilir. BL-21 ompT ve Ion, iki proteaz açısından eksiktir [69-75].

mRNA kararlılığı Gen ekspresyonu esas olarak transkripsiyonun etkinliği, mRNA kararlılığı ve mRNA translasyonunun sıklığı ile belirlenir. Transkripsiyon ve translasyon, rekombinant ekspresyon sistemlerindeki optimizasyonun esas konularıdır. Bununla birlikte mRNA transkriptinin kararlılığı nadir olarak söylenir. Gen ekspresyonu mRNA'nın bozulmasıyla kontrol edilir. *E.coli*'de mRNA'nın 37⁰C'deki yarılanma ömrü saniyelerle maksimum 20 dakika arasında değişmekte ve ekspresyon oranı direkt olarak mRNA'nın kararlılığına dayanmaktadır. mRNA'lar RNazII ve PNPaz ekzonükleazları ve RNazE endonükleaz enzimleri ile degrades edilir. mRNA'ların RNazlardan korunması RNA'ların katlanması, ribozomlar tarafından korunması ve poliadenilasyon PAPI ve PAPII poliadenilasyon polimerazlar tarafından sağlanır ve RNazII ve PNPaz degrades edilir. RNazE geninde bir mutasyon içeren zincirler (*rne131* mutasyonu) rekombinant ekspresyon sistemlerinde (BL-21 soyu) mRNA kararlılığının artırılması için gereklidir. Rekombinant ekspresyon sistemlerinde mRNA'nın kontrolü istenilen bir durumdur. Etkili translasyon başlangıcı ve arkasından degradasyondan acilen ribozomal korunma mRNA'yı kararlı hale getirir. Bu engelleyici sekonder yapı elementlerinden yoksun ribozomal bağlanma bölgelerinin seçilmesiyle

başarılır. Hibrit kararlı mRNA'lar ekzonükleazlara karşı bir bariyer gibi etkili 5' ve 3' ucu kararlı dizilerin getirilmesiyle sağlanabilir. *E.coli* F₀ ATPaz altbiriminin C-terminal bölgesini kodlayan bir mRNA dizisi yeşil floresan proteini (GFP) kodlayan dizi ile birleştirilerek kararlı hale getirilebilir. Bunun yanında *lacZ* ile olan füzyonlar başarısız olmuştur ve bundan dolayı GFP transkripti mRNA'nın koruyucu yapısal elementler sağlamıştır [68].

Nadir kodon engeli: Aynı kodonlar tüm organizmalarda aynı aminoasiti kodlar. *E.coli*'de diğer organizmalardan gelen dış kaynaklı proteinlerin yüksek seviyede ekspresyonunda, özellikle aminoasit veya yüklü tRNA kısıtlı olduğu için translasyonda hata oluşabilir. *E.coli*'de kodon kullanımı sitoplazmadaki amino-asetillenmiş tRNA'ların seviyesi ile aydınlatılır. Büyük kodonlar yüksek seviyede ekspre edilen genlerde bulunurken nadir ve az kodonlar düşük seviyede ekspre olan genlerde bulunmaya eğilimlidir. *E.coli*'de nadir olan kodonlar bazen ökaryotlar, archaeabacteriler ve farklı kodon sıklıkları bulunan diğer uzaktan ilişkili organizmalardaki heterolog genlerde sıklıkla bulunabilir. Nadir kodonları içeren genlerin ekspresyonları translayonel hatalara sebep olabilir, aminoasitlerin birleştirilmesini gerektiren pozisyonlardaki ribozomal durma küçük kodon tRNA'ları birleştirir. Rekombinant ekspresyon sistemlerdeki kodon problemleri ikili ve üçlüler gibi gruplarda nadir kodon bulunduran transkriptler yüksek miktarlarda birikince oldukça önemli olur. Nadir kodon eğiliminden kaynaklı translasyonel hata mistranslasyonel aminoasit yer değiştirmesi, çerçeve kayması olayları veya olgunlaşmamış translasyonel sonlanmayı içerir. Kodon engeline çare bulmak için iki alternatif strateji geliştirilmiştir. İlk yaklaşım konakçı sistemdeki tRNA havuzunu yansıtan kodonların jenerasyonu için hedef dizinin yönlendirilmiş mutagenesidir. Bu yaklaşım ekspresyon seviyelerini arttırmak için ve mistranslasyonu hafifletmek için faydalıdır. Mutagenез yaklaşımının oldukça etkili olduğu düşünülse de biyoteknolojide oldukça zaman kaybettirir. Daha az zaman gerektiren metot ise ekspre edilen proteinle birlikte aynı soydan gelen tRNA genlerinin birlikte ekspresyonu ile bu durum düzeltilebilir.[68].

İnklüzyon cisimciklerinin önlenmesi: Protein aktivitesi tam üç boyutlu yapı katlanmalarına bağlıdır. Isı şoku gibi stres koşulları *in vivo* da protein katlanmalarını bozar ve inklüzyon cisimleri olarak adlandırılan şekilsiz protein granülerinin oluşumuna neden olur.Şu ana kadar inklüzyon cisimleri ve katlanma mekanizmaları hakkında oldukça az bilgi bulunmaktadır. İnküzyon cisimleri, rekombinant proteinin yüksek oranda ekspresyonu sırasında, stres cevabı olarak oluşur. *E.coli* sitoplazmasındaki 200-300mg/mL miktarındaki protein konsantrasyonu, rekombinant protein ekspresyonu sırasında protein katlanmaları için uygun olmayan bir çevre

oluşturur. Rekombinant ekspresyon sisteminde inklüzyon cisimlerinin oluşumu *in vivo* da protein kümeleşmesi ve çözülmesi arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşur. Rekombinant sistemdeki protein kümeleşmesi, sıcaklık, ekspresyon oranı, *E.coli* metabolizması, çözümlü kuyruk teknolojisi gibi hedef protein mühendisliği ve şaperon kodlayan plasmid ile birlikte ekspresyon gibi parametrelerle azaltılabilir [68].

Ekspresyon sırasında stres: 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. Plasmitin korunmasıyla teşvik edilen stres, bazen plasmitin kopya sayısı ile de ilgilidir, bunun yanında ana problem plasmit tarafından kodlanan genlere ve peşinden ekspre edilen antibiyotik direnç genleri gibi genlere bağlanabilir. Bazı proteinler konakçı hücre metabolizmasını enzimatik özellikleriyle direkt olarak etkiler, genelde rekombinant proteinlerin ekspresyonu bir 'metabolik yükü' teşvik eder. Bu metabolik yük, yabancı DNA ve ekspresyonu ile konakçı metabolizmasından kullanılan kaynaklar (atık maddeler-enerji) olarak tanımlanır. Genelde bir ürün ekspre eden hücrelerin spesifik büyüme hızları rekombinant protein sentezi ile ters ilişkilidir. Bu sebeple rekombinant proteinlerin ekspresyonları genelde büyüme hızlarını azaltır. Bu durum rekombinant protein ekspresyonu gibi stres yaratan proteinlerin ekspresyonu ve artan solunum hızları ile teşvik edilen yüksek enerji ihtiyacına karşı direk bir cevaptır. Kısıtlı enerji durumlarında hücreler tarafından verilen cevap, enerji üretimi için alternatif yollar, enerji üretim enzimlerinin seviyelerinin arttırılması gibi oldukça karmaşıktır. Rekombinant ekspresyonu yüksek protein senteziyle sonuçlanır. Bunun yanında rekombinant proteinin yüksek seviyede ekspre olurken, protein sentezindeki bileşenleri içeren house-keeping genlerin regülasyonu azalır. Eğer ürün *E.coli* proteininden köken almışsa, aminoasit açlığı rekombinant protein ekspresyonu sırasında meydana gelebilir. Bu durumda cevap olarak, rekombinant genin ekspresyonunun yeniden programlanması ve hücre metabolizması, transkripsiyon, translasyon ve aminoasit biyosentezinde görev alan genlerin büyük bir kısmının regülasyonunun azaltılması ile gerçekleşir. Rekombinant proteinin ekspresyonu ile teşvik edilen strese karşı bir diğer cevap hedef proteinin proteolizinin *in vivo*'da artmasıdır. Bu sorun, proteaz eksikliği olan konakçı soylar, ısı şokuna hassas olmayan soylar, şaperonla birlikte ekspresyon, proteaz inhibitörü birlikte ekspresyon yapılarak önlenir. Bu stratejiler konakçı soyu değiştirmeye yöneliktir. Diğer stratejiler, füzyon protein teknolojisi, proteaz özgü bölgelerin yönlendirilmiş mutagenesi veya sinyal peptid ile kararlı hale getirilmesidir. Rekombinant protein sentez sistemlerinde stres, spesifik bir ürün sentezi görevine hücrelerin yavaş adaptasyonu ile azaltılabilir. Bu genellikle kültür

ortamına indükleyicinin seviyesini dereceli olarak arttırarak veya plasmid kopya sayısının yavaş olarak arttırılmasıyla başarılabilir. İstenilen kalitede ve miktarda rekombinant protein elde edilmesini önleyen stres durumlarından mutlaka kaçınılmalıdır [68].

Füzyon protein teknolojisi: Rekombinant proteinlerin ekspresyonu ve saflaştırılmasını kolaylaştırmak için yüksek oranda füzyon protein stratejisi geliştirilmiştir. Füzyon veya şimerik proteinler, spesifik proteazlara tanıma bölgesi ile, hedef proteine bağlı olan genellikle bir kuyruk, alıcı hücrenin kararlı bir proteinini içerir. Proteinin periplazmaya veya besiyeri ortamına salgılanması istendiğinde, protein alıcı proteazları tarafından degrade olmasını engeller. Salgılama amaçlı, gerekli sinyalleri taşıyan bir protein hedef protein ile birleştirilir. Bu yolla meydana gelen füzyon protein, genellikle doğal protein gibi salgılanır. Çok sayıda füzyon çifti, spesifik afinite saflaştırma stratejileri ile saflaştırılır. Saflaştırma sonrası kimyasal degradasyon yolu veya spesifik proteaz uygulaması ile füzyon proteinler ayrılır. Füzyon proteinler *in vivo* da hücreler arası proteolizi önlemesi, kararlılığı arttırması gibi avantajlı özelliklere sahiptir. Spesifik ekspresyon habercisi olarak kullanılabilir. [68].

Rekombinant proteinlerin sekresyonu Rekombinant olarak ekspre edilen proteinler sitoplazmaya, periplazmaya veya kültür ortamına salınırlar. Rekombinant proteinin farklı hücresel bölgelere salınması birçok avantajı ve dezavantajı beraberinde getirir. Ürün miktarı fazla olduğu için rekombinant proteinin sitoplazmada ekspresyonu tercih edilir. *E.coli*'de disülfid bağı oluşumu Dsb sistemi ile periplazmada aktif olarak katalizlenir. Sitoplazmadaki sisteinlerin azaltılması tiyoredoksin ve glutoredoksin ile olur. Tiyoredoksin, tiyoredoksin redüktaz ve glutoredoksin, glutatyon tarafından düşük seviyede tutulur. Düşük moleküler ağırlıklı glutatyon molekülü, glutatyon redüktaz ile azaltılır. Bu iki redüktazı kodlayan *trxB* ve *trxB/gor* genlerinin aksaması, *E.coli* sitoplazmasında disülfid bağı oluşumunu sağlar. *trxB* (Novagen AD494) ve *trxB/gor* (Novagen Origami) genlerinden yoksun *E.coli* soyları birçok ekspresyon için seçilmektedir. Hedef proteinin katlanması ve disülfid bağı oluşumu tiyoredoksin redüktaz enzimi içermeyen *E.coli* soyunda tiyoredoksin füzyon proteini ile arttırılır. Membranlar arası iletim, proteinin membrandaki spesifik bir taşıyıcıya yönlendirilmesiyle, N-terminal sinyal peptidler tarafından sağlanır. Bir çok protein iç membranı geçerek periplazmaya iyi bilinen *Sec translokaz* cisimciği ile taşınır. Potansiyel taşınma için sıklıkla kullanılan periplazmik lider diziler *ompT*, *ompA*, *pelB*, *phoA*, *malE*, *lamB* ve β -laktamaz'dan köken almıştır. [68].

Yeni Ekspresyon Sistemleri: Çeşitli uygulamalar için dizayn edilmiş çok sayıda ekspresyon sistemleri vardır. 2003 yılında *E.coli* ekspresyon sisteminde hazırlanmış olan protein data bankasında (PDB) proteinlerin üç boyutlu yapılarının açıklanması için yaklaşık olarak %80'i kullanılmıştır. T7 temelli olan pET ekspresyon sistemi rekombinant proteinlerin üretiminde en çok kullanılanıdır (pET protein data bankasındaki proteinlerin %90'dan fazlası için kullanılmıştır.). λ PL/cI represör (örnek: İnvitrogen pLEX), Trc promoter (örnek: Amersham pTrc), Tac promoter (örnek: Amersham pGEX) ve hibrit *lac*/T5 (örnek: Qiagen pQE) promoterlarını kullanan sistemler en yaygınlarıdır [68].

pET Ekspresyon Sistemleri: 1990 ve 1991 yıllarında araştırmacılar tarafından çeşitli ekspresyon uygulamalarında pET ekspresyon sistemi tanımlanmıştır. Günümüzde 40 farklı pET ekspresyon sistemini ticari olarak bulmak mümkündür. Sistem hibrit promoterlar, çok sayıda klonlama bölgesi, proteaz kesim bölgesi ve çok sayıda farklı ekspresyon amaçlı modifiye edilmiş genetik özellik içerir. Bu sistem ile ekspresyon yapabilmek için, IPTG ile indüklenen *lacUV5* promoter kontrolündeki T7 RNA polimeraz genini (bakteriyofaj T7 geni) kodlayan DE3 faj dizisi içeren lizojenik bir *E.coli* soyu gereklidir. *LacI*, *lacUV5* promoterını baskılar ve ekspresyon plasmitinde T7/*lac* hibrit promoter kodlanır. *LacI* geni kopyası *E.coli* genomunda ve çeşitli özellikteki pET plasmitlerinde bulunur. Yüksek ekspresyon promoterı mutant *LacI*^q işlev gördüğünde zayıf olarak eksprese olan *LacI* geninin represyonu 10 kat oranında arttırılır. IPTG Lac represör proteinini bağlar ve represörün Lac promotera bağlanmasını engeller. Böylece T7 RNA polimeraz geni serbest kalır ve T7 RNA polimeraz enzimi sentezlenir. T7 promoter 20 nükleotid dizisinden oluşur ve *E.coli* RNA polimerazları tarafından tanınmaz. T7 RNA polimeraz transkripsiyonu saniyede maksimum 230 nükleotid şeklinde gerçekleşir. *E.coli* RNA polimerazları (saniyede 50 nükleotid) ile karşılaştırıldığında 5 kat daha hızlıdır. pET ekspresyon plasmidinin protein ekspresyonu T7 RNA polimerazın doğal inhibitörü olan, T7 lizozim enzimi varlığıyla azalır [68, 75].

1.4. Protein Saflaştırma Teknikleri

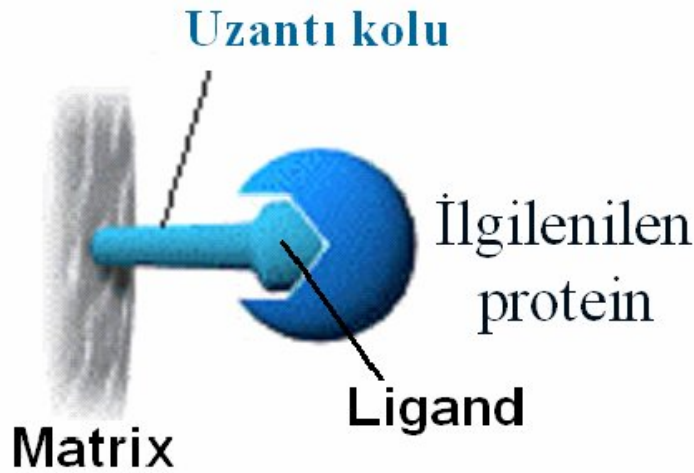
1.4.1. Afinité Kromatografisi

Afinité kromatografisi; bir biyolojik ligand (örneğin; substrat, koenzim, hormon, antikor, nükleik asit v.b.) veya onun sentetik bir analogu ile saflaştırılmak istenen molekül üzerindeki komplementer bağlama bölgesi arasındaki spesifik etkileşimi esas alan bir çeşit

adsorbsiyon kromatografisidir [76, 77]. Bu yöntem ile birçok ayırma ve saflaştırma işlemi kısa sürede gerçekleştirilebilir ve yüksek verimde binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir [15].

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

Ligandın, uygun yöntemlerle suda çözünmeyen Sephadex ve Sepharose gibi katı destek materyaline bağlanarak hazırlanması sonucu oluşturulan bir afinite kolonunda, saflaştırılması düşünülen bir molekül karışımı geçirilirse sadece istenilen molekül ligand tarafından kolonda tutulur. İstenmeyen bütün safsızlıklar, kolondan uygun bir tampon geçirilerek uzaklaştırılır. Kolonda tutulan ilgili molekül, spesifik elüsyonla kolondan alınır. Spesifik elüsyon, ilgili moleküle liganttan daha yüksek afiniteye sahip madde içeren tampon çözelti ile gerçekleştirilir [78]. Bir afinite kromatografisi kolonunun çalışma prensibi Şekil 1.6'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.6 Afinite kromatografisinin şematik gösterilişi [79].

1.4.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromotografisi ile Saflaştırılması

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için en çok kullanılan metod; afinite kromotografisidir. Bu metotla hedef protein kısa zamanda ve tek basamakta yüksek bir verimle saflaştırılarak elde edilmektedir [80].

CA enziminin afinite kromotografisi, ilk defa 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tekniğe yönelik çalışmalar 1974 yılında Whitney, 1975 yılında Wistrand ve arkadaşları, aynı yıl Osborne ve Tashian, 1976 yılında Chanpagol ve aynı yılı takiben Johansen, 1977 yılında Khalifah ve arkadaşları, 1980 yılında Wistrand ve aynı yıl Keha'nın araştırmalarını takiben 1987 yılında Kaul ve Mattiasson, 1995 yılında Arslan ve arkadaşları, 2000 yılında Demir ve arkadaşlarının araştırmaları ile devam etmiştir [81, 82]. Chanpagnol dışında diğer araştırmacılar ligand olarak benzen sülfonamid türevleri, Chanpagol ise bir heteroaromatik sülfonamid bileşiği olan asetazolamidi kullanmıştır [15, 83]. Ozensoy ve ark. 2004 yılında Eupergit C-250 L polimer materyalinin aktif oksiran gruplarına, karbonik anhidrazın güçlü inhibitörü olan p-aminobenzensülfonamid bağlanmıştır [84]. Literatürde, C-250 L polimer bileşiği kullanılarak afinite kromatografisi üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır [85, 86].

