

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



***STREPTOCOCCUS MUTANS* KARBONİK ANHİDRAZİNİN
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI, ELEKTROFORETİK VE
KİNETİK ÖZELİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

NURCAN DEDEOĞLU

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

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



***STREPTOCOCCUS MUTANS* KARBONİK ANHİDRAZİNİN
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI, ELEKTROFORETİK VE
KİNETİK ÖZELİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

NURCAN DEDEOĞLU

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

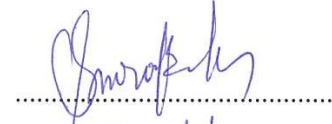
Nurcan DEDEOĞLU tarafından hazırlanan “**STREPTOCOCCUS MUTANS KARBONİK ANHİDRAZİNİN EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI, ELEKTROFORETİK VE KİNETİK ÖZELİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 01.06.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK



Eş Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM



Üye

Prof. Dr. Oktay ARSLAN



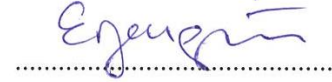
Üye

Prof. Dr. Leman TARHAN



Üye

Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN



Üye

Doç. Dr. Nahit GENÇER



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması “Balıkesir Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından 2012/39 nolu proje” ve “TUBİTAK 2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Bursu” ile desteklenmiştir.

ÖZET

**STREPTOCOCCUS MUTANS KARBONİK ANHİDRAZININ EKSPRESYONU,
SAFLAŞTIRILMASI, ELEKTROFORETİK VE KİNETİK ÖZELİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI
DOKTORA TEZİ
NURCAN DEDEOĞLU
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. SEMRA IŞIK)
(EŞ DANIŞMAN: YRD. DOÇ. DR. HATİCE YILDIRIM)
BALIKESİR, HAZİRAN - 2015**

Diş çürüğü oluşumuna sebep olan oral patojenik bakteri *Streptococcus mutans*, β -sınıfı karbonik anhidrazı (CA, EC 4.2.1.1), SmuCA, kodlar. Karbonik anhidrazlar tüm canlılar aleminde karbondioksitin bikarbonat ve protona hidrasyonu gibi basit ancak fizyolojik açıdan önemli olan bir reaksiyonu katalizler.

Bu çalışmada bazı klasik ve klinik sülfonamidlerin SmuCA üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. SMU_328 geni *S.mutans UA159* genomundan PCR'a dayalı teknik ile çoğaltıldı. SMU_328 geni pGEM-T Easy vektörüne ve ardından da pET30a ekspresyon vektörüne klonlandı. SmuCA'nın ekspresyonu *E.coli* BL21(DE3) içerisinde gerçekleştirildi. SmuCA, Ni-NTA afinite kolonu ile saflaştırıldı. Enzimin saflığı Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile tespit edildi. Enzim aktivitesi ve inhibisyon çalışmaları Stopped flow cihazı ile yapıldı. SmuCA üzerine 40 adet sülfonamidin inhibisyon etkisi araştırıldı.

SmuCA $k_{cat} = 4.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ve $k_{cat}/K_m = 5.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ile CO₂ hidrasyon reaksiyonu için iyi bir katalitik aktivite göstermiştir ve çoğu sülfonamidler ile etkili bir şekilde inhibe edilmiştir (K_i değerleri 246 nM – 13.5 μ M). En etkili SmuCA inhibitörleri bromosulfanilamid, deasetile asetazolamid, 4-hidroksimetilbenzensülfonamid, pirimidin-yerdeğiştirilmiş sulfanilamid, aminobenzolamid ve yapıca benzeri olanlar ile birlikte asetazolamid, metazolamid, indisulam ve valdekoksib olarak belirlenmiştir. Bu bileşikler 246 ve 468 nM arasında değişen inhibisyon sabiti göstermişlerdir.

ANAHTAR KELİMELER: *Streptococcus mutans*, karbonik anhidraz, β -sınıfı enzim, ekspresyon, inhibitör, sulfonamid

ABSTRACT

EXPRESSION AND PURIFICATION OF STREPTOCOCCUS MUTANS CARBONIC ANHYDRASE AND INVESTIGATION OF ITS ELECTROPHORETIC AND KINETIC PROPERTIES

PH.D THESIS

NURCAN DEDEOGLU

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: ASSIT. PROF. DR. SEMRA ISIK)

(CO-SUPERVISOR: ASSIT. PROF. DR. HATICE YILDIRIM)

BALIKESİR, JUNE 2015

Streptococcus mutans, the oral pathogenic bacterium provoking dental caries formation, encodes for a β -class carbonic anhydrase (CA, EC 4.2.1.1), SmuCA. Carbonic anhydrases catalyze a simple but physiologically important reaction in all life kingdoms, the hydration of carbon dioxide to bicarbonate and protons.

In this study the inhibition effects of some classical and clinical sulfonamides on SmuCA were investigated. SMU_328 gene was amplified from *S.mutans UA159* genom by PCR based strategy. SMU_328 gene was cloned into pGEM-T Easy vector and subsequently into pET30a expression vector. The expyression of SmuCA was performed in *E.coli* BL21(DE3). SmuCA was purified by Ni-NTA affinity column. The purity of enzyme was determined by Sodium Dodesyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Enzyme activity and inhibition studies were performed by Stopped Flow spectrophotometer. The inhibition effects of 40 sulfonamides on SmuCA were investigated.

SmuCA has showed a good catalytic activity for the CO₂ hydration reaction, with k_{cat} $4.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ and k_{cat}/K_m of $5.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, and was efficiently inhibited by most sulfonamides (K_I s of 246 nM – 13.5 μ M). The best SmuCA inhibitors were bromosulfanilamide, deacetylated acetazolamide, 4-hydroxymethylbenzenesulfonamide, a pyrimidine-substituted sulfanilamide, aminobenzolamide and compounds structurally similar to it, as well as acetazolamide, methazolamide, indisulam and valdecoxib. These compounds showed inhibition constants ranging between 246 and 468 nM.

KEYWORDS: *Streptococcus mutans*, carbonic anhydrase, β -class enzyme, expression, inhibitor, sulfonamide.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖNSÖZ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 <i>Streptococcus mutans</i>	3
1.2 Karbonik Anhidrazların Dağılımı	5
1.3 Karbonik Anhidraz Ailesinin Sınıflandırılması	7
1.3.1 α -Sınıfı CA.....	7
1.3.2 β -Sınıfı CA.....	10
1.3.3 γ -Sınıfı CA.....	12
1.3.4 δ -Sınıfı CA.....	13
1.3.5 ζ -Sınıfı CA.....	14
1.3.6 η -Sınıfı CA.....	15
1.4 Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Fonksiyonları	16
1.5 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	20
1.5.1 Karbonik anhidrazın inhibisyonunun mekanizması	22
1.6 Çalışmanın Amacı	23
2. MATERYAL VE METOD	24
2.1 MATERYAL.....	24
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	24
2.1.3 <i>Streptococcus mutans</i> Genomu, Bakteri Soyları ve Plazmidler	25
2.1.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	28
2.1.4.1 <i>E.coli</i> için Bakteriyel Kültür ortamları	28
2.1.4.2 Antibiyotik Hazırlanması.....	28
2.1.4.3 Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit	28
2.1.4.4 Agaroz Jel Elektrophorez Tamponu	29
2.1.4.5 Transformasyon için Kompetent Hücre Hazırlama Çözeltisi....	29
2.1.4.6 Protein Ekspresyonu ve Lizis İçin Kullanılan Tamponlar.....	30
2.1.4.7 Protein Saflaştırma Basamağı.....	31
2.1.4.8 Protonografi için kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	32
2.1.4.9 Hidrataz Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar	32
2.1.4.10 SDS-PAGE Elektrophorezinde Kullanılan Tamponlar	33
2.2 METOD.....	36
2.2.1 Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması.....	36
2.2.2 DNA ile İlgili Teknikler	36
2.2.2.1 Primer Tasarımı	36
2.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)	37
2.2.2.3 Spektrofotometrik Yöntem	38
2.2.2.4 Agaroz Jel Elektrophorez	38
2.2.2.5 PCR ile Çoğaltılan Genin Agaroz Jelden Geri Kazanımı.....	39

2.2.2.6	pGEM-T EASY Vektörüne SMU_328 geninin klonlanması	39
2.2.2.7	Plazmit DNA İzolasyonu	40
2.2.2.8	BamHI ve KpnI Enzimleri ile Kesim Protokolü.....	41
2.2.2.9	SMU_328 Geninin pET30a Vektörüne Klonlanması.....	41
2.2.2.10	Agaroz Jelde Yürütülen Vektör ve Genlerin Geri Kazanılması	42
2.2.3	Mikrobiyolojik Metotlar	42
2.2.3.1	Ön Kültür Hazırlanması.....	42
2.2.3.2	Plazmit Stoklarının Hazırlanması	42
2.2.3.3	Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlanması	43
2.2.3.4	Bakteriyel Transformasyon	44
2.2.3.5	Rekombinant Protein Ekspresyonu.....	44
2.2.4	Biyokimyasal Metodlar.....	46
2.2.4.1	Ni-NTA Klonundan Geçirme Basamağı	46
2.2.4.2	Kalitatif Protein Tayini	47
2.2.4.3	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS- PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü.....	47
2.2.4.4	Protonografi	49
2.2.4.5	CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi (Stop Flow Kinetik Alet)	49
2.2.4.6	İnhibitörler için IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi.....	50
3.	BULGULAR	57
3.1	<i>Streptococcus mutans</i> Genomik DNA'sı	57
3.2	Primer Tasarımı	57
3.3	PCR	58
3.4	SMU_328 Geninin pGEM-T EASY Vektörüne Klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye Transformasyonu	58
3.5	SMU_328 Geninin pET30a Vektörüne Klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye Transformasyonu	60
3.6	Dizi Analizi	61
3.7	<i>S. mutans</i> CA'nın Ekspresyonu ve Saflaştırılması	63
3.7.1	<i>S. mutans</i> CA'nın Ekspresyonu	63
3.7.1.1	Protonografi ile Aktivite Kontrolü.....	64
3.7.2	Protein Saflaştırma Basamağı	65
3.8	<i>S. mutans</i> CA'sının Aktivite Tayini	66
3.9	Bazı CA İnhibitörleri ile <i>S. mutans</i> CA'sının İnhibisyonu	66
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	90
5.	KAYNAKLAR.....	102
6.	EKLER.....	113

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1:	Streptococcus mutans kolonilerinin elektron mikroskobu görüntüleri.....	4
Şekil 1.2:	α -CA II izoenzimi; A. aktif bölge, B. reaksiyon mekanizması	9
Şekil 1.3:	Dimerik stCA 1' in X-ray kristallografik görünümü.....	11
Şekil 1.4:	β -CA'ların Zn(II) koordinasyonunun gösterimi.....	11
Şekil 1.5:	Prokaryotik β -CA'lar için önerilen katalitik mekanizma (<i>P.purpureum</i> enzim numaralandırması).....	12
Şekil 1.6:	A , <i>Methanosarcina thermophila</i> CA'sı, 69 kDa (homotrimer); B , γ CA'nın aktif bölgesinde metal ligasyonu.....	13
Şekil 1.7:	CDCA1 Enziminin yapısı.....	15
Şekil 1.8:	Yağ asidi biyosentezi ve Karbonik anhidraz izoenzimlerinin rolü.....	19
Şekil 1.9:	Karbonik anhidrazın 1. Sülfonamid inhibitörü ile, 2. anyonik inhibitör ile inhibisyonunun mekanizması.....	22
Şekil 2.1:	pGEM-T Vektör Haritası.....	26
Şekil 2.2:	pET30a(+) Vektör Haritası.....	27
Şekil 2.3:	Stopped flow cihazının bileşenleri.....	49
Şekil 3.1:	SMU_328 geninin PCR ile çoğaltılması. M, marker; 1, negatif control; 2, pozitif control; 3, SMU_328 geni; 4, 5, 6 MgCl ₂ optimizasyonunu göstermektedir (sırasıyla 1 mM, 2 mM ve 4 mM MgCl ₂).....	58
Şekil 3.2:	Mini Prep Kiti ile pGEM-T Easy +SMU_328 plazmidinin izolasyonu.M, 1kb'lık Marker; 1, PCR ile çoğaltılmış SMU_328 geni; 2, pGEMT Easy+SMU_328 plazmid izolasyonu; 3, 4 ve 5, pGEMT Easy+SMU_328 plazmidinin restriksiyon enzimleriyle kesimini göstermektedir.....	59
Şekil 3.3:	1 ve 2 ,BamHI ve KpnI enzimleriyle kesilmiş pET30a vektörü; M, 1kb'lık marker.....	60
Şekil 3.4:	M, 1kb'lık marker; 1, pET30a+SMU_328 izolasyon 2,	

	SMU_328 geninin BamHI ve KpnI enzimleriyle pET30' dan kesimi.....	61
Şekil 3.5:	SMU_328 geni ile dizi analizinden gelen <i>S. mutans</i> CA dizisinin karşılaştırılması.....	62
Şekil 3.6:	Ekspresyon sonucu SDS PAGE görüntüsü.....	64
Şekil 3.7:	Protonografi jeli görüntülemesi.....	65
Şekil 3.8:	Ni-NTA kolonu ile elüe edilen SmuCA enziminin SDS PAGE ile görüntülenmesi.....	65
Şekil 3.9:	1 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	67
Şekil 3.10:	2 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	67
Şekil 3.11:	3 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	68
Şekil 3.12:	4 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	68
Şekil 3.13:	5 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	69
Şekil 3.14:	6 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	69
Şekil 3.15:	7 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	70
Şekil 3.16:	8 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	70
Şekil 3.17:	9 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	71
Şekil 3.18:	10 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	71
Şekil 3.19:	11 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	72
Şekil 3.20:	12 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	72

Şekil 3.21:	13 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	73
Şekil 3.22:	14 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	73
Şekil 3.23:	15 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	74
Şekil 3.24:	16 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	74
Şekil 3.25:	17 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	75
Şekil 3.26:	18 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	75
Şekil 3.27:	19 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	76
Şekil 3.28:	20 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	76
Şekil 3.29:	21 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	77
Şekil 3.30:	22 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	77
Şekil 3.31:	23 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	78
Şekil 3.32:	24 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	78
Şekil 3.33:	Asetazolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	79
Şekil 3.34:	Metazolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	79
Şekil 3.35:	Etokszolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	80
Şekil 3.36:	Dorzolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	80
Şekil 3.37:	Brinzolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	81

Şekil 3.38:	Benzolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	81
Şekil 3.39:	Topiramamat sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	82
Şekil 3.40:	Sulpirid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	82
Şekil 3.41:	İndisulam sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	83
Şekil 3.42:	Zonisamide sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	83
Şekil 3.43:	Selekoksisib sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	84
Şekil 3.44:	Valdekoksisib sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	84
Şekil 3.45:	Sulthiam sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	85
Şekil 3.46:	Sakarın sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	85
Şekil 3.47	Hidroklorotiazid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	86
Şekil 4.1:	Rekombinant olarak üretilen SmuCA'nın amino asit dizisinin <i>Streptococcus mutans</i> β CA'sı ile karşılaştırılması.....	91
Şekil 4.2:	<i>S. mutans</i> CA'sının diğer β -CA' lar ile amino asit dizilerinin karşılaştırılması.....	91
Şekil 4.3:	Prokaryotik ve ökaryotik türlerden seçilen bazı β -CA'ların filogenetik ağacı.....	94
Şekil 4.4	SmuCA için önerilen katalitik mekanizma (SmuCA aminoasit numaralandırılması).....	95
Şekil A1	SMU_328 genini kesmeyen enzimler.....	114
Şekil A.2	1kb DNA Marker.....	115
Şekil A.3	SDS PAGE için kullanılan protein markerı (Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder Katalog no: 26620).....	115

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1: Memeli α -CA izoenzimlerinin organ/doku dağılımı, hücrel lokalizasyonu, CO ₂ hidrataz aktivitesi ve sülfonamitlere afinitesi...	18
Tablo 2.1: Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri.....	24
Tablo 2.2: Kompetent Hücre için Kullanılan Çözelti (DH5 α E.coli soyu için).....	29
Tablo 2.3: Kompetent Hücre İçin Kullanılan Uygulama tamponu (BL21(DE3) E.coli soyu için)	29
Tablo 2.4: Bakteri Yıkama tamponu.....	30
Tablo 2.5: Lizis Tamponu: 20mM Tris / 0,5mM EDTA / 0,5mM EGTA (pH:8,7).....	30
Tablo 2.6: 100mM PMSF (=100X , PMSF Stok çözelti).....	30
Tablo 2.7: Lizis Tamponu; 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol.	31
Tablo 2.8: Yıkama Tamponu; 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole.....	31
Tablo 2.9: Elüsyon Tamponu; 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole.....	32
Tablo 2.10: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tampon.....	33
Tablo 2.11: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tampon.....	33
Tablo 2.12: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı.....	34
Tablo 2.13: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi.....	35
Tablo 2.14: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile su.....	35
Tablo 2.15: PCR Reaksiyonu.....	37
Tablo 2.16: PCR Koşulları.....	38
Tablo 2.17: Ligasyon Reaksiyonu.....	40
Tablo 2.18 pET 30a ve SMU_328 geninin ligasyon reaksiyonu.....	41
Tablo 2.19 SmuCA inhibisyonunda kullanılan inhibitörler.....	51
Tablo 3.1: S. mutans CA primerleri.....	57