1.5. Amaç

Bu çalışmada temel hedefimiz giriş bölümünde belirtildiği gibi HCAII enziminin sülfonamidlere karşı ilgisinin arttırılmasıdır. Bu amaçla enzimin aktif bölge çevresinde bulunan Hidrofil aminoasit Asparajin 67, Hidrofob aminoasit İzölösün ile yönlendirilmiş mutagenез tekniği kullanılarak değiştirilecektir. Bu değişim ile enzimle inhibitör arasındaki hidrofobik etkileşme arttırılarak, HCAII enziminin inhibitörlere karşı ilgisinin arttırılacağı düşünülmektedir. Hidrofobik etkileşmenin inhibitör gücüne etkisinin araştırılması amacı ile Hidrofob aminoasit olan Lösün 204, Hidrofil aminoasit Serin ile değiştirtirilecektir.

Bu çerçevede yukarıda hedeflenen amaca göre, planlanan çalışmanın basamakları aşağıdaki şekilde özetlenmektedir;

(i) pET31b ekspresyon plasmidi içerisinde bulunan HCAII geninde PCR'a dayalı oligonükleotit yönlendirilmiş mutagenез tekniği kullanarak değiştirilmesi planlanan aminoasitler değiştirilecektir.

(ii) Yapılan bu mutagenез, DNA dizi analiziyle birebir doğrulanacaktır.

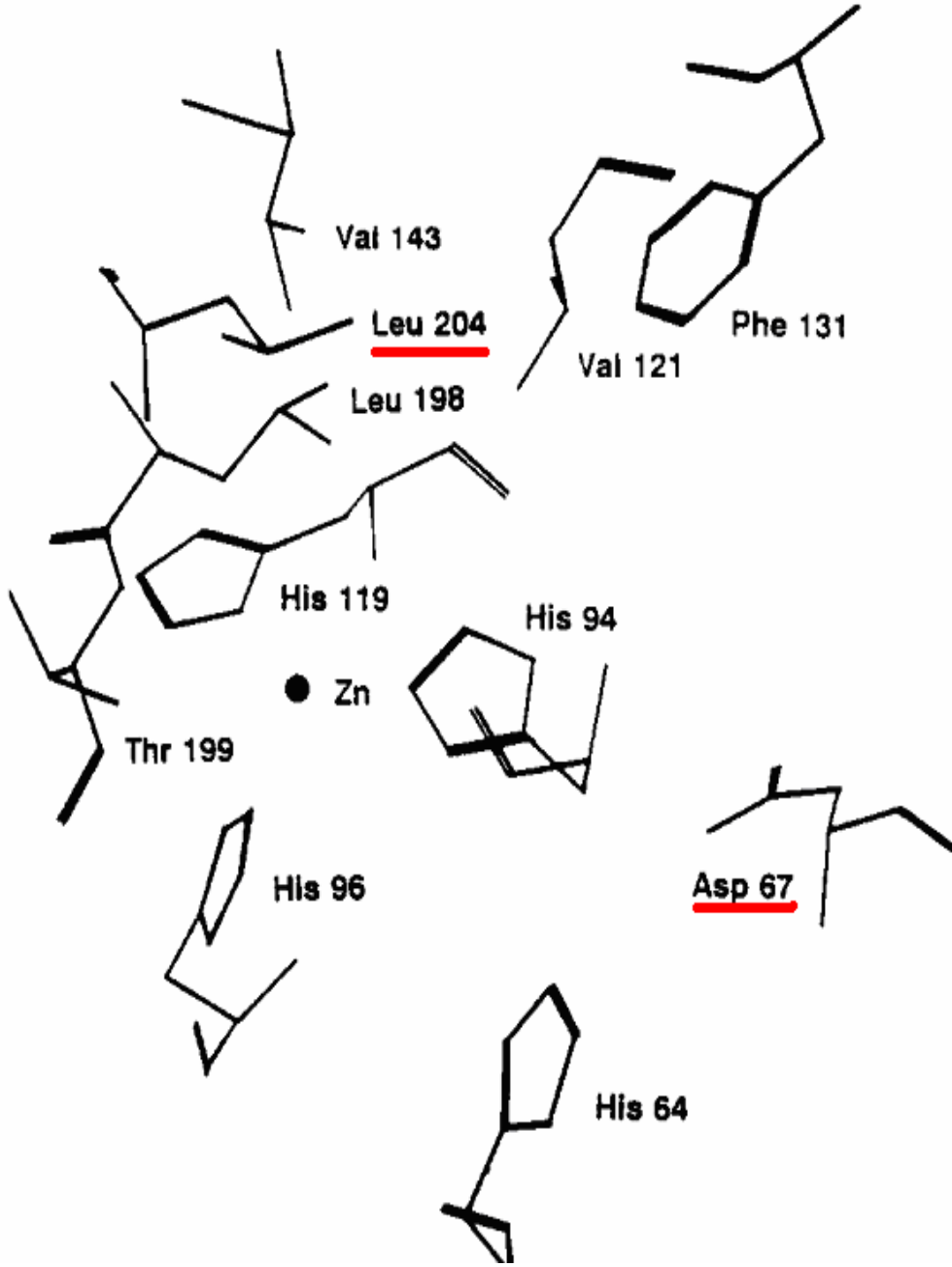
(iii) Elde edilen mutant plasmidler ve yabani tipte HCAII yi taşıyan plasmid *E.coli* BL-21 (DE3) hücrelerinde ekspre edilecektir.

(iv) Ekspre edilen proteinler Karbonik anhidraz spesifik affinite jeli kullanılarak saflaştırılacaktır.

(v) Ekspre edilen proteinlerin saflığı ve konsantrasyonu için SDS page Analizi ve Bradford yöntemleri uygulanacaktır.

(vi) Mutant proteinlerin ve yabani HCAII proteinlerin hidrataz aktiviteleri değerlendirilerek karşılaştırılacaktır.

(vii) Mutant proteinlerin ve yabani HCAII proteinlerin asetazolamid ve sulfonamid inhibitörlerine karşı ilgileri araştırılacaktır. IC₅₀ değerleri elde edilip karşılaştırılacaktır.



Şekil 1.7 HCAII enziminin aktif bölgesi ve seçilen aminoasitler [50].

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Merck ve Sigma Aldrich den temin edilmiştir. Moleküler biyoloji materyalleri ve yönlendirilmiş mutagenез reaksiyonunda kullanılan kimyasal ve enzimler Stratagene ve Fermentas MBI firmalarından temin edilmiştir.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Çizelge 2.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

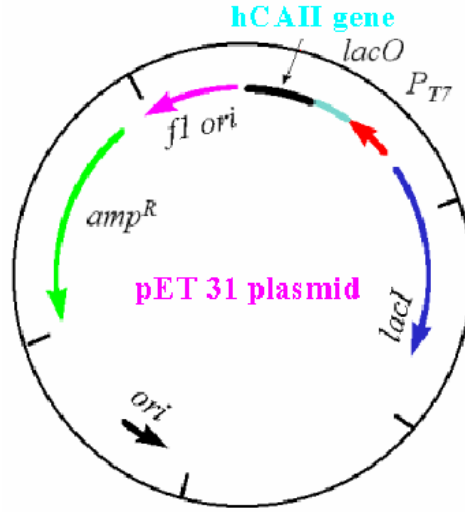
Kullanılan Gereç	Modeli
-80°C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, USA
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Kromatografi Kolonu	Sigma (1cm çap ve 20cm uzunluk)
Otoklav	Hirayama, Japonya
Thermocycler	Techne Progene, İngiltere
pH Metre	WTW, Almanya

Dijital Görüntüleme Sistemi	UVP, İngiltere
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
MikroSantrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Germany
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
SDS PAGE Aparatları	Atto, Japonya
Horizantal 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	Heios α (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye

2.1.3. Bakteriyel Soylar ve Plasmidler

Klonlama ve stok amaçlı DH5 α (SupE44 Δ lacU169 (Φ 80 LacZ Δ M15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 r1 A1) *E.coli* soyu kullanılmıştır. Mutagenез için, mutagenез kitinde önerilen XL-1Blue süper kompetent (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]) *E.coli* soyu kullanılmıştır. Ekspresyon amaçlı çalışmada kullanılan bakteri soyu BL_21 (DE3) 'dır. Bu soyun genotipi (*E. coli* B F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal λ (DE3) şeklindedir [87].

Çalışmada kullanılan rekombinant insan karbonik anhidraz (HCAII) geni taşıyan pET plasmid USA University of Florida, College of Medicine, David N. Silverman ,dan temin edilmiştir. Plasmid haritası şekil 2.1'de gösterilmiştir [88].



Şekil 2.1 pET 31 plasmidi [88].

2.1.4. Tamponlar ve Çözeltiler

2.1.4.1. *E.coli* için Bakteriyel Kültür Ortamları

E.coli için gerekli kültür ortamı olarak LB ve LB-agar kullanılmıştır. Toz halinde temin edilen bakteriyel medyumlar üretici firmanın belirttiği şekilde hazırlanarak ddH₂O ile hazırlanarak otoklav edilmiştir.

2.1.4.2. Antibiyotik Hazırlanması

Kültürlerde kullanılan Ampicillin stokları 100mg/ml olacak tarzda steril ddH₂O ile hazırlandı. 0.22 mikronlukluk filterler kullanılarak steril edildi.

2.1.4.3. Plasmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.2 Solusyon 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.	

Çizelge 2.3 Solusyon II

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon
1M NaOH	200mM
% 10 SDS	%1
ddH ₂ O	10mL 'ye tamamlanır.

Çizelge 2.4 Solusyon III

Kimyasal Madde	Miktar
KOAc	29,44g
%99 Glasiyal Asetik Asit	11,5mL
ddH ₂ O	100mL 'ye tamamlanır
KOAc, yaklaşık 50mL suda çözülür, asetik asit ilave edilir. Su eklenerek 100mL 'ye tamamlanır. -20°C 'de saklanır.	

2.1.4.4. Agaroz Jel Elektroforez Tamponları

Çizelge 2.5 (0,5)XTBE (Tris-Borate) Tampon

Stok solüsyon	Son Konsantrasyon
1M Tris-borate	0,045M
0.5M EDTA (pH 8)	0,001M

Çizelge 2.6 6x DNA Yükleme Tamponu

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
%99 Brophenol Blue	0.25% (w/v) bromphenol blue,
%99 Ficol	15% (w/v)

2.1.4.5. Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlama Solüsyonu

Çizelge 2.7 Kompetent Hücre İçin Kullanılan Solusyon (DH5 α ve XL-1 Blue *E.coli* soyları için)

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

Çizelge 2.8 Kompetent Hücre İçin Kullanılan Tritilasyon tamponu (BL-21 *E.coli* soyu için)

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

2.1.4.6. Protein Ekspresyonunda Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.9 Bakteri Yıkama tamponu

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
Tris-base	0,6g
dH ₂ O	100mL'ye tamamlanır
Tris-base 90mL dH ₂ O'ye çözülür. 1M HCl ile pH=7,6'ya ayarlanarak toplam hacim 100mL'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.10 Lizis Tamponu : 20mM Tris / 0,5mM EDTA / 0,5mM EGTA (pH=8,7)

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-base	2,44g
0,5M EDTA	1,0mL
0,5M EGTA	1,0mL
dH ₂ O	1L'ye tamamlanır.
Tris-base, 0,5M EDTA, 0,5M EGTA 800mL dH ₂ O'ye çözülür. 1M HCl ile pH=8,7'ye ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır. +4° C'de saklanır.	

2.1.4.7. Sepharoz 4B-L-tirozin-sulfonamid Afinité Jel Tamponları

Çizelge 2.11 Afinité Jeli Dengeleme Tamponu : 25mM Tris-HCl / 22mM Na₂SO₄ (pH=8.7)

Kimyasal Madde	Miktar
Na ₂ SO ₄	14,20g

Tris-base	3,0275g
dH ₂ O	1L 'ye tamamlanır
Na ₂ SO ₄ ve Tris-base 950mL dH ₂ O 'de çözülür. 1M HCl ile pH=8,7'ye ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.12 Afinite Jeli Yıkama Tamponu : 25mM Tris-HCl / 22mM Na₂SO₄ (pH=8.7)

Kimyasal Madde	Miktar
Na ₂ SO ₄	3,124g
Tris-base	3,0275g
dH ₂ O	1L 'ye tamamlanır
Na ₂ SO ₄ ve Tris-base 950mL dH ₂ O 'de çözülür. 1M HCl ile pH=8,7'ye ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.13 Afinite Jeli Elüsyon Tamponu : 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH=5,6)

Kimyasal Madde	Miktar
NaCH ₃ COO	2,04g
NaClO ₄	9,187g
dH ₂ O	150mL 'ye tamamlanır
NaCH ₃ COO ve NaClO ₄ 120mL dH ₂ O 'de çözülür. 1M HCl ile pH=5,6'ya ayarlanarak toplam hacim 150mL'ye tamamlanır.	

2.1.4.8. CA-CO₂ Hidrataz Enzim Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.14 CO₂ Hidrataz Aktivite Tamponu : 0,15 M Na₂CO₃ / 0,1 M NaHCO₃ (pH=10)

Kimyasal Madde	Miktar
Na ₂ CO ₃	15,9g
NaHCO ₃	8,4g
dH ₂ O	1L'ye tamamlanır
Na ₂ CO ₃ ve NaHCO ₃ 950mL dH ₂ O 'de çözülür. pH=10 'a ayarlanır ve toplam hacim 1L'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.15 CO₂ Hidrataz Aktivitesi İndikatör Tamponu

Kimyasal Madde	Miktar
Fenol red	0,01256g
NaHCO ₃	0,2184g
dH ₂ O	1L'ye tamamlanır

Çizelge 2.16 CO₂ Hidrataz Aktivitesi CO₂ Çözeltisi :

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

2.1.4.9. Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Çizelge 2.17 Bradford Boyama Çözeltisi

Kimyasal Madde	Miktar
Coomassie brilliant blue G-250	0,1g
Etanol	50mL
%95'lik fosforik asit	100mL
dH ₂ O	1L'ye tamamlanır

Çizelge 2.18 Standart BSA Çözeltisi

Kimyasal Madde	Miktar
Serum Albumin	0,01g
dH ₂ O	10mL'ye tamamlanır

2.1.4.10. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez Tamponları

Çizelge 2.19 Ayırma Jeli (%12)

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon
%30 Akrlamid 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 H₂O eklenir.

Çizelge 2.20 Yıgma Jeli (%5)

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 H ₂ O eklenir.	

Çizelge 2.21 Tank Tamponu

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

Çizelge 2.22 Numune Tamponu

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon
1M Tris	50mM

%10 SDS	%1
0.5M EDTA pH 8	2mM
%99 Merkптоethanol	%1
%100 Gliserol	%10
%99 Bromfenol Mavisi	%20

Çizelge 2.23 Boyama Çözeltisi

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
Coomassie Mavisi R250	0.25g
%95 Etanol	100mL
%10 Asetik asit ile karıştırılır.	

Çizelge 2.24 Arıtma Çözeltisi

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

2.2. METOD

2.2.1. Cam Malzeme ve Plastik Malzemenin Hazırlanması

Isıya dayanıklı malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, solüsyonlar, kültür ortamları ve cam malzeme 121°C’ de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

2.2.2. DNA ile İlgili Teknikler

2.2.2.1. Plasmid DNA İzolasyonu (Alkalin Lizis Plasmid Miniprep)

Plasmid DNA izolasyonu [70]’de belirtildiği gibi yapıldı. Tek koloniden yapılan ekimle 10mL’lik olarak hazırlanan kültür 37°C’ 16-18 saat inkübe edildi. 1,5mL’lik ependorflara aktarıldı. 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılarak, pellet, 110µL Solusyon I (çizelge 2.2) ile çözüldü. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Solusyon II (çizelge 2.3)’ den 200µl eklenerek yavaşça karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Buzda bekletilmiş tübe, Solusyon III (çizelge 2.4) ’den 150µL eklendi. 10000 rpm’de 5 dakika çevrilerek hücre yığıyla kromosomal DNA birbirinden ayrılması sağlandı. Supernatant, yeni bir 1,5mL ependorfa aktarıldı. Fenol/kloroform ve etanol presipitasyonu ile elde edilen plasmid DNA 30µl de steril dH₂O içinde çözülerek –20⁰C’de saklandı.

2.2.2.2. Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu

Proteinler açıdan temizlenecek DNA materyaline eşit hacimde Fenol pH 8 ilave edilir. Vortekste 20 saniye ile 1 dakika arasında karıştırıldı ve 10000 rpm’de 5 dakika çevrildi. En üstteki faz, yeni bir ependorfa aktarıldı. Kloroform:izoamil alkol (24:1)’ün eşit volümü de alınarak 10000 rpm’de 5 dakika çevrilir. Supernatant alınarak etanol presipitasyonu yapılır ve 30µl de steril dH₂O’de çözülerek –20⁰Cde saklanır [70].

2.2.2.3. Etanol Çöktürmesi

Konsantre edilecek DNA içeren solusyona iki hacim %95 etanol eklenir. En az 30 dakika -20°C’ de inkübe edilir. 10 dakika 10000 rpm’de çevrilir. Supernatant atılır ve 700µL %70’lik etanol eklenerek DNA pelleti yıkanır. Yıkama sonunda elde edilen pellet havada kurutulur ve 30µL de steril dH₂O eklenerek -20⁰C de saklanır [70].

2.2.2.4. DNA Miktarı ve Kalitesinin Ölçülmesi

2.2.2.4.1. Spektrofotometrik Yöntemler

DNA, 1:200 oranında TE ile sulandırıldı ve kuvarz küvetler kullanılarak 260 nm’de DNA’nın UV absorpsiyonu okundu. Aşağıda belirtilen formül kullanılarak DNA konsantrasyonu hesaplandı. Aynı zamanda elde edilen DNA nın saflığıda OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı elde edilerek öğrenildi [89].

$$50\mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \text{mL}'\text{de } \mu\text{g cinsinden konsantrasyon}$$

2.2.2.4.2. Agaroz Jel Elektrofrez

Görüntülenmesi gereken DNA örnekleri agarose jel elektrofrezinde yürütüldü. Agaroz jel elektrofrezinde yürütülmek istenen DNA’nın büyüklüğüne göre farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. 0,5xTBE’de (çizelge 2.5) hazırlanan %0.7-2 olarak kaynatılarak hazırlanan agaroz jelleri, 50°C’ye kadar soğutulduktan sonra, son konsantrasyonu 0,5µg/mL olacak tarzda Etidyum bromid eklendi. Agaroz jel aparatlarına döküldü ve polimerize olasıya kadar beklendi.

DNA örnekleri yükleme tamponuyla (çizelge 2.6) karıştırılarak agaroz jele yüklendi. Agaroz jelleri 80 Volta boya yürütülerek, yükleme tamponu izlenerek, tampon jelin ¾’ünü geçene kadar beklendi. Elektrofrez sonucu UV iluminator kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen jel Dijital görüntüleme Sistemi kullanılarak değerlendirildi.