Tablo 3.2:	İnhibitörlerin SmuCA enzimi üzerindeki IC ₅₀ ve Ki değerleri.....	87
Tablo 4.1:	İnsan sitozolik izoenzimleri hCA I ve II (α -sınıfı); bakteriyel β -CA' lar: PgiCAB, HpyCA, LpCA1, LpCA2 and β -SmuCA tarafından katalizlenen CO ₂ hidrasyon reaksiyonu için kinetik parametreler...	93
Tablo 4.2:	İnsan izoformları hCA I ve hCA II ve <i>H. pylori</i> (HypCA), <i>P. gingivalis</i> (PgiCAB) and <i>S. mutans</i> (SmuCA) gibi bazı β -sınıfı bakteriyel CA enzimlerinin klasik 1-24 ve klinik amaçlı kullanılan AAZ – HCT sülfonamidlerle inhibisyonu.....	97
Tablo A.1:	Prokaryotlarda karbonik anhidraz olduğu varsayılan genlerin dağılımı.....	113

KISALTMA LİSTESİ

Kısaltma :	Kısaltma Açıklaması veya Adı
CA	Karbonik anhidraz
CAI	Karbonik anhidraz inhibitörü
LB	Luria Broth
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGTA	Etilenglikol tetraasetik asit
IPTG	İzopropil β -D-Tiogalaktopiranozit
PMSF	Fenilmetilsülfonil Florür
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
RPM	Dakikadaki Dönüş Sayısı
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TEMED	N,N,N',N',-tetrametil etilendiamin
HEPES	4-hidroksietil-1-piperazinetansülfonik asit
Ni-NTA	Nikel- Nitroloasetik asit
EC	Enzim kod numarası
hCA I	İnsan Karbonik Anhidraz I İzoenzimi
hCA II	İnsan Karbonik Anhidraz II İzoenzimi

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın büyük bir kısmı Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK ve Yrd.Doç. Dr. Hatice YILDIRIM danışmanlığında Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji ve Kimya Bölümü laboratuvarlarında, diğer kısmı ise İtalya/Floransa Üniversitesi Bioorganik Kimya laboratuvarında Dr. C. T. SUPURAN danışmanlığında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yetiştiren ve bana yol gösteren ve en önemlisi de en zor süreçlerimde bir danışman olmaktan öte bir arkadaş, bir abla olan kıymetli Hocam Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK' a ve doktora tezim süresince bana yol gösteren sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Üniversiteye başladığım günden beri engin bilgisi ve tecrübesiyle beni yetiştiren ve bilimsel yönünü her zaman kendime örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Oktay Arslan'a ve moleküler biyoloji alanında kendimi geliştirmeme büyük katkısı olan, her zaman desteği ve bilgisini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Feray Köçkar'a en derin şükranlarımı sunarım.

Lisansüstü eğitimim süresince her zaman yardımını ve desteğini esirgemeyen kıymetli Hocam Yrd. Doç. Dr. Serap Beyaztaş' a ve doktora tezim süresince geçtiğim zor süreçlerde maddi ve manevi olarak her zaman bana destek olan değerli arkadaşlarım Dr. Şeref Karadeniz ve Beste Şipal'e sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca lisansüstü eğitimim süresince her zaman güler yüzlerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili Fen Bilimleri Enstitüsü personeline teşekkürü borç bilirim.

Bu tezde maddi ve manevi katkıları büyük olan, beni yetiştiren, hayatım boyunca beni destekleyen, her an yanımda olan ve beni ayakta tutan, çok kıymetli babam Nurettin Dedeoğlu, rahmetli annem Hatice Dedeoğlu, canım kardeşlerim ve mutluluk kaynağım biricik yeğenim İkra Neris'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Yıllardır yapılan epidomolojik, biyokimyasal ve hayvan çalışmaları *Streptococcus mutans*' in insan diş çürüklerinin başlıca etkeni olduğunu göstermiştir [1]. Diş çürükleri uygar toplumlarda çok yaygın bulunması nedeniyle halk sağlığı için en önemli problemlerden biridir [2]. Tedavi edilmemiş diş çürükleri *S. mutans*' in kan dolaşımına karışmasına ve eğer tedavi edilmezse bazen bakteriyemi, infektif endokarditis ve kalp kapakçığı enfeksiyonu gibi ölümcül olabilen çeşitli şiddetli enfeksiyonlara sebep olmaktadır [3]. Asidojenik ve asidurik olmalarının yanısıra, *S. mutans*' ların fazla miktarda intrasellular ve ekstrasellular polisakkaridleri üretebilmelerinin kariyojenizitelerinde büyük rol oynadığına inanılmaktadır. *S. mutans*' in diş çürüklerinin etiyolojik ajanı olarak keşfedilmesiyle birlikte, hastalığın engellenmesi için antimikrobiyal ajanlar ve aşı hazırlamada hedef olarak tüm dikkatler bu bakteri üzerine odaklanmıştır. Geleneksel ilaçlar genellikle bakteriyel enfeksiyon için etkili bir antibiyotik terapi sağlar. Ancak, antibiyotiğe direnç problemi ve bu duruma yeni çözüm arayışında da bir artış olmaktadır. Son yıllarda, *S. mutans* izolatları tedavi için kullanılan yaygın antibiyotiklere karşı büyük ölçüde direnç göstermeye başlamıştır [4].

Gram pozitif ve gram negatif, her ikisini de içeren bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Brucella suis*, *Streptococcus pneumoniae*, vs..) çoğu antibiyotiğe yanıt vermemekte [5] ve bundan dolayı da çok farklı sınıflara ait antibiyotiğe direncin artması da dünya çapında bir problem olmaktadır [6, 7]. Çoğu bakteriyel patojenin genomlarının klonlanması hayat döngüleri için gerekli önemli olan virülans faktörlerinin veya proteinlerin inhibisyonu için alternatif yolların keşfini mümkün kılmaktadır [8]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, karbondioksit' in bikarbonat ve protona hidrasyonu gibi basit ancak fizyolojik açıdan önemli süreçleri katalizleyen bir enzim sınıfı uygun bir ilaç hedefi olarak keşfedilmiştir. Bu enzimler karbonik anhidrazlar (CA, EC. 4.2.1.1)

olarak adlandırılır ve tamamen metalloenzimlerdir. CO₂ ve HCO₃⁻ arasındaki reaksiyon nötral pH civarında kendiliğinden meydana gelse de oldukça yavaş gerçekleştiği için biyolojik sistemlerde CA enzimi önemlidir.[9]. Karbondioksitin, bikarbonat ve protona hidrasyonu gibi basit ancak oldukça önemli bir reaksiyonu katalizlemesiyle bakteriyel CA'lar, muhtemelen hayatta kalabilme, invazyon ve patojenite gibi bakteri yaşam döngüsünün en kritik aşamalarında rol almaktadır [8]. CO₂, bikarbonat ve proton tüm canlılar aleminde (Bakteri, Archaea ve ökaryotlar) çoğu önemli fizyolojik süreçlerde gerekli olan molekül/iyonlardır ve bu organizmaların farklı doku/hücrelerinde göreceli olarak yüksek miktarda bulunmalarından dolayı Karbonik anhidraz enziminin genetik olarak 6 farklı enzim sınıfı (α -, β -, γ -, δ -, ζ - ve η -CA) bulunmaktadır [10, 11].

Karbonik anhidraz ailesinin üç sınıfı (α , β , ve γ) bakterilerde yaygın olarak bulunur ve aminoasit dizilişleri açısından önemli sayılabilecek bir benzerlik göstermemektedirler. γ -sınıfı CA'lar özellikle archaea ve bakteride bulunmasının yanı sıra bazı bitkilerde de bulunurlar. Her ne kadar yakın bir zamanda mitokondride lokalize olan bu sınıfın bir üyesi *Drosophila* da bulunmuş olsa da β -sınıfı CA'lar bitkiler, algler, fungi, öbakteri ve arkea da bulunur. α -sınıfı CA'lar Arkea hariç çoğu gruplarda bulunurlar ve hayvanlarda baskın sınıftırlar. δ ve ζ -sınıfı CA'lar deniz mikroorganizmalarında bulunurken son sınıf (η -sınıfı) CA ise Del prete ve ark. Tarafından protozoan parazit *Plasmodium falciparum*'da keşfedilmiştir [10, 12].

Şu ana kadar memelilerde moleküler özellikleri, oligomerik düzenlenmeleri, ekspresyon seviyeleri, hücresel lokalizasyonu, doku dağılımı, katalitik aktivite ve çeşitli inhibitör sınıflarına verdikleri tepkiler yönünden farklılık gösteren 16 farklı (insanlarda ise 15 farklı) α -CA izoenzimi veya CA-ilişkili protein (CARP) saptanmıştır. Beş sitozolik formu (CA I, II, III, VII ve XIII), beş tane membran bağlı (CA IV, IX, XII, XIV ve XV), iki mitokondriyal form (CA VA ve VB) ve bir salgı CA izoenzimi CA VI (tükürük ve sütte) vardır [13]. Ayrıca CA gen ailesine ait olan üç tane CA-ilişkili protein (CARP) ve çekirdekte bir tane NonO/p54^{nrb} formu tespit edilmiştir [11, 14].

CA izoenzimlerinin farklı dokularda bulunması sonucu dokular ve akciğer metabolizması arasında CO₂/bikarbonat transportu ve solunum, pH ve CO₂ homeostasisi, çeşitli doku/organlarda elektrolit salınımı, biyosentetik reaksiyonlar (glokoneogenez, lipogenez ve ürojenez gibi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve pek çok diğer fizyolojik ve patolojik süreçler ile ilgili önemli fizyolojik olaylarla bağlantılıdır [15]. Çeşitli fizyolojik süreçlerdeki bu önemli rolleri ve farklı insan hastalıklarıyla ilişkisinde görülen anormal aktivite seviyeleri CA' ları biyomedikal uygulamalarda inhibitör veya aktivatör dizaynı için önemli bir hedef haline getirmişlerdir [13]. Ayrıca çeşitli aktivatörlerle CA aktivasyonu da gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu bileşikler Alzheimers' hastalığı, yaşlanma, öğrenme ve hafıza kaybı ile ilişkili durumlarda farmakolojik ajan olarak önemlidir [16].

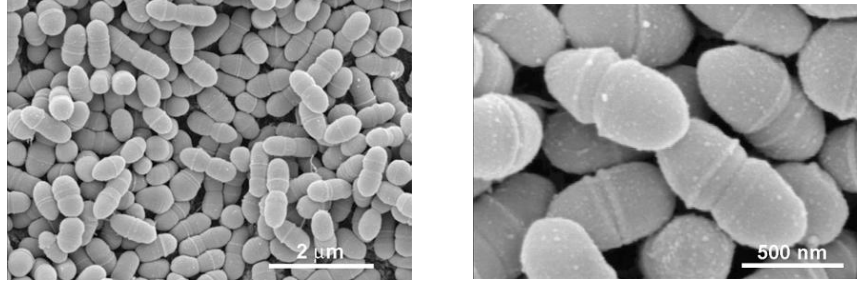
β -sınıfı CA' ların omurgalılarda bulunmayıp, bakterilerde yaygın olarak kodlanması ile klinik olarak kullanımda olan çoğu antibiyotiklere geliştirilen direnç problemi olmaksızın antibakteriyel ilaç olarak hedef alınmaktadır [8].

Son çalışmalar bakteriyel CA' ları hedef alan çoğu sulfonamid/ sulfamat sınıfına ait olan çeşitli CA inhibitörlerini belirlemişlerdir. Patojenin yaşam döngüsünde CA' ların rolünün anlaşılmasında ve CA inhibisyonunun yeni tür antibiyotiklerin keşfi için alternatif bir yol oluşturup oluşturamayacağını bulmak için bu inhibitor sınıfları büyük önem arz etmektedir. Antibiyotik direnç probleminin gün geçtikçe artmasıyla patojenin yaşam döngüsünde önemli bir basamağı inhibe eden bu alternatif bileşiklerin keşfi oldukça önemlidir [8].

1.1 *Streptococcus mutans*

Çiftler veya kısa ve orta uzunlukta zincirler halinde bulunup 0.5-0.75 μ m çapındadırlar (Şekil 1.1). Kapsülsüzdürler. Gram(+), katalaz(-), ve koloniler hareketsizdir. Mikrobiyal dental plaktan izole edilen mutans streptokokların c, e ve f

serotipleri mevcuttur. *Streptococcus mutans* grubu morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre homojen bir grup oluştururlar [17].



Şekil 1. 1 *Streptococcus mutans* kolonilerinin elektron mikroskop görüntüleri[17]

İnsan ağız florasının bir ögesi olan *S. mutans*, büyük oranda diş çürüğünün ana etyolojik etkeni olarak kabul edilmektedir. Ağız boşluğu içindeki şartlar uç noktalarda hareket edecek kadar çok değişken ve karmaşıktır. Bu nedenden dolayı, ağız boşluğunda yaşamaya devam edebilmek için, *S. mutans*, çok keskin çevresel değişimlere ve farklı toksik maddelere karşı dayanabilmelidir. Ne var ki, çürük yapıcı bu patojenin hayatta kalabildiği ve böylesi uç çevresel şartlar altında çoğalmaya devam edebildiği mekanizmalar bu konuyla ilgili çok az araştırma yapıldığı için büyük oranda bilinmemektedir [18].

Oral streptokok ların 25 türü ağız boşluğunda yaşamaktadır. Her tür, farklı ağız bölgesinde koloni kurmak, rekabet içinde olduğu bakterilerle değişen koşullarda mücadele edebilmek ve dış saldırılar karşısında hayatta kalmak için farklı özgün özellikler geliştirmiştir. Mikrobik biotadaki dengesizlikler ağız hastalıklarına neden olabilir. Özel şartlar altında, komensal streptokoklar hastalık yapan ve konakçıya zarar veren fırsatçı patojenlere dönüşebilir. Ağızdaki streptokoklar arasında hem zararsız hem de zararlı bakteriler vardır. *Streptococcus mutans* diş çürüğüne eşlik eden en önemli bakteridir. Bu karmaşık bakterinin taksonomisi henüz deneme aşamasındadır [19]. 1970 yılında yapılan bir çalışmada ağız boşluğundaki toplam streptokokların % 39'unu oluşturan *S. mutans*'ın çoğunlukla dişteki çürük alanlarında ve çatlaklarda olduğu bulguları. Daha az sayıda *S.mutans*'ın ise yanak yüzeyinde (% 2-9) olduğu gösterilmiştir [20].

Streptococcus mutans genom analizine göre *Streptococcus mutans* NN2025 ve *Streptococcus mutans* UA159 olmak üzere genetik açıdan birbirine büyük oranda benzer iki soy bulunmaktadır. *Streptococcus mutans* UA159 soyu, 2042 gen, 1960 protein, 15 rRNA, 65 tRNA içermektedir. *S. mutans*' ların ORF (açık okuma çerçevesi)'lerinin 80%' si *S. mutans* soyları arasında korunmuştur. Bu *S. mutans* genomunun, diğer *Streptococcus* türlerinden daha stabil olduğunu gösterir. Vejetatif büyüme genlerinin çoğu yüksek oranda korunmuştur. Karbohidrat metabolizması *S. mutans*' ın yaşamını sürdürebilmesi için oldukça önemlidir ve çeşitli şekerlerin metabolizması, transportu, karbohidratların fermentasyonu için gerekli genler UA159 ve NN2025 soyları arasında korunmuştur [1, 21].

S. mutans çok çeşitli karbohidratları nonoksidatif yolla metabolize eder ve bu metabolik yolların hepsi aydınlatılmış ve genomun yaklaşık % 15'i transport sistemiyle ilgilidir. Virulans genleri, ekstrasellüler adherent glukan üretimi, adhesinler, asit toleransı, proteazlar ve hemolisinler belirlenmiştir [1, 22].

S. mutans UA159, genomunda α - ve β -CA olmak üzere karbonik anhidraz enzimine ait iki gen bulunmaktadır. α -CA' yı kodlayan SMU1595 geni 771 baz çiftinden (256 aa), β -CA' yı kodlayan SMU328 geni ise 501 baz çiftinden (166 aa) oluşmaktadır.

1.2 Karbonik Anhidrazların Dağılımı

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda solunum, karbondioksit transportu ve fotosentez gibi önemli fonksiyonları gerçekleştiren CA' ların prokaryotların çoğunda bulunduğu ortaya çıkmıştır [15]. Bakteriyel CA'lar, muhtemelen hayatta kalabilme, yayılma ve potojenite gibi bakteri yaşam döngüsünün en kritik aşamalarında rol almaktadır. β -CA' ların *Candida albicans*, *Candida glabrata*,

Cryptococcus neoformans ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi fungi/maya [23-26] ve *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella suis*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila* ve *Haemophilus influenzae* gibi bakterileri [27-29] içeren çeşitli patojenik organizmalarda bulunduğu bildirilmiştir. Aslında, *Neisseria* spp. ve *H. Pylori*' den α -CA' lar ve *E. coli*, *H.pylori*, *M.tuberculosis*, *Brucella* spp., *S. pneumoniae*, *S. enterica*, and *H. İnfluenzae*' dan β -sınıf CA'lar klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bunlardan bazılarının katalitik/inhibisyon mekanizmasının iyi bir şekilde aydınlatılmasına yardımcı olan yüksek çözünürlükte X-ray kristal yapıları da belirlenmiştir [8]. Malaryaya neden olan *Plasmodium falciparum* protozoanında iki farklı α -CA'nın varlığı keşfedilmiştir [30]. Heinhorst ve ark. *Halothiobacillus neapolitanus*'tan CA saflaştırmışlar ve karakterizasyonunu yapmışlardır [31].