2.2.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR reaksiyonları 50 μ L'lik toplam hacimde, Stratagene quick-change site directed mutagenesis kit prosedürüne göre uygulanmıştır [90]. 20ng, 30ng, 40ng ve 50ng gibi farklı DNA konsantrasyonlarda DNA kaynağı kullanılarak aşağıda çizelge 2.25 de belirtildiği reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.25 Mutagenesis PCR reaksiyonları

Mutagenesis PCR İçerik	Miktar ve Son Konsantrasyon
Tampon 10x	5 μ L (1x)
dNTP karışım	1 μ L
Forward primer (100ng/ μ L)	1,25 μ L (125ng)
Reverse primer (100ng/ μ L)	1,25 μ L (125ng)
Plasmid DNA (10ng)	X μ L
dH ₂ O μ L
Enzim (2,5u/ μ L)	1 μ L (2,5u)
Toplam	50 μ L

Çizelge 2.26 Mutagenesis PCR Koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95 ⁰ C	30 saniye
2	16	95 ⁰ C	30 saniye
		55 ⁰ C	1 dakika
		68 ⁰ C	6 dakika

2.2.3. Mikrobiyolojik Metodlar

2.2.3.1.Ön Kültür Hazırlanması

LB-agar'a tek koloni olacak şekilde ekilen bakteri kolonilerinden tek bir koloni önce, son konsantrasyonu 10µg/mL olan ampisilin içeren LB ortamına aşılandı. 37°C' de çalkalayıcı inkübatörde 16-18 saat inkübe edildi.

2.2.3.2. Bakteri Stoklarının Korunması

İlgili bakteri soyları ve plasmid soyları ön kültürle üretildikten sonra %30'luk steril gliserolle son konsantrasyonu % 15'lik olacak şekilde sulandırıldı. Direkt olarak -80 içerisine alındı.

2.2.3.3. Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlanması

E.coli'nin DH5α ve XL-1 Blue soylarını kompetent hale getirmek için tek koloni olarak ekildiği LB-Agar üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C' de bir gece boyunca üretildi. Bundan alınan 5mL örnek, içinde 100mL taze LB olan 500mL'lik erlene kondu ve 37°C' de yaklaşık 2-3 saat OD₆₀₀=0,4'e ulaşıncaya kadar büyütüldü. Bu aşamada kültür, 5 dakika buzda bekletildi. Kültür, falkonlara alınarak +4°C' de 5 dakika 3000 rpm'de santrifüjlendi. Supernatant atıldı ve 25mL soğuk 0,1M CaCl₂ konuldu ve yavaşça karıştırıldı. 2 dakika buzda bekletildi. +4°C' de 10 dakika 3000 rpm' de santrifüjlendi. 10mL soğuk 0,1M CaCl₂'de 1-4 saat bekletildi. 10mL steril %40 gliserol eklenerek hafifçe karıştırıldı. Önceden buz üzerinde bekletilmiş ependorflara aktarılarak -70°C' ye kondu [70, 91].

Ayrıca ekspresyonda kullanılan BL-21(DE3) codon plus soyu kompetent hale getirmek için tek koloni olarak ekildiği LB-Agar üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C' de bir gece boyunca üretildi. Bundan alınan 5mL örnek, içinde 100mL taze LB olan 500mL'lik erlene kondu ve 37°C' de yaklaşık 2-3 saat OD₆₀₀=0,2'e ulaşıncaya kadar büyütüldü. Son konsantrasyon 20mM olacak şekilde MgCl₂ ve son konsantrasyon yaklaşık olarak %0.2 olacak şekilde glukoz ilave edildi. Tekrar 37°C'de çalkalayıcı inkübatörde OD₆₀₀

= 0.5nm olana kadar büyütüldü. Kültür +4°C’de 2 saat bekletildi ve +4°C’de 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılır, pellet tritalation tamponu (100mM CaCl₂, 70mM MnCl₂, 40mM Na Asetat, ph=5.5) ile süspanse edilir. +4°C’de 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet %15 gliserol içeren 25mL tritalation tamponu ile süspanse edilir. Önceden buz üzerinde bekletilmiş ependorflara aktarılarak -70°C’ ye kondu [92].

2.2.3.4. Transformasyon

Kompetent hücreler, -70°C’ den alındı ve 30-60 dakika süreyle buzda bekletildi. Ependorfa 200µL kompetent hücreden alındı ve her bir tüpe 50-100ng plasmid DNA’sı kondu. Dikkatlice karıştırılarak 30 dakika buzda bekletildi. Sıcak şoku için 42°C’ de 90 saniye tutuldu ve hemen buza alınarak burada da 2 dakika bekletildi. Önceden 37°C ısıtılmış 800µL LB eklendi. 37°C’ de çalkalayıcı etüvde 1-1,5 saat büyümeye bırakıldı. Bu kültürün 100 µL’si alınarak taze hazırlanmış, 100 µg/mL ampisilin içeren LB-agar petrisine damlatıldı ve öze ile tek koloni tarzında ekim yapıldı. Geriye kalan 900µL kültür de epindorfa alınarak 2 dakika 13000 rpm’de santrifüjlendi. Supernatant atıldı ve pellet 100µL LB’de çözülerek ampisilin içeren taze LB-agar petrisine damlatıldı ve yayıldı. Her iki tür petri de 15 dakika beklendikten sonra etüve konarak 37°C’ de bir gece büyümeye bırakıldı. Petrideki kolonilerin durumuna bakarak transformasyon etkinliği saptandı [70, 91].

2.2.3.5. Rekombinant Protein Ekspresyonu

2.2.3.5.1. IPTG Kullanılarak Hedef Proteinin İndüklenmesi

Ekspresyonu T7 promotor sistemi ile başlatılması için, ilgili genleri taşıyan pET plasmid BL-21 DE3 hücrelerine transforme edildi. 500mL’lik steril erlene 100mL LB konuldu ve 12,5mg/mL ampisilinden 100µL konuldu. LB-Agar + Ampisilin üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C’ de 300 rpm de 3-4 saat inkübasyona bırakıldı.

OD₅₅₀ =0,6-0,8’e ulaştığında 250µL 5mM ZnCl₂ ve 400µL 0,1M IPTG bakteri kültürüne eklendi. Kültür 30°C’ de 300 rpm’de büyümeye bırakıldı [50, 93].

2.2.3.5.2. Bakterilerin Yıkınması

Bakteri solüsyonu 50mL'lik falkonlara aktarıldı ve 3000 rpm'de +4°C' de 10 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı ve bakteriyel hücre pelleti 10mL 50 mM Tris, pH=7,6 ile süspanse edildi. 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı ve supernatant atıldı. Yıkama işlemi bir kez daha yapıldı ve pellet kurutulularak -20°C' de liziz prosedürüne geçmeden önce saklandı [50, 93].

2.2.3.5.3. Bakteri hücrelerinin Lizisi

Bakteriyel hücre pelleti 10mL soğuk liziz tamponu ile süspanse edildi ve buza konuldu. 100µL 100mM PMSF ve 250µL 10mg/mL lizozim solüsyonlarından eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 100µL 5mM ZnCl₂ eklendi ve 10 dakika buzda bekletildi. Hücre lizatına 1mL %3'lük protamin sülfat solüsyonundan eklendi ve pipetajla karışım sağlandı. Falkon içerisindeki örnek 3000 rpm'de +4°C' de 10 dakika santrifüj yapıldı.

Santrifüjlenen örneğin viskozitesi kontrol edildi, hala viskoz ise %3'lük protamin sülfat solüsyonundan 500µL eklendi. Tekrar iyi bir şekilde karıştırıldı ve 3000 rpm'de +4°C' de 2 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant temiz bir falkona alındı [50, 93].

2.2.4. Biyokimyasal Metodlar

2.2.4.1. Afinite Kromatografisi Metoduna Göre Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması

2.2.4.1.1. Diyaliz

Lizize uğratılan bakteri solüsyonu afinite kromatografisi dengeleme tamponuna karşı 3 saat +4° C' de diyaliz edildi. Dengeleme tamponu yarım saat arayla değiştirildi.

2.2.4.1.2. Afinite Kromotografisi

2.2.4.1.2.1. Karbonik Anhidraz Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose 4-B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose 4-B'nin serbest -OH grupları CNBr ile aktifleştirilmiştir. Sepharose 4-B afinite jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak bağlandı. Sülfonamid diazolanarak L-tirozine kenetlendirildi. Afinite jelinin uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da sülfonamid oluşturur. Sülfonamid karbonik anhidraz enziminin spesifik inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına katılarak CA enziminin saflaştırılmasında kullanılmıştır.

- **Sepharose 4-B'nin aktifleştirilmesi ve L-Tirozinin Kolona Eklenmesi**

20mL Sepharose 4B jeli distile su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirilerek bir süspansiyon elde edildi. Karıştırılan süspansiyona 4g toz haline getirilmiş CNBr katıldı. pH metre ile süspansiyonun pH'ı 4M NaOH ile 11'de sabit tutuldu. Buz ilavesi ile reaksiyon sıcaklığı 20⁰C 'de tutuldu. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (15-20 dakika). Karışım bir bushner hunisine aktarıldı, 250mL soğuk 0.1M NaHCO₃ tampon çözeltisi (pH=10) ile yıkandı ve bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20mL sinde 8mg tirozin çözüldü. Beherdeki karışıma soğuk çözelti yavaşça ilave edildi. Bağlanma süresi olan 90 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karışım 4⁰C 16 saat bekletildi. Sürenin sonunda jel, yıkama suyu 280nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen ortamdan uzaklaştırıldı. Yıkama 100mL 0.2M NaHCO₃ tamponu (pH=8.8) ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel aynı tamponun 40mL'si içine alındı.

- **Sülfonamidin Kenetlenmesi**

25mg sülfonamid, 0⁰C civarında 10mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75mL NaNO₂ ihtiva eden 0⁰C'deki 5mL çözelti, sülfonamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış olarak bulunan sülfonamid 40mL Sepharose 4B-L-Tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH=9.5 değerine çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda

sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1L destile su ve 200mL 0.05M Tris-SO₄ (pH=7.5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde saklandı [19].

2.2.4.2. Protein Karakterizasyon Metodları

2.2.4.1. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein konsantrasyonu, Bradford Boya-Bağlama metodu ile belirlendi [94]. Tayin işlemlerinde; 1mL’inde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100µL alındı destile su ile tüm tüplerin hacmi 1mL’ye tamamlandı. 5ml Bradford reagent eklendi. 2 dakika vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra her bir örneğin 595 nm’ de absorbansı okundu. Bunun için sadece Bradford reagenti içeren dilüsyon kullanıldı. 595 nm’deki absorbansa karşı µg’daki protein miktarı hesaplandı.

2.2.4.2. SDS-PAGE

Ekspresyon sonucunsa elde edilen protein ekstraktaları proteinleri moleküler ağırlığın ayrılmasında kullanılan bir method olan SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde değerlendirildi [95].

Öncelikle, çizelge 2.19’de %12’lik ayırma jelini oluşturan çözeltiler, APS hariç karıştırıldı. APS eklendikten sonra karışım, jel kasetine çizgi hizasına kadar döküldü. Jelin yüzeyini düzleştirilmek için 0.3mL 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 2.20) 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 2.21) ile dolduruldu. Örnek uygulama tamponu (çizelge 2.22) , proteinle %50 oranında karıştırıldı ve 2 dakika 95°C’ de kaynatıldı.

Protein örnekleri kuyulara yüklendi. Akım, proteinler %5'lik yığma jelinde 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 2.23) içine alındı. Protein bantları net bir şekilde görünene kadar çalkalayarak boyandı. Daha sonra arıtma çözeltisine (çizelge 2.24) alınarak hafifçe karıştırıldı. Böylece boyanın fazlası alınmış oldu. Daha sonra UV ışığı altında protein bantları incelendi. Jel, distile suya alınarak saklandı [95, 96].

2.2.4.3. Aktivite Tayin Metodları

2.2.4.3.1. CO₂-Hidrataz Aktivitesi

Karbonik anhidraz enziminin, saflaştırılma sürecindeki aktivite tayinleri, CO₂-hidrataz aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Maren ve arkadaşlarının geliştirdikleri bu yöntem, CA enziminin saflaştırılma sürecinde diğer araştırmacılar tarafından yaygın olarak uygulanmıştır.

Bu yöntem, CO₂'nin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ nedeniyle pH değerinin 10.0'dan 7.4'e düşmesi süresinin ölçümü hesabına dayanır. Yöntemde indikatör olarak, pH=7.4 değerinde renk değiştiren fenol kırmızısı, tampon olarak da pH değeri 10.0 olan karbonat tamponu (0,15M Na₂CO₃ / 0,1M NaHCO₃) kullanıldı [97].

Reaksiyon tüpüne önce 2mL indikatör ve 1,5mL doymuş CO₂ çözeltileri konuldu. Bu karışımın üzerine, enzim çözeltisinden 0,1mL eklendi ve aynı anda 0,4mL karbonat tamponu katılarak, rengin kırmızıdan sarıya (pH değerinin 10.0'dan 7.4'e) dönüşmesi 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 hesaplanır [73].

2.2.4.4. İnhibisyon Çalışması

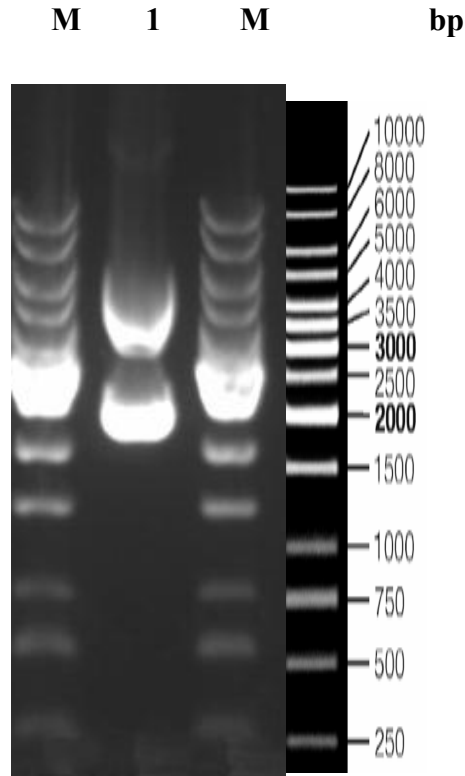
İnsan karbonik anhidraz II enziminin ve mutant proteinlerin IC_{50} değerlerini bulmak için hidrataz aktivitesi üzerine sülfonamid ve acetozolamid inhibitörleri farklı konsantrasyonlarda çalışıldı. Öncelikle enzimlerin inhibitörsüz ortamdaki aktiviteleri belirlendi. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. İki inhibitörün farklı konsantrasyonları çalışıldı ve aktivitelerindeki değişim ölçüldü. Elde edilen değerlerden % aktiviteleri hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak her bir inhibitörün I_{50} değerleri hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. pET31-HCAII Plasmidi

Dr. David N. Silverman'dan temin edilen HCAII genini taşıyan pET31 plasmidi bölüm 2.2.3.4'de anlatıldığı gibi kompetent hale getirilmiş olan *E.coli* DH5 α soyuna aktarıldı. Ampisilin içeren LB-Agar petrilerinde büyüyen kolonilerden biri ampisilin içeren LB'ye ekildi ve 37 $^{\circ}$ C'de 160 rpm'de 16-18 saat büyümeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası %15 son konsantrasyona sahip gliserol ile stok hazırlandı ve -80 $^{\circ}$ C derin dondurucuda saklandı.

PCR amplifikasyonunda gerekli olan temiz DNA kalıbı için pET31-HCAII plasmidi taşıyan *E.coli* soyundan bölüm 2.2.2.1'de anlatılan Alkalın Lizis Plasmid Miniprep Yöntemi ile plasmid izolasyonu yapıldı [70]. İzole edilen plasmidin varlığı ve saflığı %1'lik agoroz jel elektroforeziyle belirlendi. Ribonükleaz muamelesiyle RNA'larından temizlenmiş plasmid DNA konsantrasyonu ve saflığı ayrıca spektrofotometrik olarak belirlendi.



Şekil 3.1 Alkalın Lizis Miniprep Metodu ile Elde Edilen pET31-HCAII Plasmidin Agoroz Jel Elektroforez Sonucu (M: 1kb DNA Marker, 1: Halkasal pET31-HCAII Plasmidi)

3.2. HCAII Geninde Yönlendirilmiş Mutageniz Stratejisi

HCAII geninde farklı araştırıcılar tarafından farklı mutageniz yöntemleri kullanılarak mutasyonlar oluşturulmuştur. Özellikle enzim aktif bölgesindeki aminoasitler değiştirilerek enzim aktifitesindeki değişimler ve inhibitörlere olan ilgisi araştırılmıştır. Karbonik anhidraz izoenzimleri içinde katalitik aktifitesi en yüksek olan HCAII enzimi ile yapılan yönlendirilmiş mutageniz çalışmaları incelenmiş ve enzim aktif bölgesinde bulunan, inhibitörle ilişkisinde önemli olduğu düşünölen hidrofilik ve hidrofob ceplerde yer alan Asparajin 67 ve Lösin 204 amino asitlerinin değiştirilmesine karar verilmiştir. Hidrofilik cepte yer alan Asparajin 67, hidrofob amino asit olan İzölösin 67 ile değiştirilmiş hidrofilik cebin yapısı değiştirilmiştir.. Hidrofob cepte yer alan Leu204 hidofilik aminoasit olan Serin ile değiştirilmesi ile hidrofob cebin yapısı değiştirilmiştir.

Bu amaçla mutageniz kitleri içerisinde etkili olduğu düşünölen Stratagene Quick Change Site Directed Mutageniz kiti kullanılmıştır. Kitin belirtilen özelliklerde, primerlerin uzunluğuna, bağlanma derecesine, %GC çifti içeriğine dikkat edilerek primer dizaynı yapılmıştır [86, 98, 99] (Ek1)

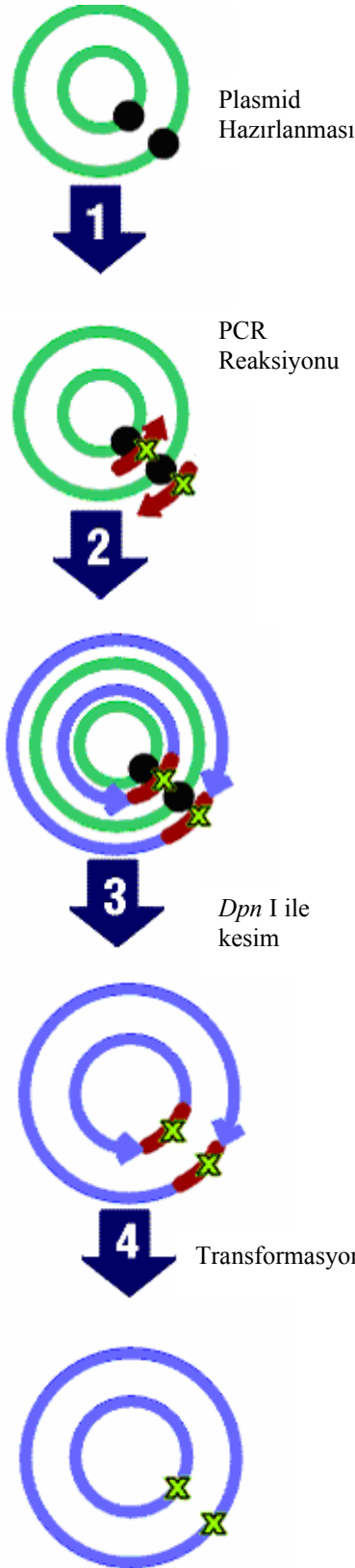
Çizelge 3.1 HCAII Mutageniz Primerleri

Primerin Adı	Uzunluğu (bp)	%GC İçeriği	Tm °C	Dizisi
Asn67-Forward	34	44,12	79,7	5'-CCTCAACAATGGTCATGCTTTC AT CGTGGAGTTT-3'
Asn67-Reverse	34	44,12	79,7	5'-AAACTCCAC GAT GAAAGCATGACCATTGTGAGG-3'
Leu204-Forward	26	53,85	77,6	5'-CCCTCCTCTT TCC GAATGTGTGACCT-3'
Leu204-Reverse	26	53,85	77,6	5'-AGGTCACACATT C GAAGAGGAGGG-3'

Stratagene Quick Change Site Directed Mutagenesis kiti ile çift zincirli halkasal plasmitte mutasyon oluşturulabilmektedir. Böylece tek zincirli kalıba ve klasik yöntemlerde olduğu gibi ayrıca bir ek klonlama işlemine gereksinim ortadan kalkmıştır. Bu kit ile nokta mutasyonlar oluşturulabilir, aminoasit değişimleri yaratılabilir, tek yada çok sayıda aminoasit delesyona ve insersiyana uğratılabilir. Bu metod *pfuTurbo* DNA polimeraz enzimi gibi kontrollü DNA sentezi yapabilen ve mutasyon hızı *Taq* polimeraza göre oldukça düşük proofreading polimeraz enzimi kullanılmıştır. Ayrıca bu enzimin özelliği standart polimerazlara göre daha uzun DNA dizilerini amplifiye edebilmesidir. Yönlendirilmiş mutagenesis Techne PCR cihazı ile gerçekleştirilmiştir. *pfuTurbo* DNA polimeraz enzimi yüksek verimde çalışarak heriki zinciride çoğaltır. Prosedürün temel basamakları Şekil 3.2’de gösterilmektedir.

3.3 Mutasyonların Otomatik Dizi Analizi Sonuçları

Mutagenesis yapılan HCAII nin istenilen mutasyonu taşıyıp taşımadığı otomatik dizi analizi ile kontrol edilmiştir. Bu amaçla ampisilin içeren LB agar petrisinde ekili olan mutant klon LARK technologies, UK ye gönderilmiştir. pET 31 plasmid içerisinde bulunan T7 terminator ve pET upstream primerleri kullanılarak forward ve revers dizileri ile ilgili bilgi elde edilmiştir. Elde edilen dizi analizi sonuçları biyoinformatik olarak NCBI’da analiz edilmiş ve yabancı tip HCAII geni ile karşılaştırılmıştır.



(1) Reaksiyon için çift zincirli değiştirilmek istenilen bölgeyi içeren plasmid DNA ve istenilen mutasyonları taşıyan, spesifik olarak dizayn edilmiş primerlere gereksinim vardır.

(2) (3) Oligonükleotid primerler, vectorün karşılıklı zincirlerine bağlanır ve *pfuTurbo* DNA polimeraz reaksiyon süresince karşılıklı zincirleri çoğaltır. Sentezlenen mutant plasmidler çentik taşırlar.

(4) PCR ürünleri *Dpn* I endonükleaz enzimi ile muamele edilir. Hedef dizisi 5'-Gm⁶ATC-3' olan *Dpn* I endonükleaz enzimi metillenmiş DNA'ya spesifiktir ve metillenmiş DNA'yı keser. Yeni sentezlenen zincir henüz metillenmemiş olduğundan *Dpn* I endonükleaz enzimi bu zincirleri tanıyamaz. Bu işlem sonucunda yeni sentezlenen mutant plasmidlerin seçimi sağlanır.

(4) Daha sonra mutant plasmidler çentiklerin tamamlanması için XL-1 Blue süper kompetent *E.coli* soyuna tranforme edilir. Transformasyondan sonra XL-1 Blue süper kompetent hücreler çentikleri onarır.

Şekil 3.2 Yönlendirilmiş Mutagenез Prosedürü Temel Basamakları [90].


```

Yab.Tip.    1 ATGTCCCATCACTGGGGGTACGGCAAACAACGGACCTGAGCACTGGCAT AAGGACTTC 60
  |||
Asn67Ileu 884 ATGTCCCATCACTGGGGGTACGGCAAACAACGGACCTGAGCACTGGCAT AAGGACTTC 825

Yab.Tip    61 CCCATTGCCAAGGGAGAGCGCCAGTCCTGTTGACATCGACACTCATA CAGCCAAGTAT 120
  |||
Asn67Ileu.824 CCCATTGCCAAGGGAGAGCGCCAGTCCTGTTGACATCGACACTCATA CAGCCAAGTAT 765

Yab.Tip.   121 GACCCTTCCCTGAAGCCCCGTCTGTTCCTATGATCAAGCAACTTCCCTGAGGATCCTC 180
  |||
Asn67Ileu.764 GACCCTTCCCTGAAGCCCCGTCTGTTCCTATGATCAAGCAACTTCCCTGAGGATCCTC 705

Yab.Tip.   181 AACAAATGGTCATGCTTTCAACGTGGAGTTTGA TGACTCTCAGGACAAAGCAGTGCTCAAG 240
  |||
Asn67Ileu704 AACAAATGGTCATGCTTTCAATCGTGGAGTTTGA TGACTCTCAGGACAAAGCAGTGCTCAAG 645

Yab.Tip.   241 GGAGGACCCCTGGATGGCACTTACAGATTGATTCAGTTTCACTTTCACTGGGGTTCACTT 300
  |||
Asn67Ileu644 GGAGGACCCCTGGATGGCACTTACAGATTGATTCAGTTTCACTTTCACTGGGGTTCACTT 585

Yab.Tip.   301 GATGGACAAGGTTCAAGAGCATACTGTGGATAAAAAAGAAATATGCTGCAGAAC TTCACTTG 360
  |||
Asn67Ileu584 GATGGACAAGGTTCAAGAGCATACTGTGGATAAAAAAGAAATATGCTGCAGAAC TTCACTTG 525

Yab.Tip.   361 GTTCACTGGAACACCAAATA TGGGGATTTTGGGAAAGCTGTGCAGCAACCTGATGGACTG 420
  |||
Asn67Ileu524 GTTCACTGGAACACCAAATA TGGGGATTTTGGGAAAGCTGTGCAGCAACCTGATGGACTG 465

Yab.Tip.   421 GCCGTCTAGGTATTTTTTTGAAGGTTGGCAGCGCTAAACCGGCCTTCAGAAAGTTGTT 480
  |||
Asn67Ileu464 GCCGTCTAGGTATTTTTTTGAAGGTTGGCAGCGCTAAACCGGCCTTCAGAAAGTTGTT 405

Yab.Tip.   481 GATGTGCTGGATTCAT TAAAACAAAGGGCAAGAGTGCTGACTTCACTAACTTCGATCCT 540
  |||
Asn67Ileu404 GATGTGCTGGATTCAT TAAAACAAAGGGCAAGAGTGCTGACTTCACTAACTTCGATCCT 345

Yab.Tip.   541 CGTGGCCTCCTTCTGAATCCCTGGATTACTGGACCTACCCAGGCTCACTGACCACCCCT 600
  |||
Asn67Ileu344 CGTGGCCTCCTTCTGAATCCCTGGATTACTGGACCTACCCAGGCTCACTGACCACCCCT 285

Yab.Tip.   601 CCTCTTCTGGAA TGTGTGACCTGGATTGTGCTCAAGGAACCCATCAGCGTCAGCAGCGAG 660
  |||
Asn67Ileu284 CCTCTTCTGGAA TGTGTGACCTGGATTGTGCTCAAGGAACCCATCAGCGTCAGCAGCGAG 225

Yab.Tip.   661 CAGGTGTTGAAATTC CGTAAACTTAACTTCAA TGGGGAGGGTGAA CCCGAAGAACTGATG 720
  |||
Asn67Ileu224 CAGGTGTTGAAATTC CGTAAACTTAACTTCAA TGGGGAGGGTGAA CCCGAAGAACTGATG 165

Yab.Tip.   721 GTGGACAACTGGCGCCAGC TCAGCCTGAAGAACAGGCAAATCAAAGCTTCTTCAAAA 780
  |||
Asn67Ileu164 GTGGACAACTGGCGCCAGC TCAGCCTGAAGAACAGGCAAATCAAAGCTTCTTCAAAA 105

Yab.Tip.   781 TAA 783
  |||
Asn67Ileu104 TAA 102

```

Şekil 3.3 Yabani tip HCAII (Yab.Tip.) X Asparajin67İzolösin Mutant HCAII (Asn67Ileu) Nukleotit Karşılaştırılması

3.4. HCAII'nin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

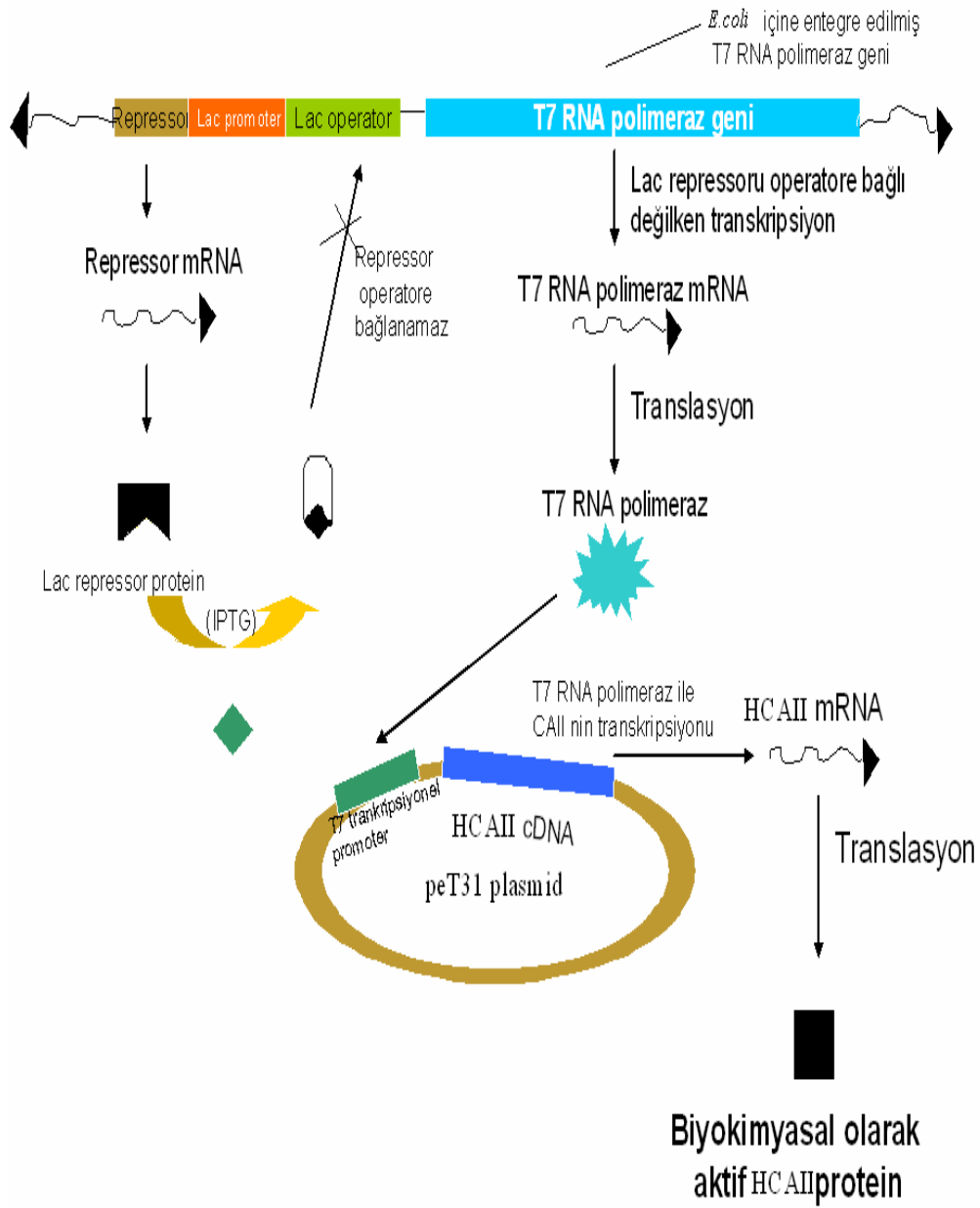
3.4.1. Yabani ve mutant HCAII genlerinin ekspresyon stratejisi

Yabani tip HCAII enzimini ve mutant enzimleri ekspre etmek amacıyla plasmidler BL-21(DE3) codon plus *E.coli* soyuna transforme edilmiştir. Kullanılan pET31 plasmidinde istenilen genin ekspre olabilmesi için *E.coli* soyunun seçimi çok önemlidir. İstenilen genin IPTG uygulaması ile ekspresyonu amacıyla BL-21(DE3) codon plus kullanılmıştır. Bu soy genomunda T7 RNA polimeraz geni taşımaktadır [50, 93].

Şekil 3.35'de IPTG uygulaması ile istenilen genin ekspresyonu gösterilmektedir. IPTG Lac represör proteinine bağlanarak, onun Lac operatör bölgesine bağlanmasını engeller. Böylece T7 RNA polimeraz geni serbest kalmakta ve T7 polimeraz enzimi sentezlenir. T7 RNA polimeraz enzimi pET plasmitteki T7 transkripsiyonel promotera bağlanır ve istenilen proteinin sentezini sağlar [93].

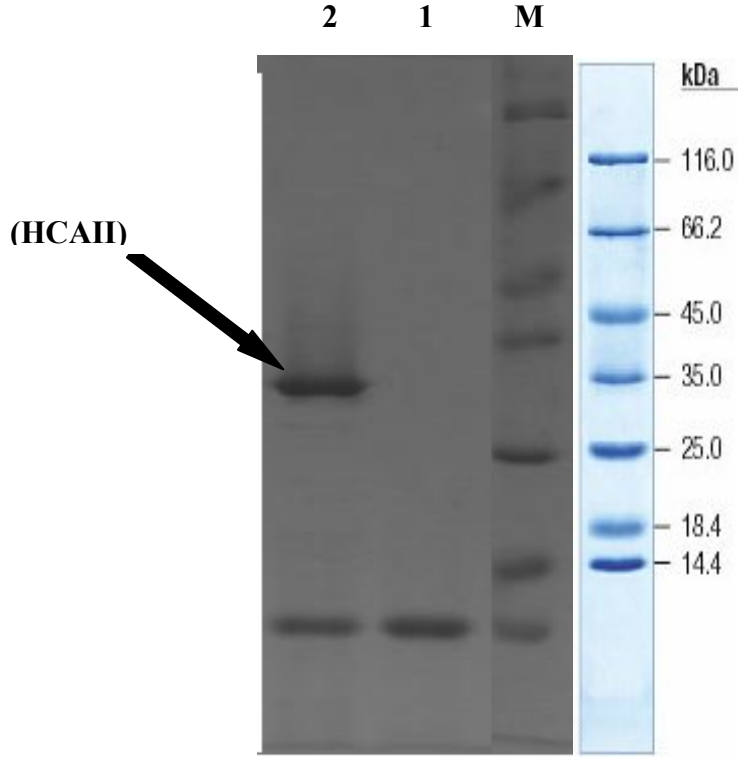
IPTG uygulaması ile ekspresyonun varlığının tespiti için kontrol olarak plasmid içermeyen BL-21(DE3) codon plus *E.coli* soyu LB Agar üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C' de 300 rpm de 3-4 saat inkübasyona bırakıldı. OD₅₅₀ =0,6-0,8'e ulaştığında 250µL 5mM ZnCl₂ ve 400µL 0,1M IPTG bakteri kültürüne eklendi. Kültür 30°C' de 300 rpm'de büyümeye bırakıldı.

Yabani tip HCAII genini taşıyan plasmid içeren BL-21(DE3) codon plus *E.coli* soyu LB-Agar + Ampisilin üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C' de 300 rpm de 3-4 saat inkübasyona bırakıldı. OD₅₅₀ =0,6-0,8'e ulaştığında 250µL 5mM ZnCl₂ ve 400µL 0,1M IPTG bakteri kültürüne eklendi. Kültür 30°C' de 300 rpm'de büyümeye bırakıldı [93].



Şekil 3.5 IPTG uygulaması ile rekombinant proteinlerin ekspresyonu [93].