Yüksek bitkiler, alg ve siyanobakteride CA ailesinin 3 üyesinin de bulunduğu bilinmektedir. Örneğin, *Arabidopsis* genom analizleri bu bitkide en az 14 farklı CA bulunmasına karşın tek hücreli yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*'de sadece 6 CA izoenzimi bulunduğunu göstermiştir. Alglerde, CA mitekondri, tilakoid kloroplast, sitoplazma ve periplazmik boşlukta bulunmaktadır. C₃ dikotiledonlarda 2 tip CA izole edilmiştir, bunlardan biri kloroplast stroma diğeri ise sitoplazmada bulunurken, C₄ bitkilerde bu enzimler CO₂ fiksasyonunda bulunan ilk enzim fosfoenolpiruvat (PEP) karboksilazı sağlayan mezofil hücrelerde bulunurlar. CAM (Crassulacean Asit Metabolizması) bitkilerde CA enzimleri sitozol ve CO₂ fiksasyonuna dahil oldukları kloroplastlarda bol miktarda bulunur. Bu enzimler karasal bitkilerde oldukça bol bulunurlar ve atmosferik CO₂ miktarı ve dolayısıyla küresel ısınma ile alakalı oldukları düşünülmektedir [15]. *Methanosarcina thermophila*'dan, kırmızı alg olan *Porphyridium purpureum* ve dikotil bir bitki olan *Pisum sativum*'dan CA izoenzimleri saflaştırılmıştır [32-34].

γ -Sınıf CA'ların ilk örneği, "Cam", metanojenik arkeon *Methanosarcina thermophila*' dan izole edilmiştir. Çinko ve yerdeğiştirmiş kobalt içeren Cam'in sülfat veya bikarbonat ile birlikte kristalizasyonu yapılmıştır [35]. Ayrıca *P. tricornutum* (UTEX642)' da bulunan β -sınıf CA' ya ek olarak diatomlarda iki yeni

intracellular CA belirlenmiştir. Bunlar *T. weissflogii*' den TWCA1 (δ -CA) ve CDCA1 (ζ -CA). TWCA1 metal merkezi α -CA' ninkine benzeyen ve in vivo Co metali, Zn ile yer değiştirebilir. CDCA1 (ζ -CA) ise kadmiyum içeren bir CA enzimidir. Bu enzimlerin fotosentez için inorganik karbon ihtiyaçlarına ve metalin yeterliliğine göre metal değişimi yapabildikleri bildirilmiştir [36] .

İnsanlardaki CA'nın tüm izoformları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca tavşan, rat, balık, maymun, deve kuşu, sığır CA'ları saflaştırılmış ve bu enzimlerin bazı özellikleri incelenmiştir [37-39].

1.3 Karbonik Anhidraz Ailesinin Sınıflandırılması

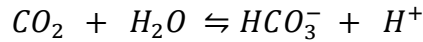
Meldrum & Roughton ve Stadie & O'Brien tarafından 1933' de karbonik anhidraz enziminin ilk keşfinden bu yana yapılan çalışmalar sonucunda söz konusu enzimin ökaryot ve prokaryotlarda yaygın bir şekilde bulunduğu ve literatürde α -, β -, γ -, δ -, ζ - ve η -CA olmak üzere birbirinden farklı 6 gen ailesi tarafından kodlandığı görülmektedir. Bu sınıfların önemli bölgelerinde aminoasitlerinin farklı olması, katlanmalarının ve dolayısıyla yapılarının da farklı olmasına sebep olmaktadır. Ancak aktif bölgelerinde Zn^{2+} atomu içermesi ve reaksiyon mekanizmasının aynı olması son derece ilginçtir [40, 41]. Farklı sınıfları arasında önemli bir dizi benzerliğinin olmaması özelliği ile karbonik anhidraz ailesi katalitik fonksiyonun yakınsak evrimine çok iyi bir örnek teşkil etmektedir [40].

1.3.1 α -Sınıfı CA

Şu ana kadar memelilerde moleküler özellikleri, oligomerik düzenlenmeleri, ekspresyon seviyeleri, hücresel lokalizasyonu, doku dağılımı, katalitik aktivite ve çeşitli inhibitör sınıflarına verdikleri tepkiler yönünden farklılık gösteren 16 farklı α -

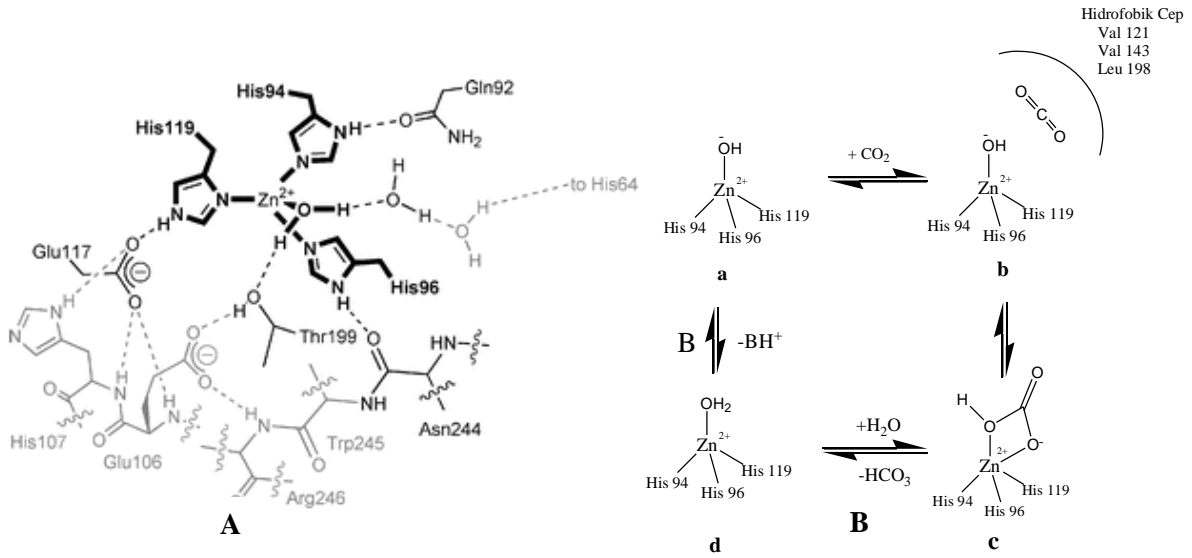
CA izoenzimi veya CA-ilişkili protein (CARP) saptanmıştır. Beş sitozolik formu (CA I, II, III, VII ve XIII), beş tane membran bağlı (CA IV, IX, XII, XIV ve XV), iki mitokondriyal form (CA VA ve VB) ve bir salgı CA izoenzimi CA VI (tükürük ve sütte) vardır [13]. Sitozolik CA I, II, III, VII, ve XIII ve mitokondrial CA VA ve VB sadece CA domaini; membrana bağlı CA IV, IX, XII, ve XIV transmembran bağlantısı, CA IV hariç ayrıca sitoplazmik kuyruk, CA IX ise N-terminal proteoglikan benzer domain içeren tek izozimdir; CA VI salgılanır ve kısa bir C-terminal uzantısı içerir. Ayrıca çekirdekte bir tane NonO/p54^{nrb} formu tespit edilmiştir [14]. Ek olarak CA gen ailesine ait olan üç tane CA-ilişkili protein (CARP) vardır [11, 42]. Aslında, bunlardan bazıları (CA I ve II gibi) oldukça yaygındır ve bu sebeple de bazı hastalıkların tedavisinde inhibitörler için hedef olmaktadır. Ancak bazı durumlarda da inhibisyonundan kaçınılmalıdır (örneğin, tümörlerde CA IX ve XII' nin inhibisyonu gerektiğinde CA I, II, VA, ve VB' nin aktivitesini etkilemeyen bir inhibitör seçilmesi gerekmektedir) [43].

Karbonik anhidraz aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



Metal iyon (tüm α -CA' larda Zn^{2+}) kataliz için önemlidir. X-ray kristallografik veriler, metal iyonun aktif bölgenin 15°A derinliğinde bulunduğunu ve enzimatik olarak aktif olan bütün CA' larda üç histidin rezidüsü (H94, H96 ve H119) ve bir su molekülü/hidroksit iyonu ile koordine olduğunu göstermiştir (Şekil 1.2A) [15, 44]. Histidin gruplarının, His64, His4, His3, His17, His15 and His10' i de içeren, aktif bölge ve çevresi arasında proton mekiğine katıldığı da kanıtlanmıştır. Gln92 ve Phe131 ise çoğu sulfonamid/sülfamat inhibitörlerini bağlamada önemlidir [11, 13]. Aktif merkezde Zn^{2+} iyonu ile koordine olan su, aynı zamanda Thr199'un hidroksil kısmı ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Thr199, Glu106'nın karboksilat kısmı ile de bağı olması dikkat çekicidir. Bu etkileşimler Zn^{2+} ile koordine olan su molekülünün nükleofil karakterini artırdığı gibi substratı (CO_2), nükleofil atak için uygun konuma yönlendirmesi de önemlidir. Zn^{2+} ya bağı enzim aktif formu baziktir(a). Bu güçlü nükleofil, hidrofobik cepte komşularıyla bağı bulunan CO_2

molekülüne saldırarak (b) Zn^{2+} ile koordine bikarbonatın oluşumuna yol açar (c). Daha sonra bikarbonat iyonu su molekülü ile yer değiştirerek çözeltiliye geçer, enzim su molekülünün Zn^{2+} iyonu ile koordine olduğu katalitik olarak inaktif asidik formuna döner (Şekil 1.2B) [44].



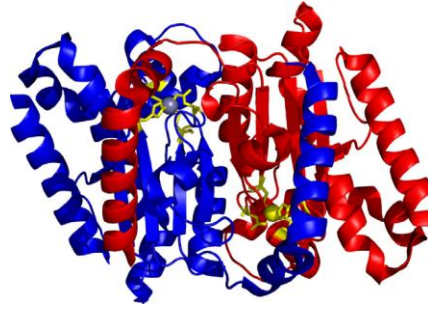
Şekil 1.2. α-CA II izoenzimi; A. aktif bölge, B. reaksiyon mekanizması [44]

C. reinhardtii periplazmik CA'sının iki tane 37 kDa ve iki tane 4 kDa'dan oluşan bir heterotetramer olmasına rağmen, çoğu α-CA'lar yaklaşık 30 kDa molekül ağırlığına sahip monomerler olarak aktiftirler. α-CA'lar aynı zamanda öbakteriler, algler ve yüksek bitkilerde de bulunmuştur. Örneğin, söz konusu izoenzimler bir tane siyanobakteride, üç tane yeşil alg *C.reinhardtii* ve *Dunaliella salina*'da tespit edilmiştir [45-47]. α-CA' lar *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae* gibi patojenik organizmalardan da klonlanmış ve karakterize edilmiştir [48-50].

1.3.2 β -Sınıfı CA

α -CA' ların aksine, β -CA' lar bakterilerde daha yaygın olarak bulunurlar[51]. Çoğu bakteriler, bazı archaealar, protozoan, funguslar, algler ve yüksek bitkilerin kloroplastları β -sınıfına ait olan CA'ları ihtiva eder. Ancak son zamanlarda böcek *Drosophila melanogaster* ve kurtçuk *Caenorhabditis elegans* gibi iki omurgasız türde β -CA bulunduğu bildirilmiştir [52]. Ayrıca yeşil alg *C. Reinhardtii* mitokondrisinde β -CA keşfedilmiştir. Bazı prokaryotlar çoklu β -sınıfı CA dizisi içerirler (bkz. EK A, Tablo A1.). Örneğin, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *E. coli*, *Mycobacterium avium*, *Streptomyces coelicolor*, *Synechocystis sp. 6803* soyu ve *Y. Pestis*' in her biri iki dizi içerirken, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, ve *Pseudomonas aeruginosa* üç dizi içerir. Bu çoklu genlerin fizyolojik önemi bilinmemesine rağmen, insan izoenzimlerinde olduğu gibi karbonik anhidrazların çoklu fonksiyonları gerçekleştirmek için birçok enzime ihtiyaç duyduğu varsayılabilir [40].

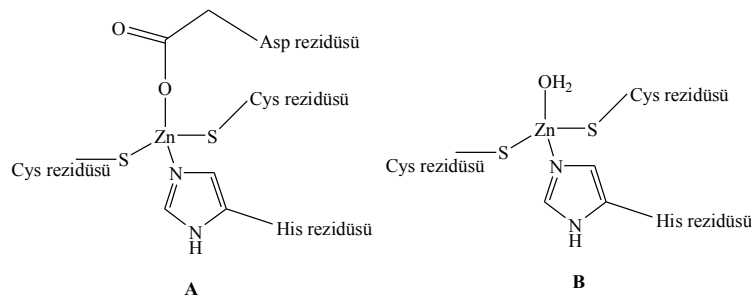
Bu enzimler ile α -CA'ların arasındaki en önemli fark, β -CA'ları genellikle 25-30 kDa molekül ağırlığına sahip 2-6 kadar monomerlerden oluşan oligomerlerdir. Bu iki sınıf arasındaki diğer bir önemli farklılık ise aktif bölgedeki çinko iyonuna bağlanmak için kullanılan amino asit rezüdüleridir [53]. İncelenen bazı β -CA'ların (*E. coli*, *H. influenza* [54], *M. tuberculosis* [7, 8], *Sordaria macrospora* [55], *Neisseria gonorrhoeae* [56] ve bir *S. enterica* (stCA 1) [5]). X-ray yapıları belirlenmiştir. Bu enzimlerin üç boyutlu katlanmaları korunmuştur ve Şekil 1.3.'de gösterilen *S. enterica* (stCA 1) β -CA'nıninkine benzerdir. Uzun kanallardan oluşan iki aktif bölgenin derinliklerinde bulunan katalitik çinko iyonunun Cys42, Asp44, His98, ve Cys101 ile tetrahedral geometride koordine olduğu saptanmıştır [8, 57].



Şekil 1.3. Dimerik stCA 1' in X-ray kristalografik görünümü. Monomerlerden biri kırmızı diğeri ise mavi ribbon olarak gösterilmiştir. Zn(II) iyonu (sarı toplar) ve ligandlar (Cys42, Asp44, His 98 ve Cys101) sarı çubuk şeklinde gösterilmiştir. İki aktif site özdeş ve derinliklerindeki uzun kanalda Zn(II) iyonu tetrahedral geometride bulunmaktadır ("kapalı" aktif bölge)[57].

α -CA'ların aksine, kırmızı alg *P.purpureum* β -CA'sı ve *P.sativum* kloroplast β -CA'sında çinko iyonunun iki sistein ve bir histidin rezidüsü ile koordine edildiği bulunmuştur (Şekil 1.4). Bu, bütün β -CA dizi analizleri arasında dizi analizi homolojisine dayalı tahminler ile örtüşmektedir. Polipeptid zincir katlanmaları ve aktif bölge yapısı α -CA'lardan farklı olduğu açıkça görülmektedir [58].

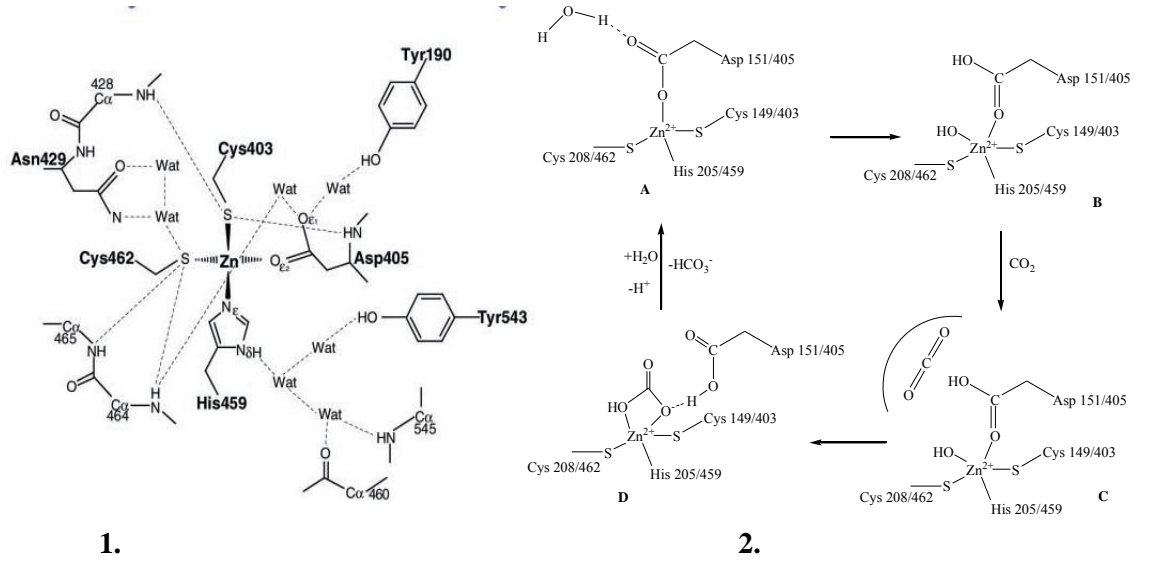
β -CA'ların *P.purpureum* gibi bazı üyelerinde çinko iyonu dördüncü koordinasyonunu aspartat rezidüsü ile gerçekleştirirken, *P.sativum* kloroplast β -CA'nın α -CA'lardaki gibi çinko iyonunu dördüncü koordinasyonu su ile gerçekleştirdiği görülmektedir.