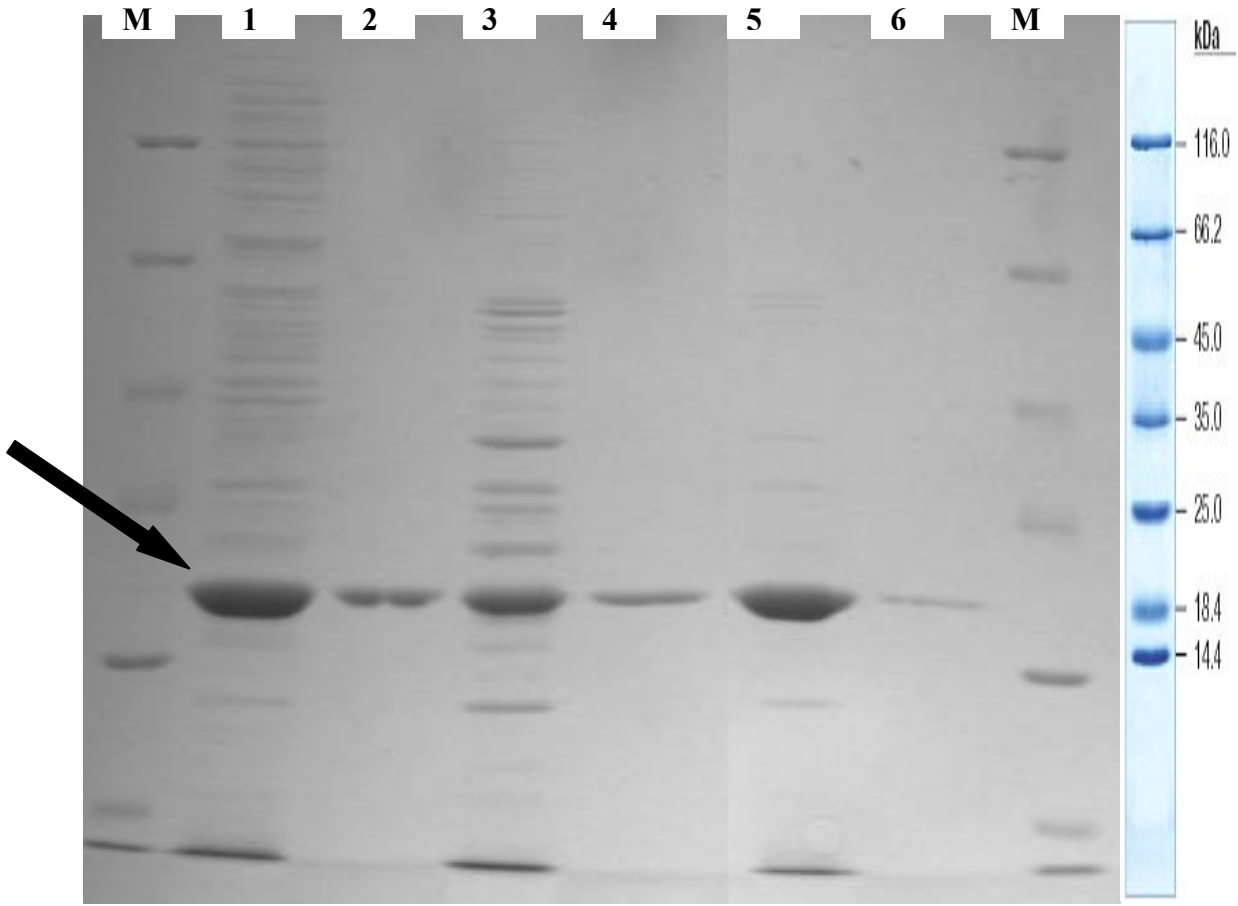
Bakteri kültürleri bölüm 2.2.3.5.2 ve 2.2.3.5.3' de anlatıldığı gibi yıkandı ve lizis yapıldı. Lizise uğratılan ham ekstraktların protein içeriği SDS PAGE ile tespit edildi.



Şekil 3.6 Ham ekstraktların SDS PAGE Sonucu (M:Protein Marker, 1: plasmid içermeyen *E.coli*'ye ait ham ekstrakt, 2: Yabani tip HCAII ham ekstrakt)

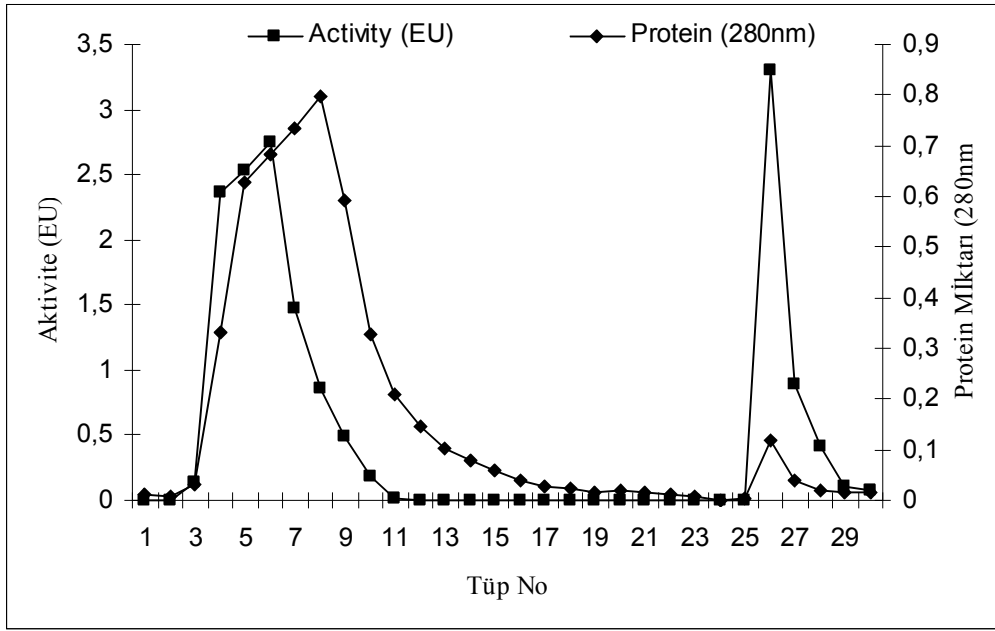
3.4.2. Yabani ve mutant HCAII'nin saflaştırılması

IPTG uygulaması ile teşviğin kontrolünden sonra yabani tip ve mutant enzimler BL-21(DE3) codon plus *E.coli* soyunda ekspre edildi. Bakteri kültürlerinin yıkama ve lizis işlemlerinden sonra, diyaliz uygulaması yapılarak ham ekstraktlar sepharose 4-B-L-Tirozin-sülfanomid afinite kolonu kullanılarak saflaştırıldı. Yabani tip ve mutant proteinlerin saflıkları SDS PAGE ile kontrol edildi. Ham ekstraktlar 12,5µg, saflaştırılan enzimler ise 1,25µg SDS Page elektroforezine yüklendi.



Şekil 3.7. Protein Miktarlarına Göre Afiniteye yüklenen ham ekstraktların ve saf enzimlerin SDS Page sonucu (M: Protein Marker, 1:Yabani tip HCAII ham ekstrakt, 2: Saflaştırılmış Yabani tip HCAII, 3: Asn67İzolösün Mutant HCAII ham ekstrakt, 4: Saflaştırılmış Asn67İzolösün Mutant HCAII, 5: Lösün204Serin Mutant HCAII ham ekstrakt, 6: Saflaştırılmış Lösün204Serin Mutant HCAII)

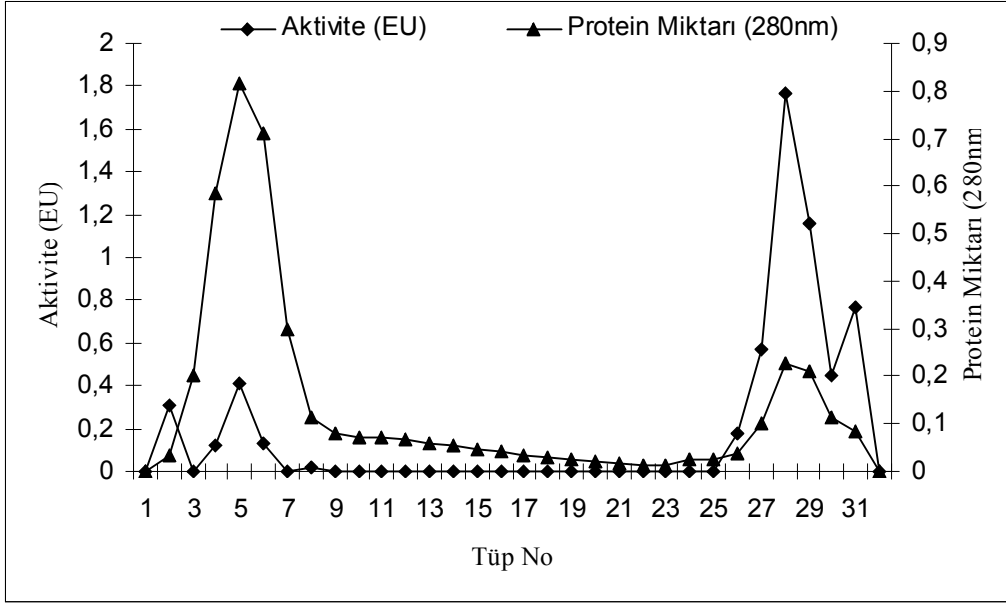
Afinite kromatografisi ile proteinler saflaştırıldı. Kolona örneğin tatbikinden sonra kolonun yıkanması süresince örnekler tüplere toplandı. Yıkama işlemi boyunca 280 nm’de her tüpün absorbansı alındı. Protein gelmeyinceye kadar yıkama işlemine devam edildi ve 280 nm’deki absorbansın düşüşü izlendi. Daha sonra kolonda tutunan örneğin elüsyonu yapıldı. Kolonun yıkanması ve elüsyon işlemleri süresince tüplere toplanan örneklerin 280 nm’deki protein miktarları ve hidrataz aktiviteleri ölçüldü. Bu ölçümlere bağlı olarak oluşturulan saflaştırma grafikleri ve saflaştırma tabloları aşağıda görülmektedir (Şekil 3.8, Çizelge 3.2, Şekil 3.9, Çizelge 3.3, Şekil 3.10, Çizelge 3.4).



Şekil 3.8 Yabani Tip HCA II saflaştırma grafiği

Çizelge 3.2 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan yabani tip HCAII'nin saflaştırma tablosu

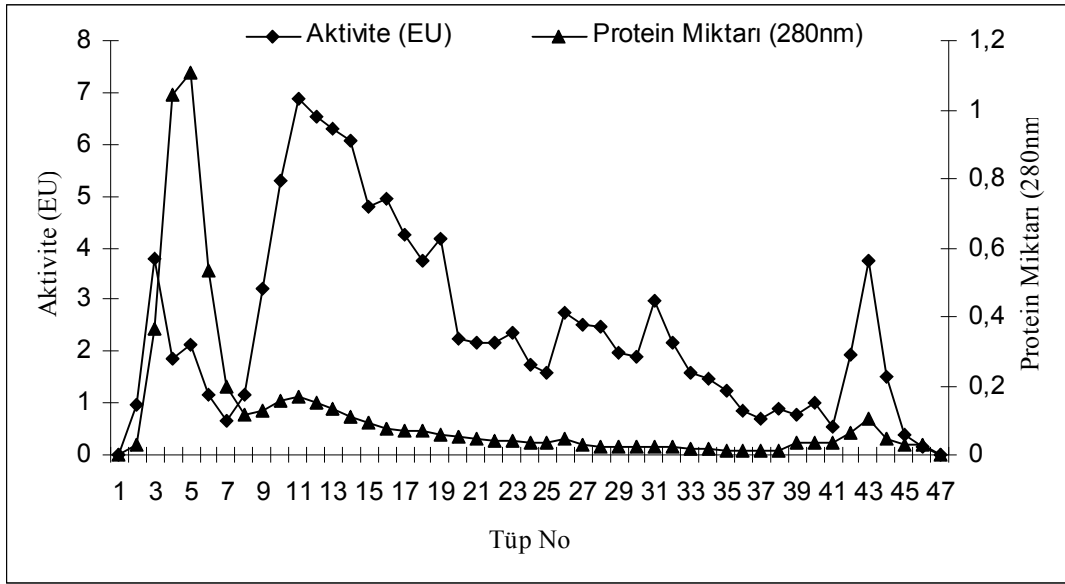
Basamak	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Total Aktivite(U)	Protein (mg/mL)	Total Protein	Spesifik Aktivite (U/mg)	%Verim	Saflaştırma Derecesi
Yab.Tip. HCAII Ham Ekstrakt	7	15,12	105,84	1,07	7,49	14,13	100	-
Saf HCAII	2	9,835	19,67	0,0722	0,144	136,59	18,59	9,66



Şekil 3.9 Asparajin67İzolösün Mutant HCAII saflaştırma grafiği

Çizelge 3.3 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan Asparajin67İzolösün Mutant HCAII'nin saflaştırma tablosu

Basamak	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Total Aktivite (U)	Protein (mg/mL)	Total Protein	Spesifik Aktivite	%Verim	Saflaştırma Derecesi
Asn67Ileu Mutant HCAII Ham Ekstrakt	8	9,20	73,6	0,465	3,72	19,78	100	-
Saf HCAII	3	1,765	5,295	0,0378	0,113	46,85	7,19	2,36



Şekil 3.10 Lösin204Serin Mutant HCAII saflaştırma grafiği

Çizelge 3.4 Afinitite kromatografisi ile saflaştırılan Lösin204Serin Mutant HCAII' saflaştırma tablosu

Basamak	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Total Aktivite(U)	Protein	Total Protein	Spesifik Aktivite	%Verim	Saflaştırma Derecesi
Lösin204Serin204 Mutant HCAII Ham Ekstrakt	5 mL	29,46	147,3	1,226	6,13	24,02	100	-
Saf HCAII	4	3,73	14,92	0,0103	0,0412	362,13	10,12	15,07

3.5. İnhibisyon Sonuçları

Çalışmamızda HCAII enzimin spesifik inhibitörleri olan sülfanomid ve acetazolamid inhibitörleri kullanılmıştır. Kullanılan inhibitörlerin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi amacıyla, sabit substrat konsantrasyonunda her bir inhibitör için en az beş farklı konsantrasyonda elde edilen %Aktivite-[I] grafikleri çizilip, %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonları belirlenmiştir. IC₅₀ değerlerinin elde edilmesi için Çizelge 3.5’de belirtilen inhibitör stok çözeltileri kullanılmıştır. Stok çözeltilerden 10-100 kat seyreltme yapılarak uygulanmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 3.7’de verilmiştir. Bu değerlerin hesaplanabilmesi için her bir grafikte gösterilen eğri denklemlerinden yararlanılmıştır. Her bir enzime ait inihibisyon grafikleri ve IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında yabancı tip ve mutant enzimlerin kullanılan inhibitörlere karşı olan ilgilerinin farklı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.5 Kullanılan İnhibitörlerin Stok Çözelti Konsantrasyonları

İnhibitör	Stok Çözelti Derişimi (M)
Sülfonamid	$1 \times 10^{-2} \text{M}$
Asetazolamid	$1 \times 10^{-3} \text{M}$

Çizelge 3.6 Yabani Tip üzerinde çalışılan inhibitörlerin IC₅₀ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları, bu değerlere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları ve hidrataz aktivitesi verileri

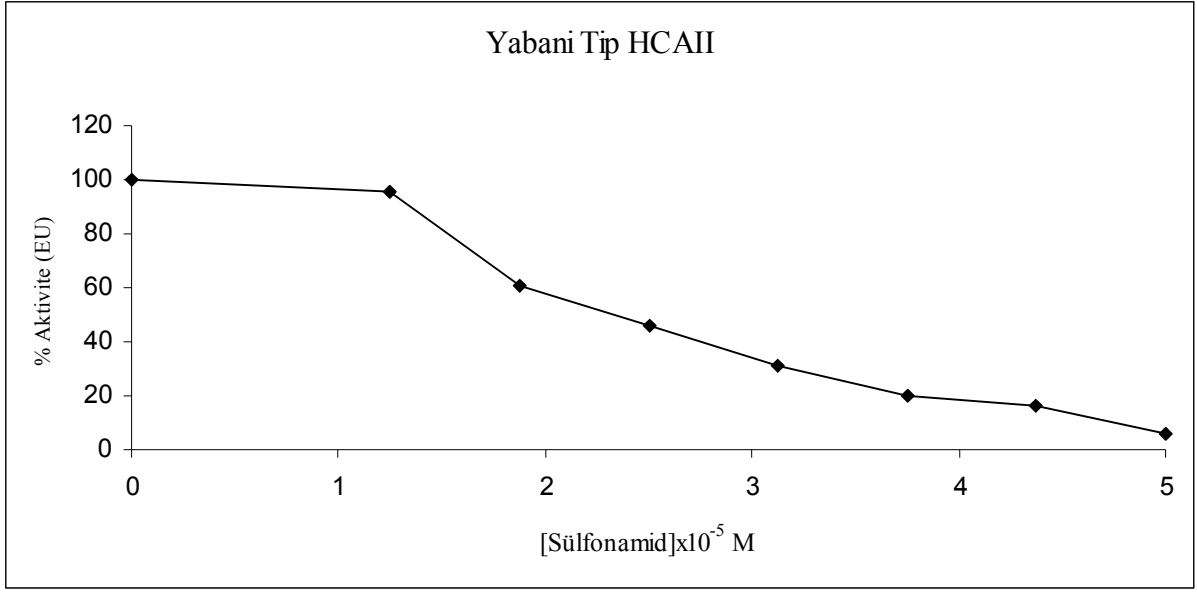
0,15 M Na ₂ CO ₃ /0,1M NaHCO ₃ (pH=10) Tamponu (µL)	Inhibitör Adı	Inhibitör Çözeltisinin in Hacmi (µL)	Inhibitör Çözeltisinin Konsantrasyonu	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Fenol-Red İndikatör Çözeltisinin Hacmi (mL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	dH ₂ O (µL)	% Aktivite					
400	Sülfonamid	0	0	100	2	1300	300	100					
		50	1,25 x 10 ⁻⁵ M				250	95,42					
		75	1,875 x 10 ⁻⁵ M				225	60,79					
		100	2,5 x 10 ⁻⁵ M				200	45,83					
		125	3,12 x 10 ⁻⁵ M				175	31,4					
		150	3,75 x 10 ⁻⁵ M				150	20					
		175	4,37 x 10 ⁻⁵ M				125	16,59					
		200	5 x 10 ⁻⁵ M				100	6					
		400	Asetazolamid				0	0	100	2	1300	300	100
							10	0,025 x 10 ⁻³ mM				290	78,5
25	0,0625 x 10 ⁻³ mM			275	77,69								
50	0,125 x 10 ⁻³ mM			250	56,77								
75	0,187 x 10 ⁻³ mM			225	53,32								
100	0,25 x 10 ⁻³ mM			200	31,59								
150	0,375 x 10 ⁻³ mM			150	19,027								
50	1,25 x 10 ⁻³ mM			250	17,1								
100	2,5 x 10 ⁻³ mM			200	5,126								

Çizelge 3.7 Asparajin67İzolösün 67 Mutant HCAII üzerinde çalışılan inhibitörlerin IC₅₀ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları, bu değerlere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları ve hidrataz aktivitesi verileri