Şekil 1.4 β -CA'ların Zn(II) koordinasyonunun gösterimi: **A:** *P.purpureum* ve *E.coli*, **B:** *P.sativum* kloroplast ve *M. thermoautotrophicum* enzimi [15].

P. purpureum CA' sı için yapılan X-ray kristalografik analizlere göre, söz konusu enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko iyonu Cys403' un S- γ atomu, His459' un ϵ 2-N atomu, Cys462' nin S- γ atomu ve Asp405' in O- γ 2 atomu ile

tetrahedral geometride koordine. Su molekülü çinko iyonuna doğrudan bağlı olmamasına karşılık Asp405' e ait oksijen atomuyla hidrojen bağı oluşturmaktadır (Şekil 1.5.1 ve 2B). Proton transfer reaksiyonu aspartat rezidüsünün karboksil kısmı ile koordine su molekülünün daha sonra çinko iyonu ile trigonal bipiramid geometrisinde koordine olacak olan hidroksit iyonunun oluşması vasıtasıyla meydana gelmektedir (Şekil 1.5, 2B). Bu nedenle güçlü nükleofil enzimin hidrofobik cebinde bulunan CO₂' ye saldırarak (Şekil 1.5, 2C) çinko iyonuna bağlı bikarbonat oluşur (Şekil 1.5, 2D). Bu ara reaksiyon α-CA' nın katalitik döngüsüne benzese de (Şekil 1.5, 2C), β-sınıfı enzim başlangıçta çinko iyonuna aspartat rezidüsünün bağlı olması ile farklılık göstermektedir [15].



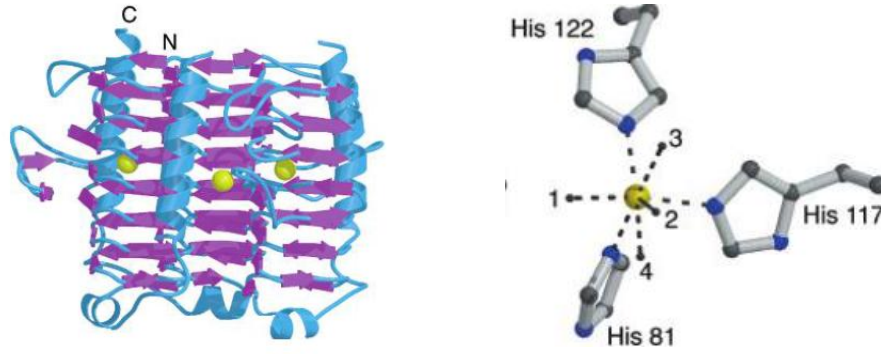
Şekil 1.5 Prokaryotik β-CA'lar için önerilen katalitik mekanizma (*P.purpureum* enzim numaralandırması [15, 58]).

1.3.3 γ-Sınıfı CA

γ-sınıfı CA ilk olarak *Methanosarcina thermophila*' da (Cam) keşfedilmiştir. Bu trimerik molekül α-sınıfı CA'dan tamamen farklı katlanma göstermektedir. γ-sınıfı CA' ların prokaryotlarda bulunmasına rağmen ökaryotlarda bulunmaması da

oldukça ilginçtir. Bazı γ -CA'lar Zn^{2+} iyonu içerdiği gibi, bazılarının da kobalt (Co) içerdiği saptanmıştır [40, 59].

Methanosarcina thermophila'da metal iyonunu koordine eden histidin rezidülerinin iki tanesi (His81 ve His122) bir monomere aittir (Monomer A), diğer üçüncüsü ise (His117) bir başka monomere aittir (Monomer B). Böylece, üç aktif bölge, monomer çiftleri arasındaki arayüzeyde lokalize olmaktadır (Şekil 1.6). Ayrıca aktif bölgede çinko iyonu ek su molekülleriyle de koordine oldukları için Zn-içeren Cam için koordinasyon geometrisi trigonal bipiramid iken, Co-içeren Cam için oktahedraldir. Katalitik mekanizması α -sınıfı CA'ların mekanizmasına benzer olduğu belirlenmiştir [35].



Şekil 1.6. **A**, *Methanosarcina thermophila* CA'sı, 69 kDa (homotrimer); **B**, γ -CA'nın aktif bölgesinde metal ligasyonu[35].

1.3.4 δ -Sınıfı CA

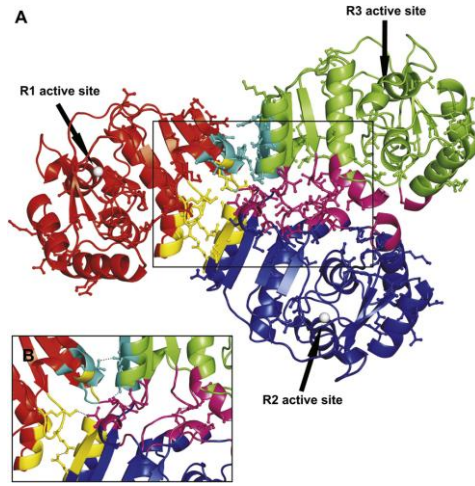
δ -Sınıfı en az araştırılan CA sınıfıdır. Aslında sadece X-ray Kristal yapısı aydınlatılmadığı gibi kinetik veya inhibisyon verileri de detaylı olarak aydınlatılmamıştır. Son zamanlarda marin diatom *Thalassiosira weissflogii*'den δ -

CA (TweCA veya TWCA1 olarak adlandırılmaktadır) klonlanmış karakterize edilmiş ve bazı anyon ve sulfonamid inhibisyon çalışmaları yapılmıştır [60, 61].

Morel ve ark., bu enzimin α -sınıfı memeli CA'sına benzediğini göstermiştir. Aslında δ -CA'nın katalitik olarak önemli olan Zn(II) iyonunun üç histidin ve bir su molekülüyle 2 Å mesafede koordine gibi görünmektedir. TWCA1 diğer bilinen CA'lar ile hiçbir dizi homolojisi olmayan yaklaşık 27 kDa'lık bir proteindir. TWCA1 enzimi düşük pCO₂ ile düzenlenir ve sınırlı Zn(II) iyonu koşulları altında, aktif bölgedeki çinko iyonu Co (II) iyonu ile *in vivo* yer değiştirebildiği saptanmıştır. δ -CA'ların haptotitler, dinoflagellatlar, diatomlar ve klorofitik prasinoitleri de içeren marin fitoplanktonda yaygın olarak bulunmasına rağmen, bu enzim hakkında detaylı bilgi henüz bulunmamaktadır [60, 62].

1.3.5 ζ -Sınıfı CA

ζ -sınıfı CA enzimi ilk olarak *Thalassiosira weissflogii*'den (CDCA1 olarak adlandırılmaktadır) karakterize edilmiştir. Ayrıca CDCA1, Cd(II) içeren CA enzimine ilk örnektir ve yaklaşık 69 kDa'lık bir aktif enzimi oluşturan üç benzer tekrardan (R1, R2, R3) oluşmaktadır (Şekil 1.7). Her iki tekrarda da, CDCA1-R1 ve CDCA1-R2, iki sistein, bir histidin rezidüsü ve bir su molekülüyle sıkı bir şekilde tetrahedral geometride koordine olmuş metal iyonu aktif bölgenin huni şeklindeki cebinin derinliklerinde lokalize olmuştur. İyonların bulunabilirliğine bağlı olarak aktif bölgesinde fonksiyonel olarak Cd(II) veya Zn(II) iyonlarını kullanabilmesinden dolayı, CDCA1 kambialistik (çoklu veya değişik metal bağlayıcı) enzim olarak sınıflandırılmaktadır. Yapılan kinetik çalışmalar enzimin hem Cd(II) hem de Zn(II) iyonuyla yüksek CA aktivitesi sergilemesine rağmen, çinko ile biraz daha yüksek katalitik etki sergilediğini göstermiştir [60, 62].



Şekil 1.7 (A) CDCA1 Enziminin yapısı. R1, R2 ve R3 tekrarları sırasıyla kırmızı, mavi, ve yeşil renkte gösterilmiştir. Ara yüzey bölgeler sarı (R1-R2), macenta (R2-R3) ve açık mavi (R1-R3). Üç aktif bölge oklarla gösterilirken, korunmamış rezidüler top ve çubuk şeklinde gösterilmiştir. (B) arayüzey hidrojen bağına katılan rezidülerin büyütülmesi (top ve çubuk şeklinde)[62].

1.3.6 η -Sınıfı CA

Supuran ve ark., çok kısa bir süre önce patojen malaria Plasmodium falciparum' dan yeni bir CA üyesi keşfettiler ve bu yeni sınıf η -sınıfı olarak adlandırıldı. α -, γ - ve δ - sınıfı gibi, η -sınıfı üç histidin rezidüsü ve bir katalitik su molekülüyle koordine Zn(II) iyonu içerdiği düşünülmektedir. Bu sınıf α -sınıfına benzese de bazı açılardan farklılıkları vardır: (i) η -sınıfı için öngörülen aktif bölgedeki çinko iyonu ile koordine histidin rezidülerinin koordinasyonu x , $X+2$, $X+24$ iken α -sınıfında x , $x + 2$, $x + 25$ pozisyonundadır (X , proteinin amino asit dizisinde ilk koordine histidin rezidüsünün pozisyonunu göstermektedir, örneğin insan CA' sında $X=94$); (İİ) proton mekik rezidüsü (His64) ve bekçi (gatekeeper) rezidüsü Glu106 ve Thr199, tüm α -CA'larda korunmasına rağmen, bulunmamaktadır [10].

Ayrıca η -CA enzimi, α -CA' ya kıyasla (260-280 amino asit rezidüsünden oluşan polipeptid zinciri) oldukça fazla sayıda amino asit rezidüsünden (600 amino asit rezidüsünden oluşan polipeptid zinciri) oluşmaktadır [10, 63].

1.4 Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Fonksiyonları

CA izoenzimlerinin farklı dokularda bulunması sonucu dokular ve akciğer metabolizması arasında CO₂/bikarbonat transportu ve solunum, pH ve CO₂ homeostasisi, çeşitli doku/organlarda elektrolit salınımı, biyosentetik reaksiyonlar (glukoneogenez, lipogenez ve ürojenez gibi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve pek çok diğer fizyolojik ve patolojik süreçler ile ilgili önemli fizyolojik olaylarla bağlantılıdır (Tablo 1.1) [15]. Çeşitli fizyolojik süreçlerdeki bu önemli rolleri ve farklı insan hastalıklarıyla ilişkisinde görülen anormal aktivite seviyeleri CA' ları biyomedikal uygulamalarda inhibitör veya aktivatör dizaynı için önemli bir hedef haline gelmişlerdir [13]. Ayrıca çeşitli aktivatörlerle CA aktivasyonu da gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu bileşikler Alzheimers' hastalığı, yaşlanma, öğrenme ve hafıza kaybıyla ilişkili durumlarda farmakolojik ajan olarak önemlidir [16].

CA I çoğu dokuda bulunmaktadır, ancak Feener'in grubunun [64] seminal çalışması bu enzimin retinal ve serebral ödemde bulunduğunu ve inhibisyonunun bu koşullarla mücadele için önemli bir araç olacağını göstermiştir. İnsan CA II çoğu hücrelerde bulunmasına karşın, insan CA I eritrositlere spesifiktir. CA II'nin kalıtsal eksikliği, kemiklerde kalsiyum emilimindeki başarısızlık ve diğer dokulardaki kalsifikasyon sonucu meydana gelen osteopetroz (Albert-Schonberg hastalığı) ile ilişkilidir. CA II ayrıca glokoma, ödem, epilepsi ve yükseklik hastalığı ile ilişkilidir [13]. Çoğu inflamatör hastalığı karakterize eden CA III' ün oksidatif stresle ilişkili olması özelliği onun CO₂ hidrataz aktivitesinden mi (ki oldukça düşüktür) yoksa bu proteinin antioksidan etkisinden sorumlu olan ve yüzeyinde bulunan Cys rezidülerinin varlığından mı ya da farklı bir enzimatik aktivite gibi diğer enzim özelliklerinden mi kaynaklandığı henüz anlaşılammıştır [65, 66]. CA IV, glokoma (CA II ve XII ile birlikte), pigmenter retinopati (tavuk karası) ve felci de içeren bir çok patolojik süreç için hedef olmaktadır [67-69].

Mitokondrial izoform VA ve VB ürojenez, glukoneogenez ve lipogenez gibi biyosentetik süreçlerde rol oynar ve obezite ile ilişkili iken [13]; CA VI kariyogenez

ile ilişkilidir[70]. CA VII, CA II ve XIV ile birlikte epileptiform aktivitesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir [71]. CA VIII nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. CA8 geni insanlarda ataksi, hafif mental retardasyon ve dört ayaklı yürüyüş ve faredelerde de yaşam boyu yürüyüş bozukluğu ile ilgili olduğundan CA VIII' in beyinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir [72, 73]. Ayrıca kolorektal (kalın bağırsak) ve akciğer kanserinin gelişimi ile ve aşırı ekspresyonunun da diğer kanser türleriyle de ilişkili olduğu bulunmuştur [13]. Ancak diğer katalitik olmayan iki izoform CA X ve XI' in insan patolojisi veya omurgalılardaki fizyolojik fonksiyonu hakkında henüz pek bir şey bilinmemektedir. CA IX ve XII antikanser ilaç dizaynı için oldukça fazla çalışılmıştır.

CA IX hipoksik tümör türlerinin çoğunda hastalığın ilerleyişi için bir markerdir ve inhibisyonunun tümörün ve metastazın inhibisyonunda önemli rol oynadığı görülmektedir. Ayrıca CAI' lar hipoksik tümör görüntülenmesi için oldukça kullanışlı olabilirler. CA XII daha az araştırılmasına rağmen esasen o da bir antitümör hedefidir [74]. CA XIII' ün sperm motilite süreci ile ilişkili olduğu (muhtemelen XIV ile birlikte) ve inhibisyonunun kontraseptif ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. CA XIV, CAIV' e benzer şekilde epileptogenez ve bazı retinopati türleri ile ilişkiidir [13].

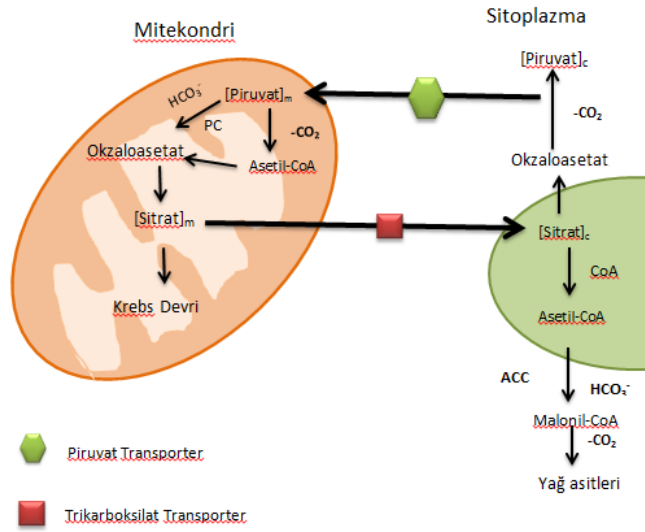
I, II ve IV. izoenzimler solunum ve asit-baz homeostasisinin düzenlenmesinde görev alır. Bu kompleks süreç CO_2/HCO_3^- 'ün metabolize olduğu dokular ile boşaltım bölgeleri arasında taşınmasını içerir (akciğer, böbrekler). Kılcal damarlar ve pulmoner mikrovaskülerde CO_2 eliminasyonunun kolaylaştırılmasında, böbreklerde bikarbonatın geri emilimini ve H^+ iyonlarının renal tübüllerde ve damarlarda eliminasyonunu sağlar [44].