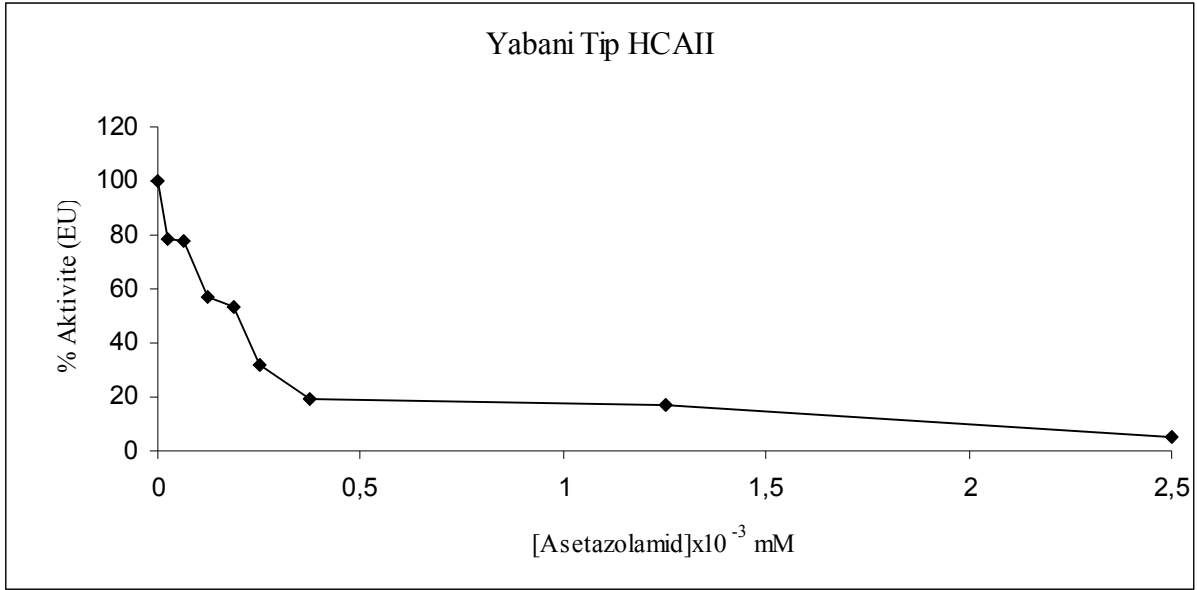
0,15 M Na ₂ CO ₃ /0,1M NaHCO ₃ (pH=10) Tamponu (µL)	Inhibitör Adı	Inhibitör Çözeltisinin in Hacmi (µL)	Inhibitör Çözeltisinin Konsantrasyonu	Enzim Çözeltisinin in Hacmi (µL)	Fenol-Red İndikatör Çözeltisinin Hacmi (mL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	dH ₂ O (µL)	% Aktivite
400	Sülfonamid	0	0	100	2	1300	300	100
		50	$1,25 \times 10^{-5}$ M				250	49,65
		100	$2,5 \times 10^{-5}$ M				200	32,63
		150	$3,75 \times 10^{-5}$ M				150	21,66
		200	5×10^{-5} M				100	14,7
400	Asetazolamid	0	0	100	2	1300	300	100
		10	$0,0125 \times 10^{-3}$ mM				290	44,48
		25	$0,025 \times 10^{-3}$ mM				275	35,71
		50	$0,0375 \times 10^{-3}$ mM				250	33,33
		75	$0,187 \times 10^{-3}$ mM				225	8,6
		100	$0,25 \times 10^{-3}$ mM			200	7,47	

Çizelge 3.8 Lösin204Serin Mutant HCAII üzerinde çalışılan inhibitörlerin IC₅₀ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları, bu değerlere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları ve hidrataz aktivitesi verileri

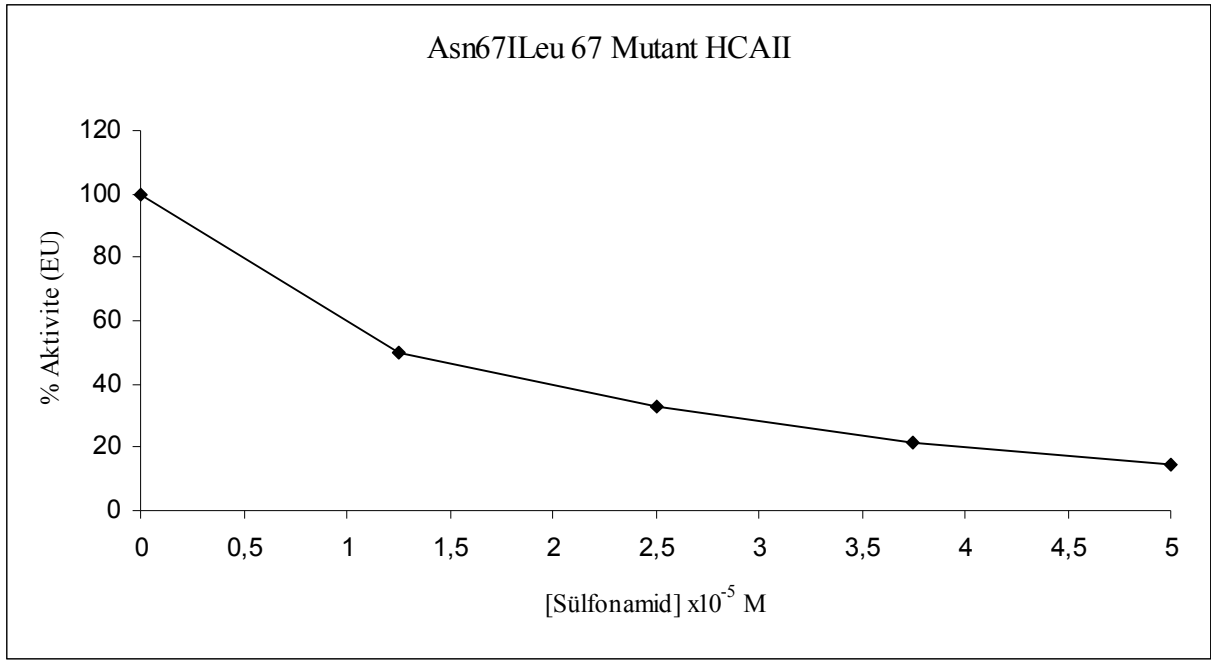
0,15 M Na ₂ CO ₃ /0,1M NaHCO ₃ (pH= 10) Tamp onu (μ L)	Inhibitör Adı	Inhibitör Çözeltisinin in Hacmi (μ L)	Inhibitör Çözeltisinin Konsantrasyonu	Enzim Çözeltisinin in Hacmi (μ L)	Fenol-Red İndikatör Çözeltisinin Hacmi (mL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ L)	dH ₂ O (μ L)	% Aktivite
400	Sülfonamid	0	0	100	2	1300	300	100
		50	$1,25 \times 10^{-3}$ M				250	90,86
		75	$1,875 \times 10^{-3}$ M				225	72,17
		100	$2,5 \times 10^{-3}$ M				200	45,74
		125	$3,12 \times 10^{-3}$ M				175	29,93
		150	$3,75 \times 10^{-3}$ M				150	17,43
		200	5×10^{-3} M				100	4,03
400	Asetazolamid	0	0	100	2	1300	300	100
		75	$0,187 \times 10^{-3}$ mM				225	90,77
		100	$0,25 \times 10^{-3}$ mM				200	83,03
		125	$0,312 \times 10^{-3}$ mM				175	74,28
		150	$0,375 \times 10^{-3}$ mM				150	63,60
		200	$0,5 \times 10^{-3}$ mM				200	27,15



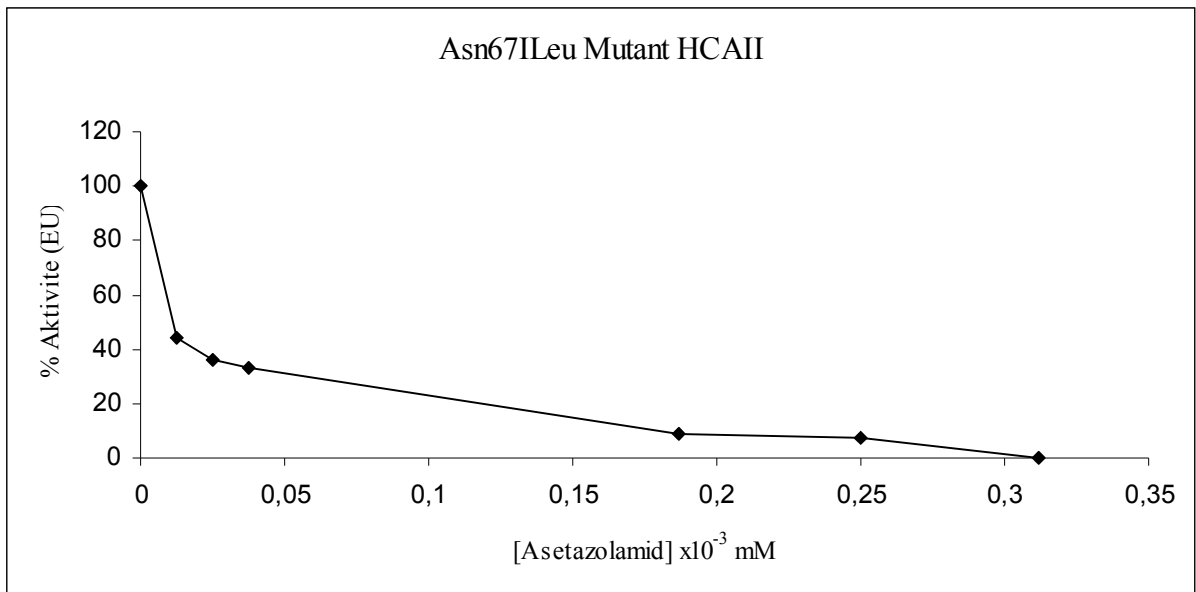
Şekil 3.11 Sülfonamitin saflaştırılmış yabani tip HCAII enzimi üzerine inhibisyon grafiği



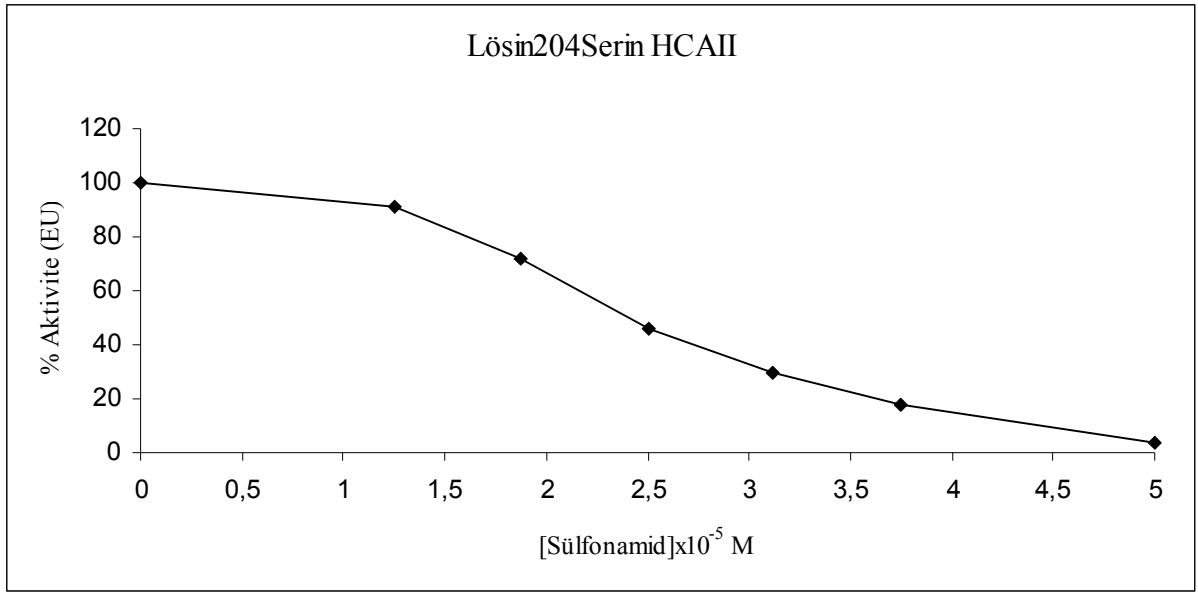
Şekil 3.12 Asetazolamidin saflaştırılmış yabani tip HCAII enzimi üzerine inhibisyon grafiği



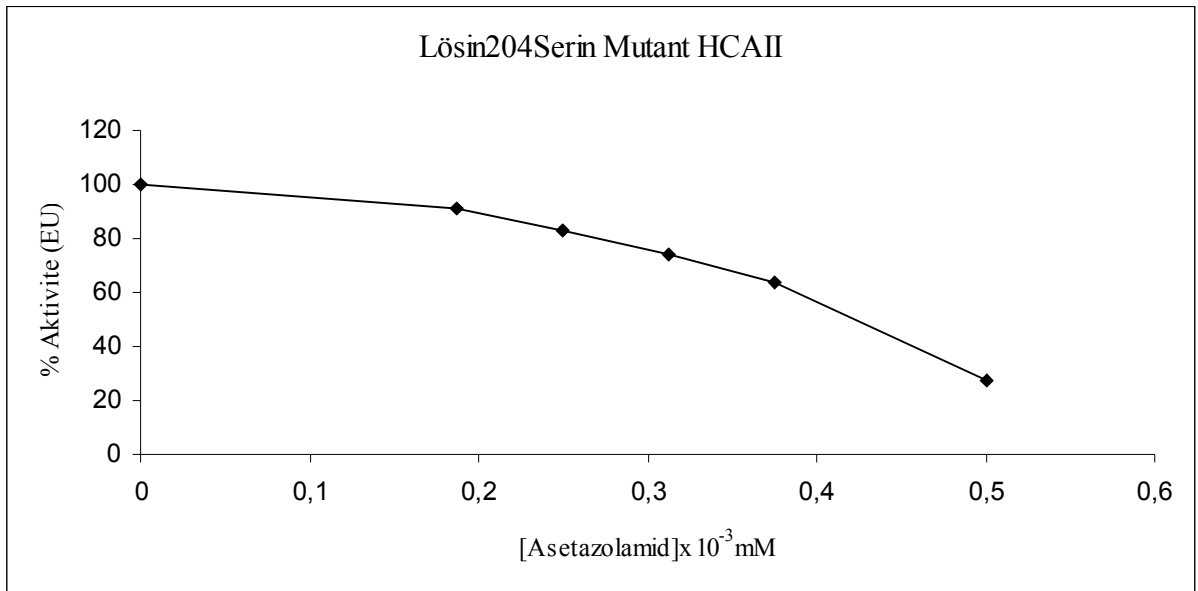
Şekil 3.13 Sülfonamidin saflaştırılmış Asparajin67İzolösün Mutant HCAII enzimi üzerine inhibisyon grafiği



Şekil 3.14 Asetazolamidin saflaştırılmış Asparajin67İzolösün Mutant HCAII enzimi üzerine inhibisyon grafiği



Şekil 3.15 Sülfonamidin saflaştırılmış Lösin204Serin Mutant HCAII enzimi üzerine inhibisyon grafiği



Şekil 3.16 Asetazolamidin saflaştırılmış Lösin204Serin Mutant HCAII enzimi üzerine inhibisyon grafiği

Çizelge 3.9 Yabani tip HCAII, Asparajin67İzolösün Mutant HCAII, Lösin204/Serin204 Mutant HCAII enzimlerinin IC₅₀ değerleri

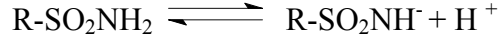
Enzim	Sülfonamid	Asetazolamid
Yabani Tip HCAII	IC ₅₀ = 2,48x10 ⁻⁵ M	IC ₅₀ = 0,2768x10 ⁻³ mM
Asparajin67İzolösün Mutant HCAII	IC ₅₀ = 2,1x10 ⁻⁵ M	IC ₅₀ = 0,0285 x10 ⁻³ mM
Lösin204Serin Mutant HCAII	IC ₅₀ = 2,52 x10 ⁻⁵ M	IC ₅₀ = 0,422 x10 ⁻³ mM

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

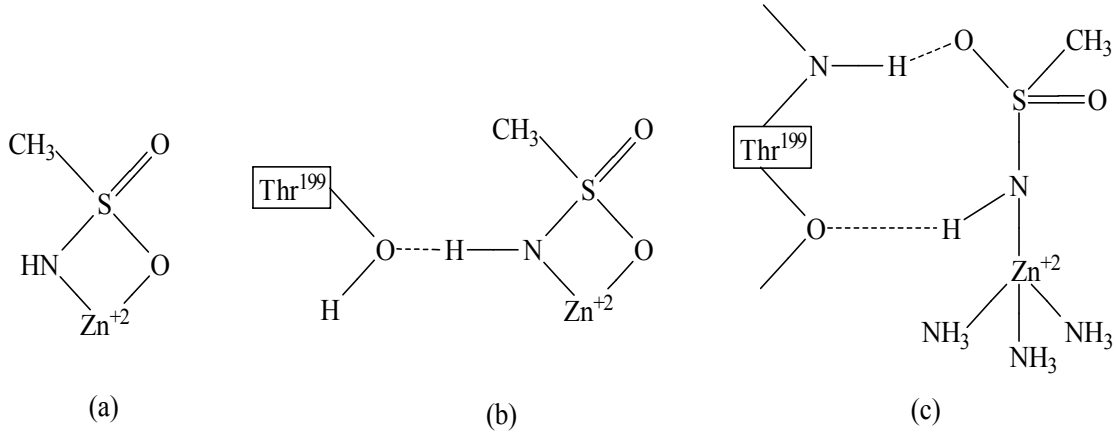
Karbonik anhidraz enzimleri canlılarda CO₂ molekülünün hidratasyonunu ve HCO₃⁻ iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen Zn⁺² iyonu içeren bir metaloenzimdir. Son 20 yıldır CA enzimini katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarla elde edilen sonuçlara göre, CA enziminin metabolizmada son derece önemli görevleri olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu Karbonik Anhidraz enziminin, genel olarak metabolik CO₂ transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokuda H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarının birikimini sağlayarak, vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında rolü olduğu ortaya çıkartılmıştır [1-16].

CA'lar, α -, β -, γ -, δ - ve ϵ -CA olmak üzere beş CA gen ailesi olarak sınıflandırılmıştır. Şimdiye kadar insanları da kapsayan yüksek omurgalılarda, çok farklı hücresel yerleşimler ve doku dağılımları ile, 14 farklı α -CA izoenzimi tanımlanmıştır. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin hücresel dağılımları, kinetik özellikleri ve inhibisyon profilleri açısından farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Sitoplazmada bulunan CA II izoenzimi, izoenzimler arasında turnover sayısı 600.000 s⁻¹ ile en hızlı olanıdır. CAII izoenzimine insan doku ve organlarında yaygın olarak rastlanmaktadır [3-7]. Sindirim sistemi dış salgı bezlerinde, mide de onikiparmak bağırsağı, ince bağırsağın üst ve alt yarısı, kör bağırsak, rectum da ve Brunner bezlerinde ekspre olmaktadır. CA II karaciğer hepatositlerinde ve safra kanalı epitel hücrelerinde varlığı gösterilmiştir. Pankreasta, kanal epitelyal hücrelerinde immünohistokimyasal olarak gözlenen CA II pozitif sinyallerine rastlanmıştır. Böbrek tübuler hücrelerinde ve üriner asidifikasyona dağıldığı, böbrek toplama kanallarında ekspre olur. Ayrıca CA II merkezi sinir sistemi, insan adrenal ve pitüitrin bezleri, akciğer alveollerini astarlayan epitel hücreleri, insan plasenta, cenin membranları, üreme sisteminin birçok dokusu ve osteoklast gibi birçok farklı doku ve organda ekspre olur. CA II, choroid plexus (gözün damar tabakasının arka parçasındaki sinir ağı)'da üretilen sıvının pH'ını düzenler ve gözdeki humor aközün oluşumuna katılır [17, 18].