Tablo 1.1 Memeli α -CA izoenzimlerinin organ/doku dağılımı, hücrel lokalizasyonu, CO₂ hidrataz aktivitesi ve sülfonamidlere afinitesi

	Organ ve doku dağılımı	Hücrel lokalizasyonu	Katalitik aktivite	Sülfonamidlere afinitesi	Hastalıklarla ilişkisi
CA I	Eritrositler, göz, sindirim yolu	Sitoplazma	Düşük(CA II'nin %10'u)	Orta	Retinal/serebral ödem
CA II	Eritrositler, göz, sindirim yolu Kemik osteoklastı, böbrek, akciğer, testis, beyin	Sitoplazma	Yüksek	Çok yüksek	Glokom, ödem, epilepsi, yükseklik hastalığı
CA III	İskelet kası, adipoz doku	Sitoplazma	Çok düşük	Çok düşük	Oksidatif stres
CA IV	Böbrek, akciğer, pankreas, beyin kapileri, bağırsak, kalp kası, göz	Membrana bağlı	Yüksek	Yüksek	Glokom, tavuk karası, felç
CA VA	Karaciğer	Mitokondri	Orta derece – Yüksek*	Yüksek	Obezite
CA VB	Kalp ve iskelet kası, pankreas, böbrek, spinal kord, sindirim borusu	Mitokondri	Yüksek	Yüksek	
CA VI	Tükrük ve süt bezleri	Tükrük/süt'te salgı	Orta derece	Yüksek	Karyojenez
CA VII	Merkezi sinir sistemi	Sitoplazma	Yüksek	Çok yüksek	Epilepsi
CARP VIII	Merkezi sinir sistemi	Sitoplazma	Akatalitik	‡	Nörodejenerasyon, Kanser
CA IX	Tümörler, gastrointestinal mukoza	Transmembran	Orta derece	Yüksek	Kanser
CARP X	Merkezi sinir sistemi	Sitoplazma	Akatalitik	‡	
CARP XI	Merkezi sinir sistemi	Sitoplazma	Akatalitik	‡	Kanser, glokom
CA XII	Böbrek, bağırsak, kidneye, intestine, üreme epitelyumu, göz, tümör	Transmembran	Düşük	Yüksek	Kısırlık
CA XIII	Bağırsak, beyin, akciğer, gut, dalak, yumurtalık, testis, kolon timüs, ince bağırsak,	Sitoplazma	Orta derece	Orta - Yüksek	Epilepsy, retinopati
CA XIV	Böbrek, beyin, karaciğer, göz	Transmembran	Düşük	Yüksek	Epilepsi, retinopati
CA XV		Membrana bağlı	Düşük	Bilinmiyor	

* pH 7,4'te orta derece, pH 8,2 veya daha yüksekte yüksek aktivite. ‡ doğal CARP proteinleri Zn(II) içermezler, bundan dolayı onların sülfonamidlere karşı afiniteleri ölçülemediği için.

Mitokondrial izoform VA ve VB üregenez, glukoneogenez ve lipogenez gibi biyosentetik süreçlerde rol oynar. Piruvat karboksilaz (PC), asetil CoA karboksilaz (ACC) ve karbamoil fosfat sentetaz I ve II' nin dahil olduğu biyosentetik süreçlerde, yeterli miktarda substrat, bikarbonat, muhtemelen izoenzim CA II' nin yüksek aktivitesi yardımıyla mitokondrial izoenzim CA VA ve VB' nin dahil olduğu katalitik reaksiyonlar sayesinde karşılanmaktadır (Şekil 1.8) [44].



Şekil 1.8. Yağ asidi biyosentezi ve Karbonik anhidraz izoenzimlerinin rolü [44].

Ökaryotik ve prokaryotik genomların dizilenmesi sonucu malarya, tüberküloz ve diğer bakteriel ve fungal enfeksiyona sebep olan patojenlerin de CA içerdikleri bulunmuştur. Yapılan inhibisyon çalışmaları CA' nın bu patojenlerin büyümesi ve virulans özelliği için önemli olduğunu göstermiştir [40].

1.5 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

50 yılı aşkın süredir diüretik ve sistematik olarak glukoma ilacı olarak rol oynayan sülfonamidler (RSO_2NH_2) klasik CA inhibitörleridir (CAI) [11]. Aslında sülfonamid veya sülfamat sınıfına ait klinik olarak kullanılan 30 civarında ilaç önemli ölçüde CA inhibitör aktivitesi göstermektedir [44]. Bununla birlikte, son yıllarda literatürde bildirildiği gibi sülfonamid/sülfamat CAI'lar antikonvulsant, antiobezite, antikanser, ağrı kesici, antiinfektif ilaç olarak potansiyele sahiptir [75]. Farklı CA izoenzimlerinin farklı biyolojik tepkileri ve farklı inhibisyon profilleri CAI'ların diüretik, antikanser, antiobezite ve antiepileptik ilaçlar olarak klinik uygulamalar için potansiyel olmalarını açıklamaktadır [44].

Karbonik anhidraz inhibitörleri göz hastalıkları alanında kullanılan göz içi basıncını (GİB) düşürücü etkisi en kuvvetli ilaçlar arasındadır. Günümüzde GİB'ını düşürmek için topikal ve sistemik olmak üzere iki formda kullanılmaktadırlar. Bir sistemik CAI olan asetazolamid (AAZ), ilk olarak 1954 yılında Becker, Grant, Trotter, Breinin ve Gürtz tarafından glokomlu olgularda GİB'ını düşürmek amacı ile kullanılmıştır. 1995 yılında ise topikal formu olan dorzolamidin GİB'ını düşürmek için kullanımı FDA (Food and Drug Administration of United States) tarafından onaylanmıştır. Bunu takiben, 1998 yılında bir başka topikal CAI olan brinzolamid kullanım alanına girmiştir. Avrupa Glokom Cemiyeti, topikal CAI'lerini glokomun 1. basamak tedavisinde kullanılabilecek ilaçlar arasında göstermektedir [76, 77].

Asetazolamid (AAZ), metazolamid (MZA), etokzolamid (EZA) ve diklorofenamid (DCP) klasik olarak antiglokoma rolu oynayan CA inhibitörleridir [11]. Dorzolamid (DZA) ve brinzolamid (BRZ) bölgesel-rol oynayan antiglokoma ajanı, benzolamid (BZA) bu farmakolojik ajanların bu sınıfına ait bir yetim ilaç iken topiramet (TPM), zonisamid (ZNS) ve sulthiam (SLT) ise yaygın bir şekilde kullanılan antiepileptik ilaçlardır [11, 44]. Sulpirid (SLP) ve indisulam (IND), "siklooksijenaz 2, COX2" inhibitörü Selekoksisib (CLX) ve valdekoksik (VLX) ile

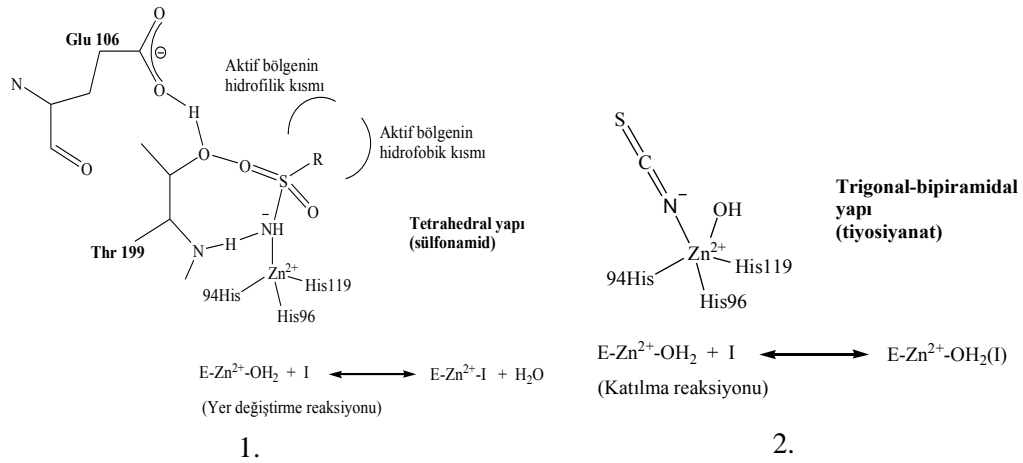
birlikte bu sınıf farmakolojik ajanlardır. Tatlandırıcı olan sakkarin ve bir diuretik olan hidroklorotiazid (HCT) de karbonik anhidraz inhibitörü olarak rol oynamaktadır.

Tumor ilişkili izoformları (CA IX ve XII) hedef alan spesifik bileşikler son yıllarda rapor edilmiştir: (i) floresan sülfonamidler tumor asidifikasyonunda CAIX' un rolünü belirlemek için kullanılmıştır [43]; (ii) pozitif veya negatif yüklü bileşikler plazma membranını geçemedikleri için sadece CA IX ve CA XII gibi ekstrasellular izoenzimleri inhibe ederler [78]; (iii) inaktif ön ilacı aktif CAI'ya dönüştürmek için hipoksik tumor koşullarının azalmasından istifade eden hipoksiya-aktifleştirici bileşikler [11]; (iv) yüksek hidrofilik karakterlerinden dolayı membranı geçemeyen ve böylece CA IX ve XII gibi ekstrasellüler izoformlara afinitesi yüksek olan şeker içeren sülfonamidler/sülfomatlar/sülfamidler[79]; (v) CAI ile kaplanmış nanopartiküller [44]; (vi) fenoller, protein tirozin kinaz inhibitörleri, kumarinler, fullerenler gibi sülfonamid ve onun biyoesterlerinden farklı diğer kemotipler [80-82].

Sülfonamidler ve biyoesterleri en çok araştırılan karbonik anhidraz inhibitörleridir. Bununla birlikte inorganik metal kompleksleyici anyonlar ve karboksilatlar gibi daha kompleks anyonlar da CA inhibitörleri olarak bilinmektedirler, ancak sülfonamidlere kıyasla daha az etkilidirler [8, 83]. Geçmiş yıllarda anyon inhibitörler büyük önem kazanmıştır ve tüm katalitik olarak aktif memeli izoformlarının inhibisyonu için hem organik hem de inorganik anyonlar araştırılmıştır. Bakteriyel CA'lar ise yeni antiinfektif ilaç olarak öncü bileşiklerin keşfi için CAI olarak ancak son yıllarda bu çalışmalara dahil olmuştur [8, 83, 84].

1.5.1 Karbonik anhidrazın inhibisyonunun mekanizması

CA inhibitörlerinin en çok çalışılan iki sınıfı: metal ile kompleks oluşturan anyonlar (Şekil 1.9-1) ve aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir (Şekil 1.9-2). Enzimin aktif bölgesindeki Zn (II) iyonu üç histidin rezidüsü (nötral ligand) ve dördüncü ligand olarak da su molekülü/hidroksit iyonu ile koordine olduğundan, metal iyonu üzerindeki net pozitif yük anyonların bağlanması için ilk itici gücü oluşturur [83]. Farklı anyonik inhibitörlerin bağlanmalarındaki farklılığın, bu anyonların kimyasal özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [85].



Şekil 1.9 Karbonik anhidrazın 1. Sülfonamid inhibitörü ile [11], 2. anyonik inhibitör ile [83] inhibisyonunun mekanizması.

En önemli CA inhibitörü olan sülfonamidler, çinko iyonuna tetrahedral geometride bağlanırlar. Sülfonamidin azot atomu Zn^{2+} iyonu ile koordine olur. Ayrıca Thr 199 ve Glu 106 rezidüleri hidrojen bağları ile inhibitörün metal iyonuna bağlanmasına katılırlar. İnhibitörün bağlanmasına bir diğer katkı, aromatik/heteroaromatik kısmın aktif bölgenin hidrofilik ve hidrofobik rezidüleri ile etkileşimi sonucu sağlanır (Şekil 1.9-2). Anyonlar metal iyonunun hem tetrahedral geometrisinde hem de trigonal-bipiramidal şekilde bağlanabilirler [11].

1.6 Çalışmanın Amacı

Antibiyotikler tüm dünyada en çok kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Ne yazık ki bu denli sık kullanılan ve maliyeti oldukça yüksek olan bu ilaçların yanlış kullanımı, tedavi başarısızlığı, mortalite, maliyet ve antibiyotiğe direncin artmasına sebep olmakta ve aynı zamanda da ülke ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir. Antibiyotiğe direncin artışı ile son yıllarda yapılan çalışmalar klinik olarak kullanılan antibiyotiklerin direnç problemi olmaksızın, antibakteriyel ilaç tasarımı için fizyolojik açıdan önemli süreçleri katalizleyen bakteriyel CA' ların inhibisyonunun bakteriyel büyümeyi engellediğini göstermiştir.

Bu amaçla, dış çürüğünden birincil derecede sorumlu olan *Streptococcus mutans* bakterisinin β -CA enzimini kodlayan genin genomik DNA' dan çoğaltılması planlanmıştır. Söz konusu gen vektor içine klonlanıp *E.coli* içerisine transforme edilerek burada ekspresyonu gerçekleştirilerek, yüksek oranda saflaştırıldıktan sonra katalitik aktivitesi ve bazı sülfonamidlere karşı ilgisi araştırılacaktır.

Elde edilecek sonuçların söz konusu β -CA'nın kinetik mekanizmasına önemli katkılar sağlayacağı gibi diğer β -CA'larla karşılaştırma olanağı da sağlayacaktır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 MATERYAL

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Merck ve Sigma Aldrich' den temin edilmiştir. Moleküler biyoloji materyalleri, kullanılan kimyasal ve enzimler Qiagene ve Fermentas MBI firmalarından temin edildi.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 2.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

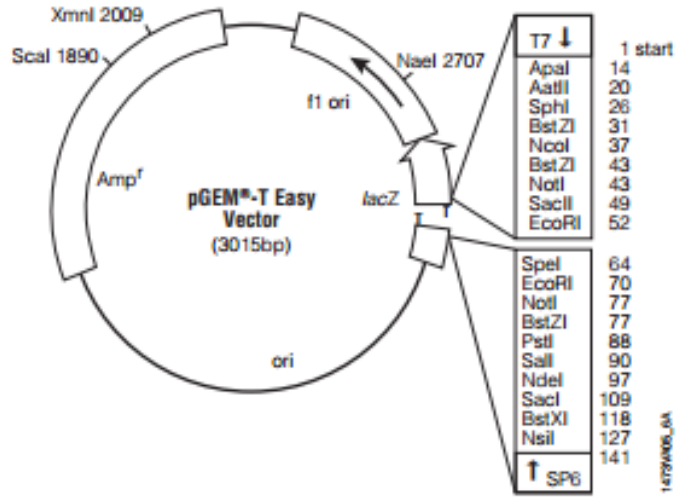
Kullanılan Gereç	Modeli
-80°C Derin dondurucu	Sanyo, Japonya
Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	She-Lab, USA
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye

Tablo 2.1: (devam)	
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
Isıtcılı blok	FALC, İtalya
UV visible Spektrofotometreler	Heios α (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Stop-Flow Kinetic Instrument	SX.18MV-R Applied Photophysics

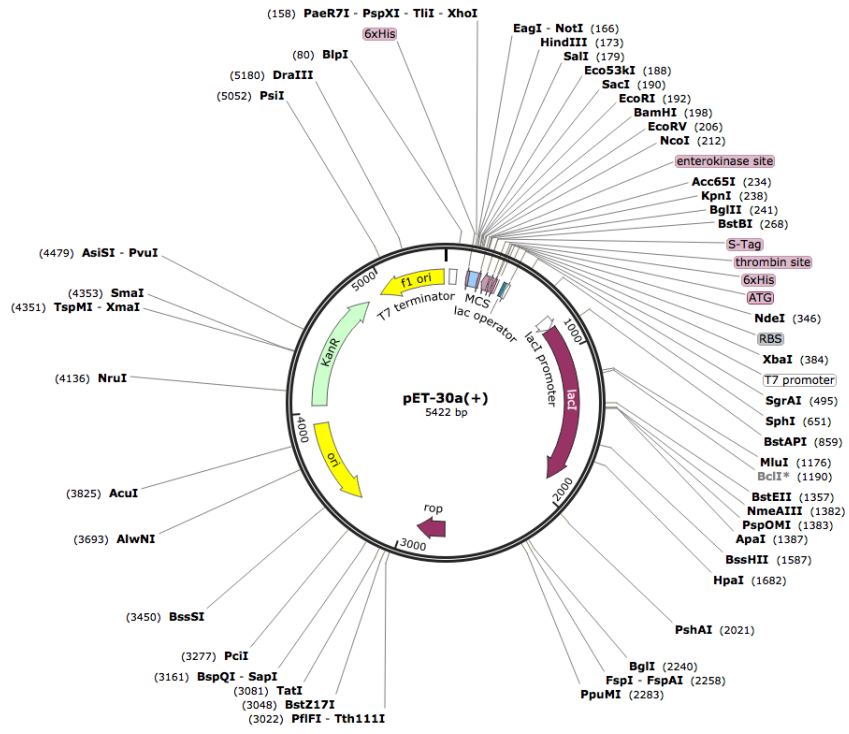
2.1.3 *Streptococcus mutans* Genomu, Bakteri Soyları ve Plazmidler

Çalışmada kullanılan *S. mutans* UA159 soyu genomik DNA'sı, Almanya RWTH Aachen University Hospital, Aachen, Prof. Georg Conrads tarafından temin edildi. Klonlama ve stok amaçlı DH10B *E.coli* soyu kullanıldı. Ekspresyon amaçlı çalışmada kullanılan bakteri soyu BL21(DE3) 'dır. Çalışmada PCR ürünlerinin klonlanması ve saklanması amacıyla pGEM-T Easy vektör sistemi kullanıldı. PCR ile çoğaltılan gen plazmide klonlanarak hücre içerisine transforme edildi. pGEM-T Easy vektörünün doğrusal olması ve uçlarında timin bazı bulunmasından dolayı herhangi bir kesime ihtiyaç duymadan, PCR ile çoğaltılan gen doğrudan vektöre klonlanmasını mümkün kılmaktadır.

Plazmid haritası Şekil 2.1 'de gösterildiği gibidir [86]. Ekspresyon amaçlı kullanılan plazmid pET30a(+)'dır [87]. pET30a vektörü His-tag bölgesi içerdiği için Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırmaya uygundur. Plazmit haritası Şekil 2.2 'de gösterildi.



Şekil 2. 1 pGEM-T Easy Vektör Haritası [86]



Şekil 2.2 pET30a(+) Vektör Haritası

2.1.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

2.1.4.1 *E.coli* için Bakteriyel Kültür ortamları

E.coli için gerekli kültür ortamını sağlamak amacıyla LB ve LB-agar kullanılmıştır. Toz halinde temin edilen bakteriyel medyumlar üretici firmanın belirttiği şekilde destile su ile hazırlanarak otoklav edildi ve kullanıldı.

2.1.4.2 Antibiyotik Hazırlanması

Kültürlerde kullanılan Ampisilin stokları 100 mg/ml ve Kanamisin stokları da 50 mg/ml olacak şekilde steril destile su ile hazırlandı ve sterilizasyonu için 0.22 mikronluk filtrelerden geçirilerek kullanıldı.

2.1.4.3 Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit

Plazmid DNA izolasyonu QIAprep Spin Mini Prep Kiti (Qiagen-Kat. No:27104) ile yapıldı.

2.1.4.4 Agaroz Jel Elektroforez Tamponu

1 litre 0.5X TBE tampon hazırlamak için 54 g Tris-base, 27.5 g borik asit, 20 mL 0.5 M EDTA 800 mL saf suda çözülerek pH 8' e ayarlandı. Son hacim 1 litre olacak şekilde saf su eklendikten sonra otoklavlandı.

2.1.4.5 Transformasyon için Kompetent Hücre Hazırlama Çözeltisi

Tablo 2. 2 Kompetent Hücre için Kullanılan Çözelti (DH10B *E.coli* soyu için)

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
CaCl ₂	100 mM
Gliserol	%40

Tablo 2. 3 Kompetent Hücre İçin Kullanılan Uygulama tamponu (BL21(DE3) *E.coli* soyu için)

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
CaCl ₂	100 mM
MnCl ₂	70 mM
Na ⁺ CH ₃ COO ⁻	40 mM
pH 5.5'e ayarlanır	

2.1.4.6 Protein Ekspresyonu ve Lizis İçin Kullanılan Tamponlar

Tablo 2. 4 Bakteri Yıkama tampon

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-baz	0.6 g
Destile su	100 mL'ye tamamlanır
Tris-baz 90mL destile suda çözülür. 1 M HCl ile pH'sı 7.6'ya ayarlanarak toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.	

Tablo 2. 5 Liziz Tamponu : 20mM Tris / 0,5mM EDTA / 0,5mM EGTA (pH:8,7)

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-baz	2.44 g
0.5 M EDTA	1.0 mL
0.5 M EGTA	1.0 mL
Destile su	1 L'ye tamamlanır.
Tris-baz, 0.5 M EDTA, 0.5 M EGTA 800 mL suda çözülür. 1M HCl ile pH'sı 8.7'ye ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır. +4° C'de saklanır.	

Tablo 2. 6 100mM PMSF (100X , PMSF Stok çözelti)

Kimyasal Madde	Miktar
PMSF	174.0 mg
2-propanol	10 mL
-20° C'de saklanır.	

2.1.4.7 Protein Saflaştırma Basamağı

Proteinin saflaştırılması için Qiagen 30210 Hilden, Germany Ni-NTA kolon saflaştırma protokolü takip edildi.

Tablo 2. 7 Liziz Tamponu; 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole

Kimyasal madde	Miktar (g)
NaH ₂ PO ₄	6.9 g
NaCl	17.54
İmidazol	0.68
50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol 800 mL suda çözülr. 1M NaOH ile pH'sı 8'e ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır. +4° C'de saklanır.	

Tablo 2. 8 Yıkama Tamponu; 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole

Kimyasal madde	Miktar (g)
NaH ₂ PO ₄	6.9
NaCl	17.54
İmidazol	1.36
50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol 800 mL suda çözülr. 1M NaOH ile pH'sı 8'e ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır. +4° C'de saklanır.	

Tablo 2. 9 Elüsyon Tamponu; 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole

Kimyasal madde	Miktar (g)
NaH ₂ PO ₄	6.9
NaCl	17.54
İmidazol	17
50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazol 800 mL suda çözülr. 1M NaOH ile pH'sı 8'e ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır. +4° C'de saklanır.	

2.1.4.8 Protonografi için kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

Jel Yıkama Tamponu: 10% izopropanol içeren 100mM Tris, pH 8.2

İndikatör Çözeltisi: 0.1% bromothymol blue içeren 100mM Tris pH 8.2

Doygun CO₂ Çözeltisi: 200 ml distile sudan yaklaşık olarak 3 saat CO₂ gazı geçirilerek elde edildi.

2.1.4.9 Hidratiz Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar

Stop-Flow ve Maren metodu için CO₂ çözeltisi: 20°C’de bidestile su içinden CO₂ gazı geçirilerek hazırlanır.

Stop-Flow Tampon çözeltisi: 0.01 M HEPES 4-(hidroksil etil)-1-Piperazinetansulfonik asit 0.01 M Tris[hidroksimetil]aminometan hidroklorür (TRIZMA HIDROKLORÜR), 0.1 M Na₂SO₄ son hacim 1 litre olacak şekilde bidestile saf suda çözünerek pH 7.4’ e ayarlandı.

Stop-Flow Fenol-red çözeltisi: 0.2 mM fenol red alınarak (pH 6.8-8.4) HEPES tamponu içerisine eklendi.

Stop-Flow Stok CA enzim çözeltisi: Saflaştırılmış SmuCA konsantrasyonu 1 x10⁻⁷ M olacak şekilde kullanıldı.

Stop-Flow Stok inhibitör çözeltileri: Stok inhibitör çözeltiler 1 M olarak hazırlandıktan sonra, 1x10⁻⁸, 1x10⁻⁷, 1x10⁻⁶, 1x10⁻⁵ ve 1x10⁻⁵ M olacak şekilde hazırlanarak kullanıldı.

2.1.4.10 SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Tamponlar

Tablo 2. 10 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

Kimyasal Madde	Miktar
0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)	2.5 mL
% 10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkapto etanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 g
Destile su	0.5 mL

Tablo 2. 1 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tampon

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-HCl	3.0 g
Glisin	14.4 g
SDS	1.0 g
Destile su ile son hacim 1L'ye tamamlanır	

Tablo 2.12 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı:

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

Tablo 2. 13 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi

Kimyasal Madde	Miktar
Coomassie brilliant blue R-250	0.66 g
Metanol	120 mL
Glasiyal asetik asit	24 mL
Destile su	120 mL

Tablo 2. 14 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile su

Kimyasal Madde	Miktar
Metanol	50 mL
Glasiyal asetik asit	75 mL
Destile su	875 mL

2.2 METOD

2.2.1 Cam ve Plastik Malzemelerin 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 edilerek kullanıldı.

2.2.2 DNA ile İlgili Teknikler

2.2.2.1 Primer Tasarımı

Primer tasarlanırken www.restrictionmapper.org , www.bioinformatics.org ve www.idtdna.com adreslerinde ilgili programlardan faydalanıldı. Primerler tasarlanırken çoğaltılacak genin ve genin klonlanacağı plazmidin içerisinde bulunmayan enzim kesim bölgeleri belirlendikten sonra, primerlerin kendi içerisinde saç tokası oluşturmamasına dikkat edildi. Primerleri kesen enzimlerin ortak çalıştıkları tampon seçilerek ve T_m sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına dikkat edildi. Primerlerin T_m değerinin hesaplanması için en yaygın kullanılan formül aşağıdaki gibidir [88-91].

$$T_m = [(A+T\text{'lerin sayısı})x2 + (G+C\text{'lerin sayısı})x4] \text{ } ^\circ\text{C}$$

2.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonüklotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanan bir yöntemdir. Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama olarak önemli üç aşamadan oluşur [88].

Tablo 2. 25 PCR Reaksiyonu

	Örnek (μ l)	Pozitif Kontrol (μ l)	Negatif Kontrol (μ l)	1 mM MgCl ₂ (μ l)	2 mM MgCl ₂ (μ l)	4 mM MgCl ₂ (μ l)
Genomik DNA	2	2	-	2	2	2
Tampon	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl ₂	1.5	1.5	1.5	1	2	4
DMSO	2	-	-	2	2	2
Primer R	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Primer F	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
dNTP	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Taq Polimeraz	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
dH ₂ O	17	17	19	17.5	16.5	14.5
TOPLAM	25	25	25	25	25	25

Tablo 2. 36 PCR Koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	5 dakika
2	35	94 °C	45 saniye
		55 °C	45 saniye
		72 °C	1 dakika
3	1	72 °C	5 dakika

2.2.2.3 Spektrofotometrik Yöntem

DNA, 1:200 oranında destile su ile sulandırıldıktan sonra ve kuvarz küvetler kullanılarak 260 nm'de absorbansı okundu. Aşağıda belirtilen formül yardımıyla DNA konsantrasyonu hesaplandı. Elde edilen DNA'nın saflığı da OD260/OD280 oranı ölçülerek öğrenildi [88].

$$50\mu\text{g/ml} \times \text{OD260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \text{mL'de } \mu\text{g cinsinden konsantrasyon}$$

2.2.2.4 Agaroz Jel Elektroforez

DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Yürütülmek istenen DNA'nın büyüklüğü göz önüne alınarak Agaroz jel 0.8% konsantrasyonda hazırlandı. 0.5X TBE'de (Çizelge 2.2) % 0.7-2 olarak kaynatılarak hazırlanan agaroz jeli belli bir noktaya kadar soğutulduktan sonra son

konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde Etidyum bromür eklendi. Agaroz jel aparatlarına dökülerek polimerileşmesi tamamlanana kadar beklendi.

DNA örneklerine yükleme tamponu eklendikten sonra jelin kuyucuklarına eklendi. Agaroz jelleri 90 Voltta, tampon jelinin $\frac{3}{4}$ 'ünü geçene kadar yürütüldü. Elektroforez sonucu UVP Jel Görüntüleme Sistemi kullanılarak resmi çekildikten sonra değerlendirildi.

2.2.2.5 PCR ile Çoğaltılan Genin Agaroz Jelden Geri Kazanımı

Agaroz jelde yürütülen PCR ürünleri jelden dikkatli bir biçimde kesildikten sonra, kesilen jel parçacıkları ağırlığı daha önceden belirlenen temiz bir ependorf tüpüne alınıp Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kiti protokolüne uygun bir şekilde jelden geri kazanıldı.

2.2.2.6 pGEM-T EASY Vektörüne SMU_328 geninin klonlanması

pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) kiti kullanarak Promega'nın protokolüne göre pGEM-T Easy vektörü ile PCR sonucu elde edilen SMU_328 geni bir gece +4 °C'de ligasyona bırakıldı.

Tablo 2. 47 Ligasyon Reaksiyonu

	S. mutans (μ l)
SMU_328 Geni	15
Tampon	2
pGEM-T EASY	2
T4 DNA Ligaz	1
dH ₂ O	-
Toplam	20

Çalışmalar buz üstünde yapıldı ve enzim, reaksiyona en son eklendi. + 4°C’de 1 gece bekletildi.

2.2.2.7 Plazmit DNA İzolasyonu

Petrilerde büyüyen koloniler ampisilinli sıvı LB ’ye aşılandı. 37 °C’de 1 gece 200 rpm’de büyümeye bırakıldı. Bir gece büyüyen koloniler 5 dakika 13 000 rpm’de santrifüj edildikten sonra QIAprep Spin Miniprep protokolüne uygun şekilde izole edildi. Elde edilen hücre pelletine 500 μ L resuspansiyon solusyonu eklenerek pellet çözüldü. 500 μ L liziz tamponu eklenerek nazik bir biçimde alt üst edildikten sonra 700 μ L nötralizasyon çözeltisi eklenerek hemen alt üst edildi (bu basamakta hızlı olmak önemlidir) ve 5 dakika 13 000 rpm’de santrifüj edildi. Supernatant dikkatli bir şekilde alınarak kolona aktarıldı. 1 dakika 13 000 rpm’de santrifüj edildi. 500 μ L yıkama çözeltisi eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi. Bu basamak tekrarlandı. 40 μ L saf su ile kolondan elusyon yapılarak plazmit izolasyonu tamamlandı.

2.2.2.8 BamHI ve KpnI Enzimleri ile Kesim Protokolü

Halkasal yapıda olan pET30a vektörüne geni klonlamak için ilk önce vektör yapışkan uç oluşturan BamH I ve Kpn I enzimleri ile kesildi. Daha sonra önceden izole edilen ilgili geni içeren pGEM-T EASY vektöründen BamH I ve Kpn I enzimleri ile SMU_328 geni kesildikten sonra kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek değerlendirildi. Kesilmiş plazmid ve ilgili gen sonraki uygulamalar için agaroz jelden geri kazanıldı.

2.2.2.9 SMU_328 Geninin pET30a Vektörüne Klonlanması

pET30a vektörü ve SMU_328 genini içeren pGEMT-EASY vektörü BamH I ve Kpn I enzimleriyle kesildikten sonra agaroz jelde yürütülen SMU_328 geni ve pET30a vektörü QIAquick Gel Extraction kiti ile jelden geri kazanıldı. Promega'nın protokolüne göre 1 gece +4 °C'de inkübe edilerek ligasyon yapıldı

Tablo 2. 18 pET 30a ve SMU_328 geninin ligasyon reaksiyonu

Buffer	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
pET30a	4 µl
SMU_328	13 µl
Toplam hacim	20 µl

2.2.2.10 Agaroz Jelde Yürütülen Vektör ve Genlerin Geri Kazanılması

Kesilen vektörleri ve genleri agaroz jelden geri kazanmak için Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (Katalog No: K0691) kullanıldı.

2.2.3 Mikrobiyolojik Metotlar

2.2.3.1 Ön Kültür Hazırlanması

LB-agar'a tek koloni olacak şekilde ekilen bakteri kolonilerinden tek bir koloni önce, son konsantrasyonu 10 µg/mL ve 30 mg/ml olan sırasıyla ampisilin ve kanamisin içeren LB ortamına aşılandı. 37°C' de çalkalayıcı inkübatörde bir gece inkübe edildi.

2.2.3.2 Plazmit Stoklarının Hazırlanması

İlgili bakteri soyları ve plazmidler ön kültürle üretildikten sonra %30'luk steril gliserolle son konsantrasyonu % 15'lik olacak şekilde sulandırılarak doğrudan -80°C'deki dolabın içerisine alındı ve burada muhafaza edildi.

2.2.3.3 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlanması

E.coli'nin DH10B soyunu 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 5 mL örnek, içinde 100 mL taze LB olan 500 mL'lik erlene kondu ve 37°C'de yaklaşık 2-3 saat $OD_{600} = 0.4$ 'e ulaşıncaya kadar büyütüldü. Bu aşamada kültür, 5 dakika buzda bekletildi. Kültür, falkonlara alınarak +4°C' de 5 dakika 3000 rpm'de santrifüjlendi. Supernatan atıldı ve 25 mL soğuk 0.1 M $CaCl_2$ konuldu ve yavaşça karıştırıldı. 2 dakika buzda bekletildi. +4°C' de 10 dakika 3000 rpm' de santrifüjlendi. 10mL soğuk 0.1 M $CaCl_2$ 'de 1-4 saat bekletildi. 10 mL steril % 40 gliserol eklenerek hafifçe karıştırıldı. Önceden buz üzerinde bekletilmiş ependorflara aktarılarak -80°C' ye konuldu [92,93].

Ayrıca ekspresyonda kullanılan BL-21(DE3) 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 büyütüldü. Bundan alınan 5 mL örnek, içinde 100 mL taze LB olan 500 mL'lik erlene kondu ve 37 °C' de yaklaşık 2-3 saat $OD_{600}=0,2$ 'e ulaşıncaya kadar büyütüldü. Son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde $MgCl_2$ ve son konsantrasyon yaklaşık olarak % 0.2 olacak şekilde glikoz ilave edildi. Tekrar 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde $OD_{600} = 0.5$ olana kadar büyütüldü. Kültür +4 °C'de 2 saat bekletildi ve +4 °C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatan atılır, pellet uygulama tamponu (100 mM $CaCl_2$, 70 mM $MnCl_2$, 40 mM CH_3COONa , pH=5.5) ile süspanse edilir. +4 °C'de 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet %15 gliserol içeren 25 mL uygulama tamponu ile süspanse edilir. Önceden buz üzerinde bekletilmiş ependorflara aktarılarak -80°C' ye konuldu [94].