Karbonik anhidraz enzimleri R-SO₂NH₂ kimyasal yapısına sahip sülfonamidlerle inhibe edilirler. Sülfonamidlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi:



denkleme göre kolaylıkla iyonik yapı kazanmaktadırlar. Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidlerin bu hidrofilik bölgesine ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere sahiptir. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle $\text{R-SO}_2\text{NH}^-$ bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} ile iyonik bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması bu iki etkinin toplamının bir sonucudur. Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması bu iki etkinin toplamının bir sonucudur. Ancak bu sonucun yanında, substitüe ya da alkil sülfonamidlerin enzime bağlanmasında sadece hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heterosiklik yan grup taşıyan sülfonamidlere göre daha zayıf inhibitör olma özelliği gösterirler. İnorganik anyonlarda yalnızca hidrofilik bağlanma mevcuttur. Bu nedenle CA enzimi üzerinde, sülfonamidler kadar güçlü bir inhibisyon kuramazlar [19, 20].



Şekil 4.1 Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması [19].

Karbonik anhidraz izoenzimleri katalitik aktivitelerindeki farklılıkları gibi inhibitörlere olan ilgileride farklılık göstermektedir. Sülfonamidler başta glaucama olmak üzere kanser, bazı nörolojik hastalıklarda hastalığın önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hastalıkların tedavi ve teşhisinde, CA inhibitörlerinin önemi, Glaucoma hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarlarıyla ortaya çıkarılmıştır. Günümüzde, inhibitörler başta Glaucoma tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans (MRI)

belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların geliştirilmesinde yol gösterici olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple, CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi açısından çok büyük önem kazanmıştır. Farklı CA izoenzimlerinin aktivitelerinin temel prosesinin anlaşılması, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine fırsat vermektedir [22, 39, 40, 41].

Glaucoma, göz içi sıvı kanallarının kısmen ya da tamamen tıkanması sonucu, göz içi basıncının anormal boyutlarda yükselmesiyle oluşur. Basıncın bu derece artması retina ve optik sinirlere zarar vererek dönüşümsüz körlüğe neden olabilmektedir. Göz içi basıncının göz içi sıvısı yani humor aköz ile kontrol edilir. Humor aközün salgılanmasında CA enzimi, HCO_3^- iyonu birikimini sağladığından uyarıcı bir etki gösterir. Bu enzimin inhibisyonu sonucu göz içi sıvısının salgılanma oranı yaklaşık yarı yarıya azalmakta, göz içerisindeki osmotik basınç ve dolayısıyla göz içi basıncı kontrol altında tutulabilmektedir. Bu bilgiler ışığında karbonik anhidraz inhibitörleri 40 yılı aşkın bir süredir Glaucoma hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [19, 20]. Ancak terapatik madde olarak kullanılan inhibitörlerin oldukça büyük bir aile ile temsil edilen ve organizmada hemen hemen her dokuda bulunan özgün karbonik anhidraz izoenzimlerine karşı spesifiteleri oldukça azdır. Klinikte kullanılan sülfonamidlerin, izoenzime spesifik olmadıkları için tedavi sürecinde ve sonrasında pek çok yan etkisi ortaya çıkmaktadır [22].

Yüksek göz içi basıncı ile (IPO) ortaya çıkan glaucoma en ciddi göz hastalıklarından birisidir. Glaucoma göz hastalıkları içinde % 15-20 oranı ile körlüğe neden olan bir göz hastalığıdır. Göz retinasında bulunan HCAII göz içi basıncı oluşumunun başlıca sorumlusudur. Glaucomlu hastalarda IPO'yu düşürmenin en etkili yolu HCAII aktivitesini bloke etmektir. Bu amaçla başta asetazolamid olmak üzere heteroaromatik sülfonamidler uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Ancak oral yolla verilen söz konusu bileşiklerin HCAII yanında diğer izoenzimleride inhibe etmesi önemli yan etkiler ortaya çıkarmaktadır. Bu amaçla HCAII enzimine spesifik diğer sülfonamid türevleri sentezlenmiş ve inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Ancak yapılan çalışmalar sonucu klinikte kullanılan asetazolamid bileşiğinden yan etkileri daha az daha güçlü bir inhibitör sentezi başarılamamıştır [19, 20].

Araştırmamızda yönlendirilmiş mutagenез Asparajin 67 aminoasiti İzolösin, Lösin 204 aminoasiti Serin aminoasitine değiştirilmiştir. Enzimdeki aminoasit değişimleri yönlendirilmiş mutagenез tekniği ile yapılmıştır. Yönlendirilmiş mutagenез, protein yapı-

işlev ilişkilerinin incelenmesi ve protein mühendisliğinde kullanılan güçlü bir araçtır. Bu yöntem araştırmacılara proteinin yapısında spesifik değişimler yapabilmeyi sağlar. Günümüzde yönlendirilmiş mutagenез en iyi şekilde sentetik oligonükleotidler kullanılarak PCR tekniğı ile başarılmıştır. Oligonükleotidler ile yabancı tipteki çatıda istenilen dizi basit bir şekilde oluşturulmaktadır. Günümüzde sentetik oligonükleotidlerin sağlanması ucuz ve kolaydır. Oligonükleotid-yönlendirilmiş mutagenез reaksiyonları doğru sonuçlar vermektedir [61-67]. Çalışmamızda ilk olarak oligonükleotit yönlendirilmiş mutagenез yöntemine dayalı olarak geliştirilen Stratagene quick change site directed mutagenез kiti kullanılmıştır [88].

Bu yöntemde, bir ekspresyon vektörüne klonlanmış olan gen, direkt olarak mutagenезe tabi olmakta ek klonlama işlemine gerek duyulmamaktadır. Ayrıca çift zincirli DNA kaynağı kullanılabilir. İstenilen mutasyonu taşıyan, birbiri üzerine tam olarak çakışan sentetik primerler ve uzun DNA parçalarını (plasmid gibi) amplifike edebilen Taq polimeraz göre daha düşük mutasyon yapan pfu turbo enzimi ile mutasyon gerçekleştirilmektedir. Mutasyon taşımayan kalıp zincir daha fazla metillenmiş olduğu için, metillenmiş DNA ya spesifik olan DpnI enzimi ile kesilerek deşredilmiştir. Yeni sentezlenmiş ve çentikler içeren plasmid *E.coli* XL1-BLUE hücrelerine transforme edilir.

PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen mutant plasmidler otomatik dizi analizine gönderilmiş ve istenilen mutasyonların varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen dizi analizi sonuçları bölüm 3 Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de görülmektedir. Dizi analizi ile istenilen mutasyonların varlığı tespit edildikten sonra protein ekspresyonu basamağına geçilmiştir.

E.coli'nin BL-21 soyu rekombinant protein ekspresyonunda sahip olduğu özellikleri açısından yaygın olarak kullanılır. Bu hücreler T7 RNA polimeraz genini içerirler. Ayrıca IPTG ile teşvik edilebilirler. Sentezlenen proteinin deşredilmediği bazı proteazlar açısından eksiktir. Bu çalışmada pET ekspresyon sistemi için uygun olan bu soy tercih edilmiştir. Öncelikle plasmid DNA, BL-21(DE3) *E.coli* soyuna bölüm 2.2.3.4'de anlatılan ısı şoku uygulaması ile transforme edilmiştir. pET plasmidin ampisilin direnç geni taşıması özelliğinden yaralanılarak ampisilin ortamında plasmid taşıyan bakteriler seçilmiştir. Ekspresyonun kontrolü için plasmid içermeyen ve içeren bakteri hücrelerinde deney kurulmuştur. Kontrol grubu ve deney grubu aynı şartlarda büyütülmüştür. Kültürün büyüme eğrisi her saat 550 nm'de optik yoğunluklarının ölçülmesiyle belirlenmiş ve OD₅₅₀=0,6-0,8'e ulaştığında 250µL 5mM ZnCl₂ ve 400µL 0,1M IPTG bakteri kültürüne eklenmiştir. Kültür

30°C' de 300 rpm'de büyümeye bırakılmıştır. Böylece ekspresyon teşvik edilmiştir. Ekspresyon sonrası bakteri hücreleri liziz edilerek ham ekstraktlar SDS Page elektroforeziyle kontrol edilmiştir. Sonuçta plasmid içermeyen kontrol grubunda HCAII enzimi gözlenmemiştir. Plasmid içeren deney grubunda HCAII enziminin ekspresyonu gözlenmiştir. Sonuçlar bölüm 3 şekil 3.6'de gösterilmiştir.

Ekspresyon çalışması yabancı tip HCAII, Asn67 İzolösün Mutant HCAII ve Lösün204 Serin Mutant HCAII enzimleri için yapılmıştır. Ekspresyon IPTG ile teşvik edilmiştir. Saflaştırma işlemi için protein saflaştırma tekniklerinin etkili yöntemlerinden biri olan afinite kromatografisi kullanılmıştır. Afinite jelinin sentezlenmesi üç ayrı reaksiyonla gerçekleştirilmiştir. Jel ilk olarak CNBr ile aktifleştirilmiş, daha sonra uzantı kolu görevi gören L-Tirozin ve ligand olarak da p-nitrobenzen sülfonamid bileşiği bağlanmıştır. Sülfonamid karbonik anhidraz enziminin spesifik inhibitörü olup, söz konusu enzimleri kolonda yüksek pH'da bağlamaktadır. Saflaştırılan enzimin saflık kontrolü SDS-PAGE yöntemi ile yapılmıştır. Şekil 3.7'de saflaştırılan enzimlerin net ve tek band verdiği görülmektedir.

Çalışma boyunca kalitatif protein tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır [94]. Yöntem, proteinlerin fosforik asitli ortamda Coomassie-Brilliant Blue G-25 boyası ile kompleksleşme prensibine dayanır. Kullanılan boya negatif yüklüdür ve pozitif yüklü proteinleri bağlayarak kırmızı formdan ($A_{\max}=465$ nm), mavi forma dönüşür ($A_{\max}=595$ nm). Reaksiyon boyunca söz konusu renk yaklaşık 1 saat kararlı haldedir ve oluşan renk şiddeti pH değerine bağlıdır. Çalışmamızdaki kalitatif tayinler için bu yöntemin tercih edilme nedeni; yöntemin, kısa sürede uygulanabilir olması, protein-boya kompleksinin uzun süre stabil kalması, bozucu faktörlerin az olması ve enzim çözeltilerinin μg düzeyinde protein bulundurmasıdır.

CA enziminin aktivite ölçümü için, Maren ve arkadaşlarının modifiye ettiği CO₂-hidrataz aktivitesi adı verilen Wilbur-Andersen yöntemi kullanılmıştır. Yöntemde CO₂'in H₂O ile reaksiyona girmesi ile oluşan H₂CO₃ molekülünün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak, ortamın pH değerini değiştirdiği süre ölçülmektedir [97].

Araştırmamızda ilk olarak Asparajin 67 aminoasiti İzolösün aminoasitine değiştirilmiştir. Asn67 ile mutant HCAII afinite kromatografisi ile saflaştırılarak CA

inhibitörleri olan sülfonamid ve asetazolamid karşı ilgileri araştırılmıştır. Sülfonamid inhibitörü için yabani tip HCAII enziminin IC_{50} değeri 2.48×10^{-5} M olarak, Asn67İsolösün Mutant HCAII enziminin IC_{50} değeri $2,1 \times 10^{-5}$ M bulunmuştur. Asetazolamid inhibitörü için yabani tip HCAII enziminin IC_{50} değeri $0,2768 \times 10^{-3}$ mM, Asn67İsolösün Mutant HCAII enziminin IC_{50} değeri $0,0285 \times 10^{-3}$ mM bulunmuştur. Asn67İle mutant HCAII'nin her iki inhibitöre karşı ilgisinin arttığı gözlenmiştir. Bu durum hidrofobik etkileşmenin artması ile açıklanabilir. Özellikle daha hidrofobik yapıya sahip olan asetazolamidde bu etkinin daha fazla olması düşüncemizi daha da doğrulamaktadır.



Şekil 4.2 (a) Sülfonamid ve (b)Asetazolamid molekül formülleri

1997 yılında Hammarström ve arkadaşları HCAII enziminde 3. β zincirde yer alan Asparajin 67 aminoasitini Sistein amino asitine değiştirmişler ve 7. β zincirde yer alan Sistein206 amino asitini pürin prob için bağlanma bölgesi olarak kullanılmıştır. N67C/C206 mutant enzimi spesifik enzimatik aktivitesi yabani tip enzim ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta %88 enzimatik spesifik aktivitenin yabani tip enzim ile aynı olduğu tespit edilmiştir [54].

Araştırmamızda ikinci olarak hidrofobik etkileşmenin önemini ve inhibisyon mekanizmasını daha ayrıntılı açıklanabilmesi amacı ile hidrofobik aminoasit Lösin 204, hidrofil aminoasit Serin ile değiştirilmiştir. Sülfonamid inhibitörü için yabani tip HCAII enziminin IC_{50} değeri 2.48×10^{-5} M olarak, Lösin204Serin Mutant HCAII enziminin IC_{50} değeri $2,52 \times 10^{-5}$ M bulunmuştur. Asetazolamid inhibitörü için yabani tip HCAII enziminin IC_{50} değeri $0,2768 \times 10^{-3}$ mM, Lösin204Serin Mutant HCAII enziminin IC_{50} değeri $0,422 \times 10^{-3}$ mM bulunmuştur. Elde edilen proteinin inhibitörlere karşı ilgisinin azaldığı tespit edilmiştir.

1992 yılında Taoka ve arkadaşları HCAII enziminde Lösin204 aminoasitini yönlendirilmiş mutageniz ile Glutamik asit 204 aminoasitine değiştirilmişlerdir.. Mutant

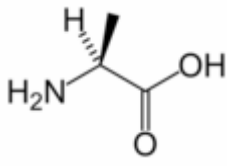
enzimin CO₂ hidratasyon ve 4-nitrofenil asetat hidroliz aktiviteleri yabani tip enzim ile karşılaştırıldığında düşük sonuçlar elde etmişlerdir.[50].

Sonuç olarak araştırmamızda elde edilen bulguların inhibisyon mekanizmasının daha ayrıntılı aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz. Böylece HCAII'ye karşı daha güçlü ve etkili inhibitörlerin gelişimine katkı sağlanacaktır.

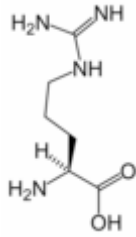
EK ŞEKİLLER

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

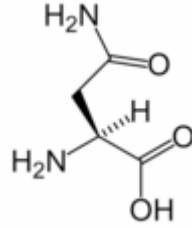
Şekil A.1 Aminoasit kodon şifreleri ve kısaltmaları [100].



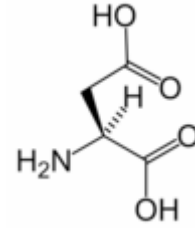
[L-Alanine](#) (Ala / A)



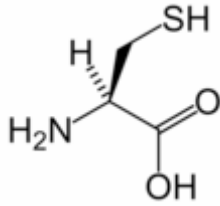
[L-Arginine](#) (Arg / R)



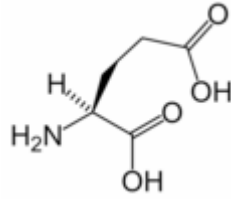
[L-Asparagine](#) (Asn / N)



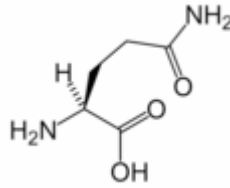
[L-Aspartic acid](#) (Asp / D)



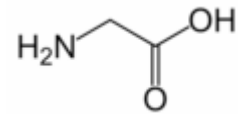
[L-Cysteine](#) (Cys / C)



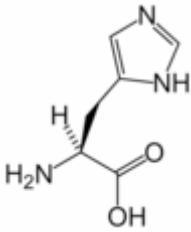
[L-Glutamic acid](#) (Glu / E)



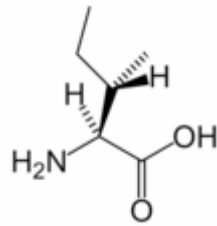
[L-Glutamine](#) (Gln / Q)



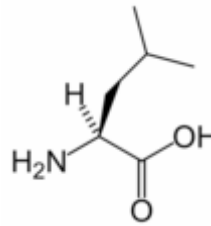
[L-Glycine](#) (Gly / G)



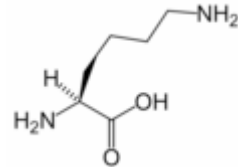
[L-Histidine](#) (His / H)



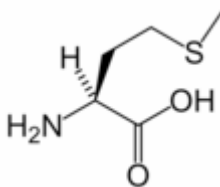
[L-Isoleucine](#) (Ile / I)



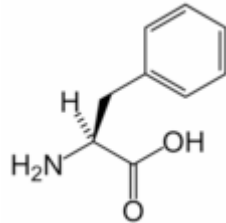
[L-Leucine](#) (Leu / L)



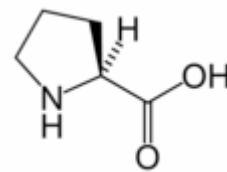
[L-Lysine](#) (Lys / K)



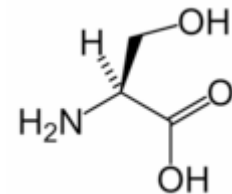
[L-Methionine](#) (Met / M)



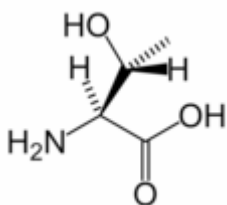
[L-Phenylalanine](#) (Phe / F)



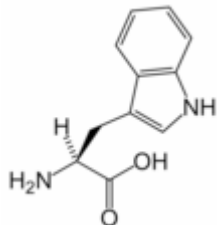
[L-Proline](#) (Pro / P)



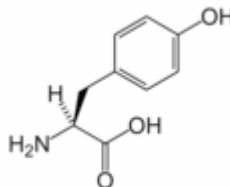
[L-Serine](#) (Ser / S)



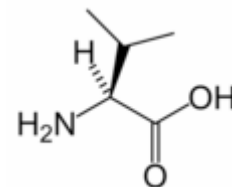
[L-Threonine](#) (Thr / T)



[L-Tryptophan](#) (Trp / W)

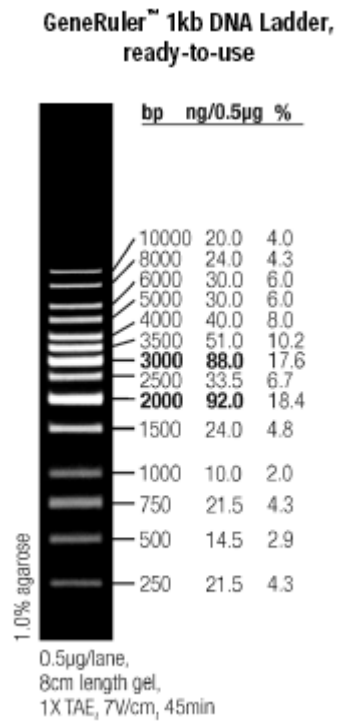


[L-Tyrosine](#) (Tyr / Y)

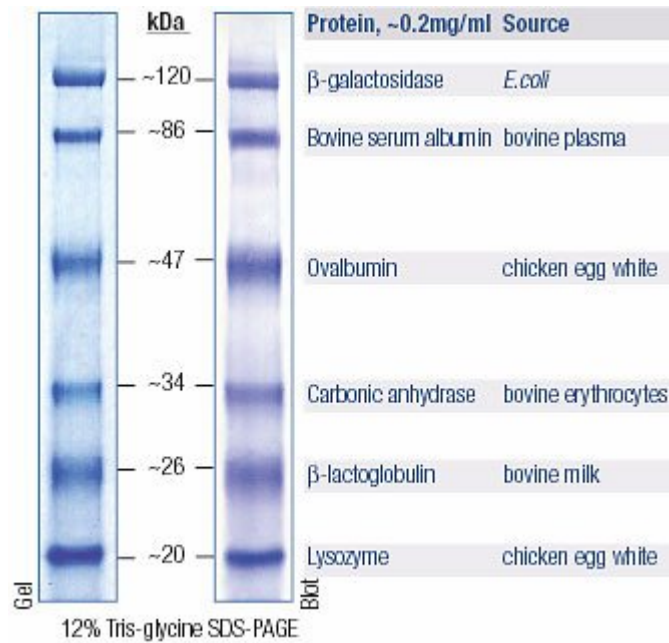


[L-Valine](#) (Val / V)

Şekil A.2 20 aminoasidin sembol ve açık yapıları [101].