2.2.3.4 Bakteriyel Transformasyon

Kompetan hücreler - 80 °C dolabından çıkarıldı ve buza alındı. 5 µL ligasyon ürünü ile kompetan hücre (50 µL) aynı tüpe alındı. 20 dakika buzda bekletildi. Isı şoku için 42 °C'de 90 saniye tutuldu. Hemen buza alınarak burada 2 dakika bekletildi. Falkona 950 µL ampisilinsiz LB eklenerek 37 °C'de 1.5 saat çalkalandı. Bulanıklaşma gözlemlendi. Tek koloni düşecek şekilde LB (+amp) içeren petriye 200 µL ekildi. Ampisilin içeren LB agar içeren petrilere X-Gal ve IPTG yayıldı ve bu petrilere transformasyon ürünlerinden ekim yapıldı ve bir gece 37 °C'de inkübe edildi. Ampisilin / IPTG / X-Gal içeren petrilere elde edilen beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu için, 100 µg / mL ampisilin içeren sıvı LB kültürlerine aşılandı ve yaklaşık 12 saat çalkalamalı etüvde inkübe edildi.

2.2.3.5 Rekombinant Protein Ekspresyonu

2.2.3.5.1 IPTG Kullanılarak Hedef Proteinin İndüklenmesi

İlgili genleri taşıyan pET plazmid, BL-21 DE3 hücrelerine transforme edilerek T7 promotor sistemi ile ekspresyonu başlatıldı. 500 mL'lik steril erlene 100 mL LB konuldu ve 50 mg/mL kanamisin 60 µL katıldı. LB-Agar + Kanamisin petri kabı üzerinden tek bir koloni alındıktan sonra, LB ortamına ekilerek 37°C' de 300 rpm de 3-4 saat inkübasyona bırakıldı.

OD₅₅₀ = 0.6-0.8'e ulaştığında 250 µL 5 mM ZnCl₂ ve 400 µL 1mM IPTG bakteri kültürüne eklendi. Kültür 30°C' de 300 rpm'de büyümeye bırakıldı [95,96].

2.2.3.5.2 Bakterilerin Yıkanması

Bakteri solüsyonu 50 mL'lik falkonlara aktarılarak 3000 rpm'de +4°C' de 20 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı ve bakteriyel hücre pelletinin 10 mL 50 mM Tris, pH:7.6 içerisinde çözünmesi sağlandı. 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve supernatant atıldı. Yıkama işlemi iki defa yapıldıktan sonra pellet kurutularak liziz prosedürüne geçmeden önce -20°C' de saklandı [95,96].

2.2.3.5.3 Bakteri hücrelerinin Lizisi

Bakteriyel hücre pelleti 10 mL soğuk lizis tamponu ile süspanse edildi ve buza konuldu. 100 µL 100 mM PMSF ve 250 µL 10 mg/mL lizozim çözeltilerinden eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 100 µL 5 mM ZnCl₂ eklendi ve 10 dakika buzda bekletildi. Hücre lizatına 1 mL %3'lük protamin sülfat çözeltisinden eklendi ve pipetajla karışması sağlandı. Falkon tüpü içerisindeki örnek 3000 rpm'de +4°C' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlenen örneğin viskozitesi kontrol edilip, hala viskoz ise %3'lük protamin sülfat çözeltisinden 500 µL daha eklendi. Tekrar iyi bir şekilde karıştırıldı ve 3000 rpm'de +4°C' de 2 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant temiz bir falkon tüpe alındı[95,96].

2.2.3.5.4 Ni-NTA Kolonundan Geçirmek İçin Liziz Basamağı

Ön kültürden inoküle edilen ve bir gece büyümede bekletilen 200 mL'lik örnek daha önce anlatılan yıkama tamponu ile yıkandı. En son basamakta çöktürülen örnek miktarı tartıldı ve 1 g için 2 – 5 mL olacak şekilde yaklaşık olarak 3 mL liziz tamponu eklendi. 1mg / mL lizozim eklenerek 30 dakika buzda bekletildi. 200 – 300 W'de 10 saniye sonikatör de bekletildi. Lizatin vizkozluğu devam ediyorsa *RNaz A* (10µg / mL) ve *DNaz I* (5µg / mL) eklenerek 10 – 15 dakika buzda bekletildi. 10 000 x g'de 20 – 30 dakika + 4°C'de santrifüj edildi. Supernatantı alındı ve - 20°C'de saklandı.

2.2.4 Biyokimyasal Metodlar

2.2.4.1 Ni-NTA Klonundan Geçirme Basamağı

Üretilen proteinin saflaştırılmasında Ni-NTA ile konjuge edilmiş agaroz küreciklerden oluşan resin kullanılmaktadır. Saflaştırılmak istenilen proteindeki HisTag, Nikel atomlarına affinite gösterir ve geri döndürülebilir şekilde bağlanır. Sonrasında kolon birkaç defa yıkandıktan sonra elüsyon tamponu eklenerek kolona HisTag aracılığıyla bağlı olan proteinlerin ayrılması sağlanılarak elüe edilir.

%50 Ni-NTA agarozundan 1 mL ve 4 mL lizattan alınarak bir karışım elde edildi. bu karışım 200 rpm'de + 4°C'de 60 dakika çalkalandı. Ni-NTA kolonuna örnek yüklendi. Altta kalan çözelti etiketlenerek toplandı. 4 mL Tablo 2.24'te görüldüğü şekilde hazırlanan yıkama tamponu eklendi (bu işlem 2 kez yapıldı).

Yıkama basamaklarından herbirinden örnekleme yapıldı. 0.5 mL elüsyon tamponu ile 4 kez eklenerek kolondan örnekleme yapıldı. Kolondan elde edilen tüm örnekler (OD₂₈₀) de ölçerek proteinin geldiği fraksiyon belirlendi.

2.2.4.2 Kalitatif Protein Tayini

Kromotografi işlemleri sonunda, eluatlar eşit hacimde alınarak bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi prensibine dayanmaktadır [94]. Kolon fraksiyonları eşit hacimde kuvars küvetlere alınarak, absorbandsları UV-spektrofotometrede köre karşı okundu. Örnekler SDS-PAGE ile görüntülenerek *S. mutans* CA’nın (SmuCA) bulunduğu tüpler tespit edildi.

2.2.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Ni-NTA kolonu ile saflaştırılan SmuCA proteini iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemelli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi[97].

Bu amaçla elektrofrez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve kışkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Çizelge 2.18’te belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına

üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi. (yaklaşık 30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Ni-NTA ile saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlardan toplam hacim 100 μ L olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutularak enjektörle kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline vardığında voltaj 200 volt'a yükseltildi. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jel kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1-1.5saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

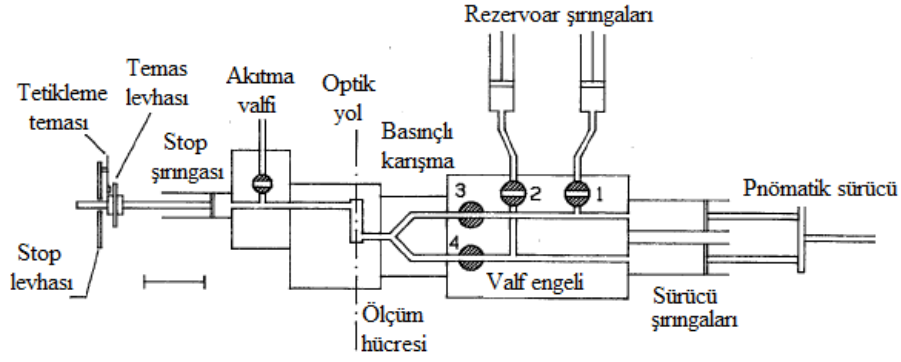
2.2.4.4 Protonografi

SDS-PAGE daha önce belirtildiği gibi hazırlandı. Protein örnekleri 2-merkaptolanol olmadan hazırlanan numune tamponu ile karıştırıldıktan sonra proteini denatüre etmemek amacıyla kaynatmaksızın kuyucuklara yüklendi ve jel 180V' da yürütüldü. Daha sonra jel cam plaklar arasından dikkatli bir şekilde alınarak 2.5% Triton X-100 çözeltisi içerisinde 1 saat çalkalandı ve iki defa 10% izopropanol içeren 100 mM Tris, pH 8.2 tamponunda 10 dk süre ile yıkandı. Ardından jel 0.1% bromothymol blue içeren 100mM Tris pH 8.2 içerisinde 30 dakika inkübe edildi ve CO₂ hidrataz aktivitesi için doymun CO₂ çözeltisine daldırıldı. Deney oda koşullarında yapıldı ve doymun CO₂ çözeltisi 200 ml distile sudan yaklaşık olarak 3 saat CO₂ gazı geçirilerek elde edildi. CA aktivitesi pH'deki düşüştan (alkalin pH'den asidik pH'ye geçiş, sarı renk) dolayı formationilin sarı renkli band göstermesiyle kanıtlanmıştır[98].

2.2.4.5 CO₂-Hidrataz Aktivitesi (Stop Flow Kinetik Alet)

SX.18MV-R Applied Photophysics stopped-flow aleti CA-CO₂ hidratasyon aktivitesi için kullanıldı. Bu alet, hızlı kimyasal, biyokimyasal ve biyolojik reaksiyonların stop-flow ile başlamalarına izin verir. Bu aletin asıl prensibi adsorpsiyon metoduna dayanır.

Temel avantajları arasında, fizyolojik şartlar altında pH ve sıcaklık, reaksiyon zamanlarının ve reaktif miktarlarının indirgemesine sahip olma, tekrarlanabilir üretim verilebilir.

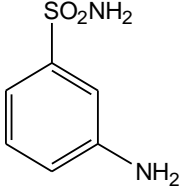
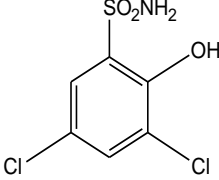
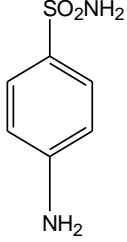
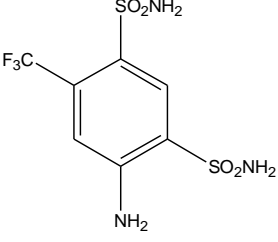
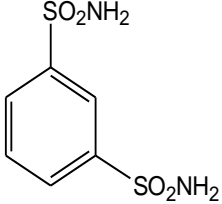
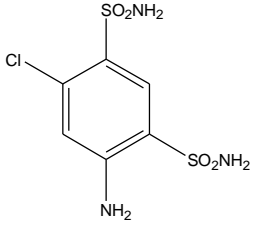
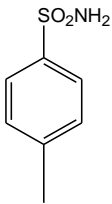
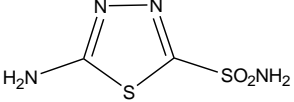


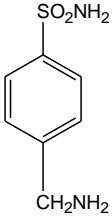
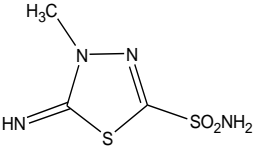
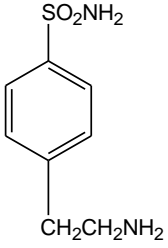
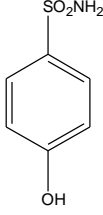
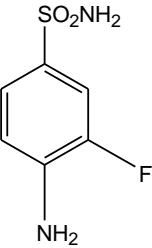
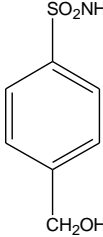
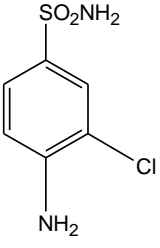
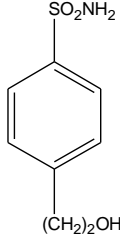
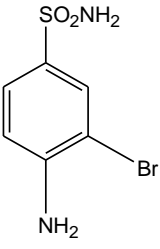
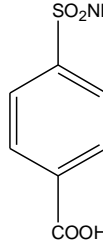
Şekil 2.3 Stopped flow cihazının bileşenleri

2.2.4.6 İnhibitörler için IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Farklı inhibitörlerin IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda CO₂ substratının 70 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce inhibitör olmadan ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar Stop Flow cihazında 557 nm'de HEPES tamponuna karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite – [I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

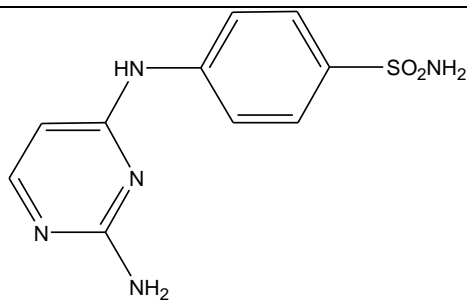
Tablo 2. 19 SmuCA inhibisyonunda kullanılan inhibitörler

No	İnhibitör	No	inhibitör
1	 <p>3-Amino-benzenesulfonamide</p>	10	 <p>3,5-Dichloro-2-hydroxy-benzenesulfonamide</p>
2	 <p>4-Amino-benzenesulfonamide</p>	11	 <p>4-Amino-6-trifluorometil-benzen-1,3-disulfonik asit diamid</p>
3	 <p>Benzen-1,3-disulfonik asit diamid</p>	12	 <p>4-Amino-6-kloro-benzen-1,3-disulfonik asit diamid</p>
4	 <p>Toluene-4-sulfonamide</p>	13	 <p>5-Amino-[1,3,4]thiadiazol-2-sulfonik asit amid</p>

Tablo 2.18: (devam)			
5	 <p>4-Aminomethyl-benzenesulfonamide</p>	14	 <p>5-Imino-4-metil-4,5-dihidro-[1,3,4]tyadiazol-2-sulfonik asit amide</p>
6	 <p>4-(2-Amino-ethyl)-benzenesulfonamide</p>	15	 <p>4-Hydroxy-benzenesulfonamide</p>
7	 <p>4-Amino-3-fluoro-benzenesulfonamide</p>	16	 <p>4-Hydroxymethyl-benzenesulfonamide</p>
8	 <p>4-Amino-3-chloro-benzenesulfonamide</p>	17	 <p>4-(2-Hydroxy-ethyl)-benzenesulfonamide</p>
9	 <p>4-Amino-3-bromo-benzenesulfonamide</p>	18	 <p>4-Sulfamoyl-benzoic acid</p>

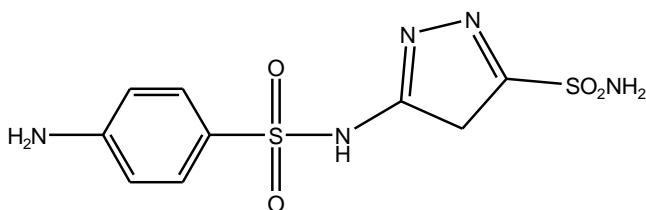
Tablo 2.18: (devam)

19



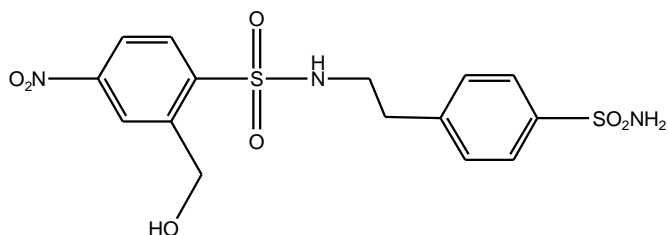
4-(2-Amino-pyrimidin-4-ylamino)-benzenesulfonamide

20



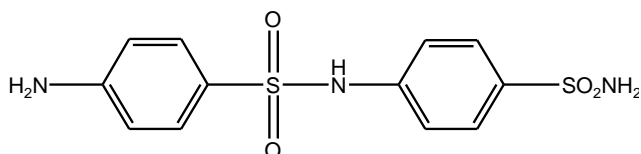
5-(4-aminophenylsulfonamido)-4*H*-pyrazole-3-sulfonamide

21



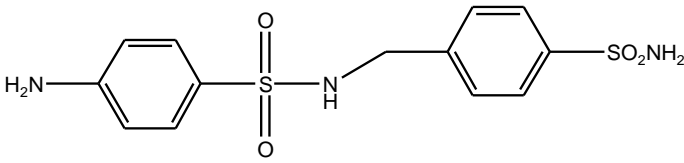
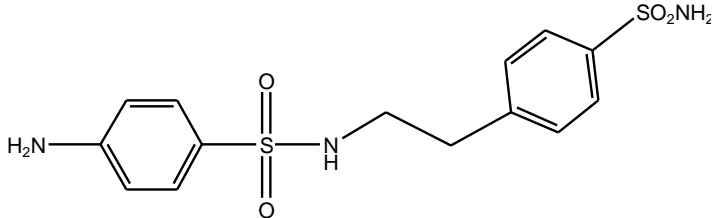
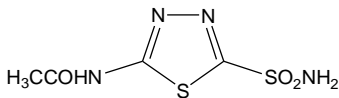
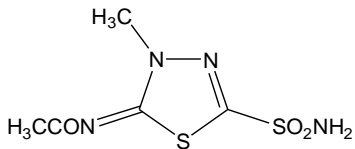
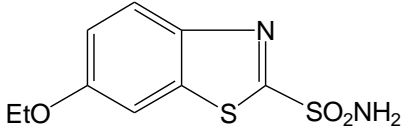
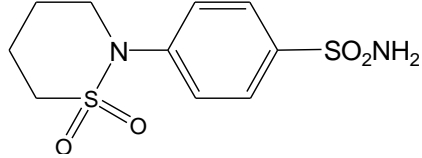
2-(hydroxymethyl)-4-nitro-*N*-(4-sulfamoylphenethyl)benzenesulfonamide