Şekil A.3 DNA Marker [102].



Şekil A.4 Protein Marker [103].

KAYNAKLAR

- [1] Supuran, C.T., and Scozzafava, A., “Carbonic Anhydrase Inhibitors”, *Curr.Med.Chem.*, **1**, (2001) 61.
- [2] Maren , T.H., “Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition”, *Physiol.Rev.*, **47**, (1967) 595
- [3] Hewett-Emmett, D., Tashian, R.E., “Functional diversity, conversation, and convergence in the evolution of the α -, β -,and γ -carbonic anhydrase gene familie”. *Mol Phylogenet Evol*, **5**, (1996) 50-77.
- [4] Lindskog, S., “Structure and mechanism of Carbonic anhydrase”, *Pharmacol. Ther.*, **74**, (1997) 1-20.
- [5] Smith, K.S., Ferry, J.G., “Prokaryotic carbonic anhydrases” *FEMS Microbiological Reviews* **24**, (2000) 335-366.
- [6] Tripp, B.C., Smith, K., Ferry J.G., “Carbonic Anhydrase:New Insights for an Ancient Enzyme”, *The Journal of Biological Chemistry* 276, (2001) **52** 48615–48618.
- [7] So, A.K.C., Espie, G.S., Williams, E.B., Shively, J.M., Heinhorst, S., Cannon, G.C., “A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (e Class) is a component of the carboxysome shell”, *J Bacteriol*, **186**, (2004) 623–630.
- [8] Sly, W.S., Hu, P.Y., “Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies” *Annu Rev Biochem*, **64**, (1995) 375-401.
- [9] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Juvonen, T., Waheed, A., Sly, W.S., Saarnio, J., Kaunisto, K., Kellokumpu, S., Rajaniemi, H., “Membrane-bound carbonic anhydrase IV is expressed in the luminal plasma membrane of the human gallbladder epithelium” *Hepatology*, **24**, (1996): 1104-1108.

- [10] Hewett-Emmett, D., Chegwidden, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H., “Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. In: *The Carbonic Anhydrases*” New Horizons, *Birkhäuser Verlag, Basel*, (2000) 29-76
- [11] Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casin,i 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” *J. Biol. Chem.*, **279** (2004) 2719-2727.
- [12] Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G.N., Waheed, A., Hamli, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., “Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase”, *Biochem J.*, **392**, (2005) 83-92.
- [13] Karhumaa, P., Parkkila, S., Waheed, A., Parkkila, A.K., Kaunisto, K., Tucker, P.W., Huang, C.J., Sly, W.S., Rajaniemi, H., “(Nuclear NonO/p54(nrb) protein is a nonclassical carbonic anhydrase”, *J Biol Chem*, **275**, (2000) 16044-16049.
- [14] Chegwidden, W.R., Dodgson, S.J., Spencer, I.M., “In the carbonic Anhydrase New Horizons”, *Birkhauser Verlag, Basel*, (2000), 343-363.
- [15] Keha, E.E., “Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu”, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum, (1981)
- [16] Wistrand, P.J., “The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte”, *Acta Phisiol. Scand.*, (1981), 343.
- [17] Hilvo, M., “Expression studies on carbonic anhydrase IX”, Master’s thesis, Institute of Medical Technology, University of Tampere, April 2005.
- [18] Leppilampi, M., “Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX”, Master’s thesis, Faculty of Medicine, University of Oulu, February 2006.

- [19] Arslan, O., ‘Glaucoma Tedavisinde Kullanmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması’, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- [20] 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).
- [21] Franchi, M., Vullo, D., Lallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Supuran, C.T., “Carbonic Anhydrase Inhibitors, Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane Cancer-associated Isozyme IX with Lipophilic Sulfonamides”, *J Enzyme Inhib. And Med. Chem.*, (2003) **184**, 333.
- [22] Winum, J.Y., Scozzafava, A., Montero, J.L., Supuran, C.,T. “Sulfamates and Their Therapeutic Potential”, *Medicinal Research Reviews*, 2004 Wiley Periodicals, Inc.
- [23] Roberts, S., Lane, T.W., and Morel, M.M. “Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae)”, *J Phycol.*, **33**, (1997) 845–850.
- [24] 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 of *Thalassiosira weissflogii* carbonic anhydrase 1” *Biochemistry*, **39**, (2000) 12128–12130.
- [25] Lane, T.W., Morel, F.M.M., “Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt, and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*”, *Plant Physio.*, **123**, (2000) 345–352.
- [26] Kaiser, E.T., and Lo, K.W., “The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane”, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, (1969), 4912.
- [27] Jabusch, J.R., Deutsch, H.F., “Localization of the lysines actylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat”, *Arch. Biochem. Biophys.*, (1989) 238, 170.

- [28] Schcer, A., Dietsch, P., “A 54.000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes in Biology and Chemistry of the Carbonic anhydrase”, *Annals New York Acad. Sci.*, (1984) 429, 241.
- [29] Armstrong, J., Myers, Mc.D., Verpoorte, J.A., and Edsall, J.T., “Purification and properties of human erythrocyte Carbonic anhydrase”, *J. Biol. Chem.*, **214**, (1966), 5137.
- [30] Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., and Goodman, M., “On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and III isozymes: Current topics in Biological and Medical Research”, *Molecular Structure and Regulation*, **7**, (1983), 79.
- [31] Deutsch, H.F., “Carbonic anhydrase”, *Int. J. Biochem.*, **19**, (1987) 100.
- [32] Wistrand, P.J., “Solubilization and preliminary characterization of membrane bound Carbonic anhydrase”, *J. Med. Sci.*, **85**,(1980) 75.
- [33] Ryon, U.S., Whitney, P.L., and Ryen, J.W., “localization of Carbonic anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture”, *J. Appl. Physiol.*, **53**, (1982) 914.
- [34] Lin, K.T.D., Deutsch, H.F., “Human Carbonic anhydrase XII, the complete structure of the C isoenzyme”, *J. Biol. Chem.*, **249**, (1974) 2329.
- [35] Carter, N., Jeffrey, S., Shiels, A., Edward, Y., Tiplen, T., Hopkins, D.A., “Characterization of human Carbonic anhydrase III from skeletal muscle”, *Biochem. Genetics*, **17**, (1979) 837.
- [36] <http://talks.php.net/presentations/slides/mdb/images/> (01.08.2006)
- [37] Stams, T., Chen, Y., Bariack-Sjodin, P.A., Hurt, J.D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Christianson, D.W., *Protein Sci.*, **7**, (1998) 556.
- [38] Supuran, C.T., Scozzafava, A. “Carbonic anhydrase inhibitors-Part 94.1,3,4-Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents?” *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2000) **35** (9), 867.

- [39] Maren, T.H., “Carbonic anhydrase: General perspectives and advances in glaucuma research”, *Drug dev. Res.*, **10**, (1987) 255.
- [40] Arslan, O., “Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds”, *Turk J. Med. Sci.*, (2001) **66** (9), 982
- [41] Franchi, M., Vullo, D., Lallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Supuran, C.T. “Carbonic Anhydrase Inhibitors, Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane Cancer-associated Isozyme IX with Lipophilic Sulfonamides”, *J Enzyme Inhib. And Med. Chem.*, **184**, (2003) 333.
- [42] http://departments.colgate.edu/chemistry/images/rowlett_1ca2.jpg (01.08.2006)
- [43] <http://www.umich.edu/~caflab/carbonic.htm> (01.08.2006)
- [44] Forsman, C., Behravan, G., Jonsson B.H., Liang, Z., Lindskog, S., Ren, X., Sandström, J., Wallgren, K. “Histidine 64 is not required for high CO₂ hydration activity of human carbonic anhydrase II”. *FEBS Letters* **229**, (1988) 360-362.
- [45] Tu, C., Silverman, D.N., “Role of Histidine 64 in the Catalytic Mechanism of Human Carbonic Anhydrase II Studied with a Site-Specific Mutant” *Biochemistry*, **28**, (1989) 7913-7918.
- [46] Fransson, C., Freskgard, P.O., Herbertsson, H., Johansson, A., Jonasson, P., Martensson, L.G., Svensson, M., Jonsson, B.H., Carlsson, U., “Cis-trans isomerization is rate-determining in the reactivation of denatured human carbonic anhydrase II as evidenced by proline isomerase” *FEBS Letters*, **296**, (1991) 90-94.
- [47] Kunkel, P.A. (1985) *proc. Natl. Acad.Sci. USA* **82**, 488-492
- [48] Freskgard, P.O., Carlsson, U., Martensson, L.G., Jonsson, B.H., “Folding around the C-terminus of human carbonic anhydrase II Kinetic characterization by use of a chemically reactive SH-group introduced by protein engineering” *FEBS Letters*, **289**, (1991) 117-122.

- [49] Engstrand, C., Forman, C., Liang, Z., Lindskog, S., "Proton transfer roles of lysine 64 and glutamic acid 64 replacing histidine 64 in the active site of human carbonic anhydrase", *Biochimica et Biophysica Acta*, **1122**, (1992) 321-326.
- [50] Taoka, Chen, X., Tarnuzzer R.W., Heeke G.V., Tu, C., Silverman, D.N., "Catalysis by mutants of human carbonic anhydrase II: effects of replacing hydrophobic residues 198 and 204" *Biochimica et Biophysica Acta*, **1159**, (1992) 274-278
- [51] Xue, Y., Jonsson, B.H., Liljas, A., Lindskog, S., "Modification of a metal ligand in carbonic anhydrase: crystal structure of His⁹⁴→Glu human isozyme II" *FEBS Letters* , **352**, (1994) 137-140.
- [52] Ippolito J.A., Nair, S.K., Alexander R.S., Kiefer, L.L., Christianson, D.W., "Structure of His94Asp carbonic anhydrase II in a new crystalline form reveals a partially occupied zinc binding site", *Febs Lett.*, **353**, (1994), 2 137-40.
- [53] Lesburg, C.A., Huang, C., Christianson, D.W., Fierke, C.A., "Histidine—carboxamide ligand substitutions in the zinc binding site of carbonic anhydrase II after metal coordination geometry but retain catalytic activity", *Protein Eng.*, **10**, (1995) 975-80.
- [54] Hammarström, P., Kalman, B., Jonsson, B.H., Carlsson, U., "Pyrene excimer fluorescence as a probe for investigation of residual structure in the unfolded state of human carbonic anhydrase II", *FEBS Letters*, **420**, (1997) 63-68.
- [55] Doyon, J.B., Hansen, E.A. M., Kim, C.Y., Chang, J.S., Christianson, D.W., Madder, R.D., Voet, J.G., Baird, T.A., Fierke, C.A., Jain, A., "Linear free energy relationships implicate three modes of binding for fluoroaromatic inhibitors to a mutant of carbonic anhydrase II" *Org. Lett.*, **2**, (2000) 1189-1192.
- [56] 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", *Biochem.*, **39**, (2000) 13344-13349.

- [57] Huber, M., Lindgren, M., Hammarström, P., Martensson, L.G., Carlsson, U., Eaton, G.R., Eaton, S.S., “Phase memory relaxation times of spin labels in human carbonic anhydrase II: pulsed EPR to determine spin label location”, *Biophysical chem.*, **94**, (2001) 245-256.
- [58] Huang, S., Sjöblom, B., Eriksson-Sauer, A.E., Johnson, B.H., “Organization of an Efficient Carbonic Anhydrase: Implications for the Mechanism Based on Structure-Function Studies of a T199P/C206S Mutant”, *Biochem.*, **41**, (2002) 7628-7635.
- [59] Elder, I., Han, S., Tu, C., Steele, H., Laipis, P.J., Viola, R.E., Silverman, D.N., “Activation of carbonic anhydrase II by active-site incorporation of histidine analogs”, *Biochemistry and Biophysics*, **421**, (2004) 283-289.
- [60] Elder, I., Tu, C., Ming, L.J., Mckenna, R., Silverman, D.N., “Proton transfer from exogenous donors in catalysis by human carbonic anhydrase II”, *Biochemistry and Biophysics*, **437**, (2005) 106-114.
- [61] <http://www.sci.sdsu.edu/classes/biology/bio551/mardahl/invitromut.html> (01.08.2006)
- [62] <http://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring99/sarah/method.html> (01.08.2006)
- [63] <http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB310/MGlect6.html#SDM> (01.08.2006)
- [64] <http://web.archive.org/web/20010222093603/http://www.labmarket.co.kr/methodpcr5.htm> (01.08.2006)
- [65] <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9G.htm> (01.08.2006)
- [66] http://departments.colgate.edu/chemistry/images/rowlett_1ca2.jpg (01.08.2006)
- [67] http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/index.html (01.08.2006)

- [68] Sorensen, H.P., “Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli” *J. Biotech.*, **115**, (2005) 113-128.
- [69] Georgiou, G., “Optimizing the production of recombinant proteins in microorganisms” *AIChE Journal*, **34**, (1988) 1233-1248.
- [70] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning 3, A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [71] Çıldır, F., “Taq DNA Polimeraz Enziminin E.coli’de Ekspresyonu ve Saflaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Temmuz 2003.
- [72] Koçkar, F., *Biyoteknoloji Ders Notları Balıkesir*, 2001.
- [73] Swartz J.R. “Advances in E.coli production of therapeutic proteins” *Current Opinion in Biotechnology*, **12** (2001) 195-201.
- [74] Tanhauser, S.M., Jewell, D.A., Tu, C.K., Silverman, D.N., Laipis, P.J., “A T7 expression vector optimized for site-directed mutagenesis using oligodeoxyribonucleotide cassettes” *Gene*, **117** (1992) 113-117.
- [75] <http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/tb104.pdf> (01.08.2006)
- [76] Bollog, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., “Protein purification Methods”, Second Edition, Wiley-Liss, Inc. New York, (1982)
- [77] Scopes, R.K., “Protein Purification Principles and Practice”, 3 rd Edition Springer-Verlag New York, (1982)
- [78] John F. Robyt, Bernard J. White, “Biochemical Techniques Theory and Practise”, Waveland Press, Inc., (1987).

[79] <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/WoodW/affchrom1.html>

[80] Cuatrecasas, P., "Protein Purification by Affinity Chromatography, Derivatization of Agarose and Polyacrylamide Beads", *J. Biol. Chem.*, **245**, (1970), 3059

[81] Arslan O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, İ.Ö., "A New Method for Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography", *Turk J. Med. Sci.*, **26**, (1995), 163-166.

[82] Demir, N., Demir, Y., Coşkun, F., "Purification and Characterization of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocyte Plasma Membrane", *Turk. J. Med. Sci.*, **31**, (2001), 477-482.

[83] Johenson, J.T., "Isolation of Human Carbonic anhydrase band C and apocarbonic anhydrase by affinity chromatography", *Carlsberg Res. Commun.*, **41**, (1976) 73.

[84] Ozensoy, O., Arslan, O., Oznur, S. "A new method for purification carbonic anhydrase by affinity chromatography" *Biochemistry (Moscow)*, **9**, (2004) (2), 216.

[85] Kaul, K., Mattiasson B., "Affinity Elution of almond Oxynitrilase from an Affinity Support Based on Eupergit C", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **9**, (1987) 294.

[86] Kasche, V., Loeffler, F., Scholzen, T., Kramer, D.M., and Boller, T., "Rapid Protein Purification Using Phenylbutylamine-Eupergit : A novel Method for Large-Scale Procedures", *J. Chromatogr.*, **510**, (1990) 149.

[87] <http://www.stratagene.com/manuals/200133.pdf> (01.08.2006)

[88] <http://www.stratagene.com/manuals/200518.pdf> (01.08.2006)

[89] Temizkan, G., Arda, N., 'Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler', İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEEM), Yayın no: 2, Nobel tıp kitabevleri, 2004.

[90] <http://www.stratagene.com/manuals/200518.pdf> (01.08.2006)

[91] Tura Kockar F., ‘Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene’, PH. D. Thesis Cardiff School of Biosciences, Cardiff University (1999)

[92] <http://www.protocol-online.org> (01.08.2006)

[93] Molecular techniques: Protein Chemistry and Molecular Cloning, Laboratory Manual, August 20-October 2, 2002, Interdisciplinary Center for Biotechnology Research University of Florida.

[94] Bradford, M.M., “A rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”, *Anal. Biochem.*, **72**, (1976), 248.

[95] Laemmli U.K., “Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature* 227 (**229**), (1970) 680-5.

[96] Özensoy, Ö., “Eritrositlerden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Safılaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı, Balıkesir.

[97] Maren, C.H., “A Simplified Micromethod for the Determination of Carbonic Anhydrase and its Inhibitors”, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **130**, (1960), 26.

[98] <http://www.bioinformatics.org> (01.08.2006)

[99] <http://www.idtdna.com> (01.08.2006)

[100] http://www.hgmd.cf.ac.uk/docs/cd_amino.html (01.08.2006)

[101] http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid (01.08.2006)

[102] <http://www.fermentas.com/profiles/electrophoresis/pdf/generuler1kb0312> (01.08.2006)

[103] <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/marksm0441.htm> (01.08.2006)