22

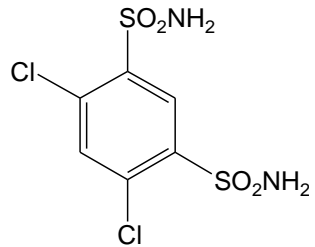


4-amino-*N*-(4-sulfamoylphenyl)benzenesulfonamide

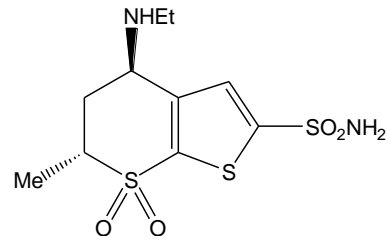
Tablo 2.18: (devam)

23	 <p>4-amino-<i>N</i>-(4-sulfamoylbenzyl)benzenesulfonamide</p>
24	 <p>4-amino-<i>N</i>-(4-sulfamoylphenethyl)benzenesulfonamide</p>
 <p>Asetazolamid (AAZ)</p>	 <p>Metazolamid (MZA)</p>
 <p>Etokzolamid (EZA)</p>	 <p>Sultiam (SLT)</p>

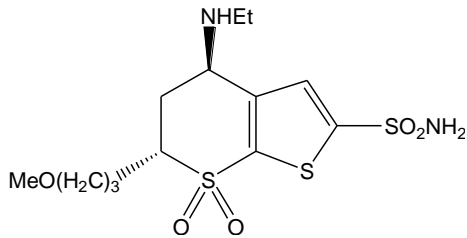
Tablo 2.18: (devam)



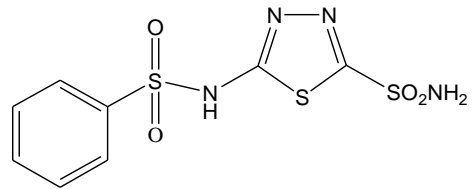
Diklorfenamid
(DCP)



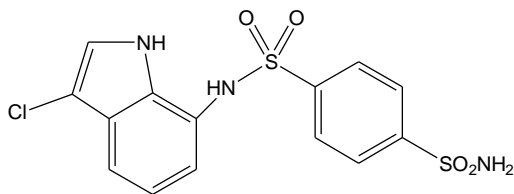
Dorzolamid
(DZA)



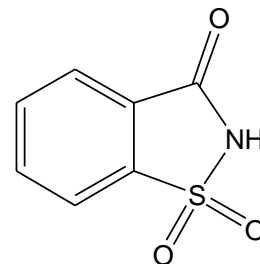
Brinzolamid
(BRZ)



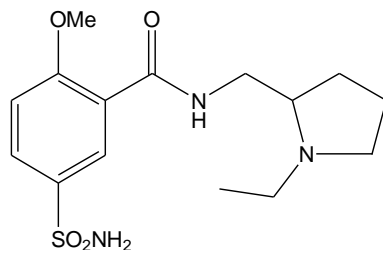
Benzolamid
(BZA)



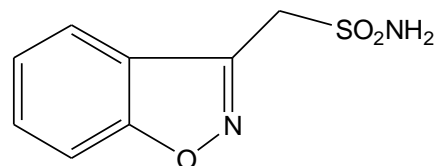
İndisulam
(IND)



Sakkarin (SAC)

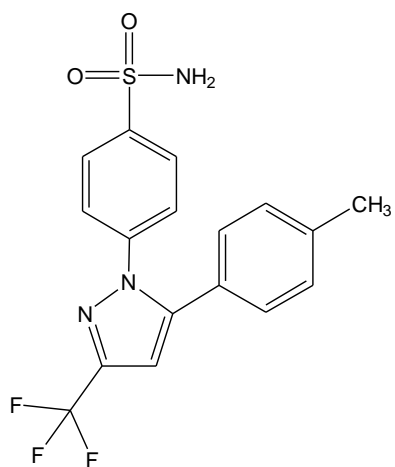


Sülpirid
(SLP)

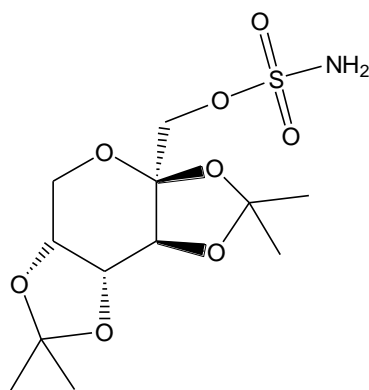


Zonisamid
(ZNS)

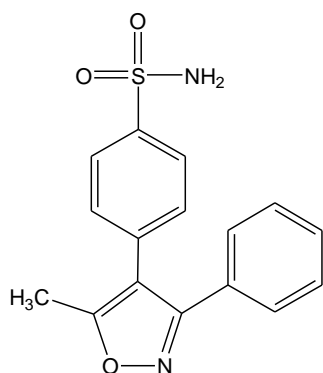
Tablo 2.18: (devam)



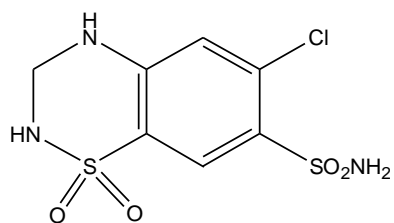
**Selekoksib
(CLX)**



**Topiramet
(TPM)**



**Valdekoksib
(VLX)**



**Hidroklorotiazid
(HCT)**

3. BULGULAR

3.1 *Streptococcus mutans* Genomik DNA'sı

28 µg kristalize *Streptococcus mutans* UA159 soyuna ait genomik DNA'sı Prof. Georg Conrads, University Hospital Aachen' dan uygun koşullarda gönderildi. Kristalize *S. mutans* genomik DNA'sı son konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde 500 µl dH₂O eklenerek kullanım için hazırlandı ve -20 °C' de saklandı.

3.2 Primer Tasarımı

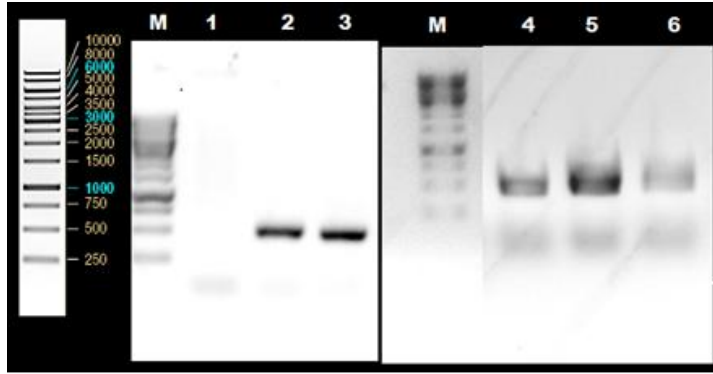
Primer tasarlanırken www.restrictionmapper.org , www.bioinformatics.org ve www.idtdna.com adreslerinden yararlanılarak buradaki programlar kullanıldı. Önce SMU_328 genini kesen ve kesmeyen enzimler saptandı. Geni kesmeyenler arasından pET30a vektörünün klonlama bölgesindeki enzimlere bakıldı ve burada bulunan BamH I ve Kpn I enzim kesim bölgeleri seçilerek primerlerde kullanıldı (Şekil A.1, Bkz. Ekler). Tasarlanan primerlerin kalıp DNA'ya bağlanmasını engelleyecek şekilde kendi içerisinde hairpin (saç tokası) oluşturup oluşturmadığına bakıldı. Primerlerin özelliklerine bakılarak birbirine yakın olmalarına dikkat edildi. T_m sıcaklıklarının birbirine yakın olması ve nükleotidlerin dağılımı mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi.

Tablo 3. 1. *S. mutans* CA primerleri

Primer	Uzunluk bç	% GC oranı	T _m °C	Dizisi
Forward	24	33.3%	59.9	5'- <u>GGTACCATGGTAATGTCTTATTTT</u> - 3' KpnI
Reverse	27	40.7%	65.3	5'- <u>GGATCC</u> TTAATTGACTTCTCTTACTCG-3' BamHI

3.3 PCR

PCR protokolüne göre; PCR tüplerine Tampon, MgCl₂, destile su, dNTP karışımı, DNA örneği (negatif kontrolde DNA yerine su), Forward Primeri, Reverse Primeri ve en son olarak Taq DNA Polimeraz enzimi eklendi ve tüpler PCR cihazına yerleştirildi ve Tablo 2.16'deki programa göre reaksiyon gerçekleştirildi. PCR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü ve 501 bp'lik bölgede *S. mutans* SMU_328 genine ait bant gözlemlendi ve UVP Görüntüleme cihazı ile görüntüledi. Negatif kontrol tüpünde de herhangi bir DNA kontaminasyonu gözlenmedi (Şekil 3.1). 1, 2 ve 4 mM olacak şekilde MgCl₂ optimizasyonu yapıldı. PCR için kullandığımız 1.5 mM MgCl₂ konsantrasyonunun uygun olduğu Şekil 3.1' de görülmektedir.



Şekil 3. 1 SMU_328 geninin PCR ile çoğaltılması. M, marker; 1, negatif kontrol; 2, pozitif control; 3, SMU_328 geni; 4, 5, 6 MgCl₂ optimizasyonunu göstermektedir (sırasıyla 1 mM, 2 mM ve 4 mM MgCl₂).

3.4 SMU_328 Geninin pGEM-T EASY Vektörüne Klonlanması ve *E.coli*'ye Transformasyonu

pGEM®-T EASY Vector Systems (Promega) kiti kullanarak Promega'nın protokolüne göre pGEM-T vektörü ile PCR sonucu elde edilen SMU_328 geni bir gece +4 °C'de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü DH10B *E.coli* soyuna transforme

edildi. Ampisilin içeren LB agarlı petri kaplarına X-Gal ve IPTG yayıldı ve bu petri kaplarına transformasyon ürünlerinden ekim yapıldı ve bir gece 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petri kaplarında mavi beyaz koloniler oluştu. Hiçbir DNA parçası içermeyen negatif kontrolde sadece mavi koloniler oluştu. Bunlar da pGEM-T vektörünün kendisi halkalaşarak hücreye transforme olması sonucu ampisiline direnç kazanarak mavi koloni oluşturur. Kontrol DNA içeren pozitif kontrolde hem beyaz hem de mavi koloniler oluştu. SMU_328 geni ile transforme edilen hücrelerden mavi beyaz koloniler oluştu. Beyaz koloniler SMU_328 genini içeren pGEM-T vektörüne sahip hücrelerdir. Beyaz kolonilerden LB sıvı kültürüne tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. QIAprep Spin Miniprep Kiti ile plazmid izolasyonu yapıldı ve plazmidler BamH I ve Kpn I restriksiyon enzimleri ile kesildi.

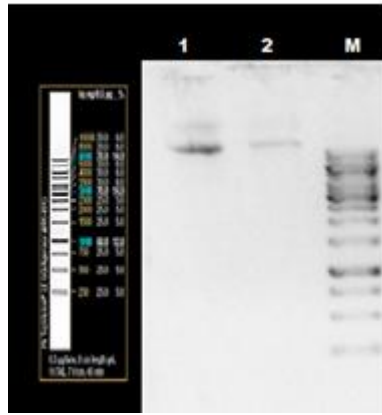
Kesim sonucu agaroz jelde yürütüldü ve vektörden kesilen gen QIAquick Gel Extraction Kiti ile geri kazanıldı. Geri kazanılan maya SMU_328 geni tekrar agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 3.2).



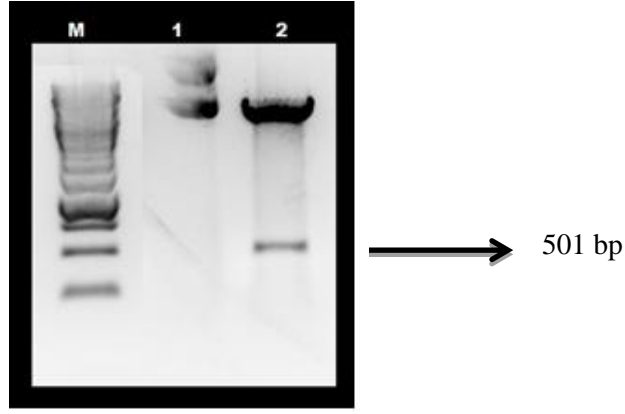
Şekil 3.2: Mini Prep Kiti ile pGEM-T+SMU_328 plazmidinin izolasyonu.M, 1kb’lık Marker; 1, PCR ile çoğaltılmış SMU_328 geni; 2, pGEMTEasy+SMU_328 plazmid izolasyonu; 3, 4 ve 5, pGEMTEasy+SMU_328 plazmidinin restriksiyon enzimleriyle kesimini göstermektedir.

3.5 SMU_328 Geninin pET30a Vektörüne Klonlanması ve *E.coli*'ye Transformasyonu

Halkasal yapıda olan pET30a vektörü BamH I ve Kpn I restriksiyon enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirildi (Şekil 3.3). Daha önce pGEM-T vektöründen kesilerek geri kazanılan SMU_328 geni ile kesilmiş olan pET30a vektörü Promega'nın protokolüne göre 1 gece +4 °C'de inkübe edildi. Ligasyon ürünü BL21(DE3) *E.coli* soyuna transforme edildi. Kanamisin içeren LB agarlı platelere transformasyon ürünlerinden ekim yapıldı ve bir gece 37°C'de inkübe edildi. Oluşan kolonilerin ligasyon ürünü içerip içermediklerini kontrol etmek için tek kolonilerden ampisilinli sıvı LB kültürüne ekimi yapıldı ve bir gece 37°C'de inkübe edildi. Büyümüş olan hücre kültürünün bir kısmından gliserol stok hazırlandı ve etiketlenerek -80°C'de saklandı. Geri kalan hücre kültüründen Mini Prep Kiti ile plazmid izolasyonu yapıldı ve SMU_328 genini içerip içermediğini kontrol etmek için BamH I ve Kpn I kesim enzimleri ile plazmid kesildi. Reaksiyon sonucunu görmek için agaroz jelde yürütüldü. SMU_328 genini içeren kolonideki plazmidin kesiminde çift bant gözlemlendi; genin bulunduğu ve plazmidin bulunduğu bölgelerde (Şekil 3.4).



Şekil 3. 2 1 ve 2 ,BamHI ve KpnI enzimleriyle kesilmiş pET30a vektörü; M, 1kb'lık marker.



Şekil 3. 3 M, 1kb'lık marker; 1, pET30a+SMU_328 izolasyon 2, SMU_328 geninin BamHI ve KpnI enzimleriyle pET30' dan kesimi.

3.6 Dizi Analizi

İlgili geni içeren kolonilerden sıvı LB kültürüne tek koloni ekimi yapıldı ve bir gece 37 °C'de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Bu hücre kültüründen gliserol stok hazırlandı. Beyaz kolonilerin içerdiği vektördeki DNA parçasının PCR ile çoğaltmış olduğumuz gen olup olmadığını belirlemek için vektör otomatik dizi analizi ile kontrol edilmiştir. Bu amaçla ampisilin içeren LB agar petrisinde ekili olan klon REFGEN Biyoteknoloji'ye gönderilmiştir. Elde edilen dizi analizi sonuçlarının biyoinformatiği NCBI web sayfasında analiz edilmiş ve *Streptococcus mutans* CA (SMU_328) geni ile karşılaştırılmıştır.

```

SmuCA 10      GGCAAATCAAAGCATA  ATGTTGATTTGCATGGAACCGCTCACTTGCCACTTAAGCCAAA  69
          |||          |||          |||
SMU_328 309803 GGCAAATC-AAGCAT-  ATGTTGATTTGCATGGAACCGCTCACTTGCCACTTAAGCCAAA  309859

SmuCA 70      AACGCGTGTGCTATTGTTACTTGTATGGACTCTCGTTTACACGTAGCACCTGCTTTGGG  129
          |||
SMU_328 309860 AACGCGTGTGCTATTGTTACTTGTATGGACTCTCGTTTACACGTAGCACCTGCTTTGGG  309919

SmuCA 130     GTTGGCTTTAGGAGATGCCCATATTTTACGCAATGCAGGCGCCGTGTAACGGATGACGT  189
          |||
SMU_328 309920 GTTGGCTTTAGGAGATGCCCATATTTTACGCAATGCAGGCGCCGTGTAACGGATGACGT  309979

SmuCA 190     TATTCGTTCTCTGGTTATTTCTGAGCAACAGTTAGGAACAAGTAAAATTGTGGTTTTGCA  249
          |||
SMU_328 309980 TATTCGTTCTCTGGTTATTTCTGAGCAACAGTTAGGAACAAGTAAAATTGTGGTTTTGCA  310039

SmuCA 250     TCATACGGATTGTGGTGCACAGACTTTTACAAATGCTGAGTTTACTGAGCAGTTAAAGCG  309
          |||
SMU_328 310040 TCATACGGATTGTGGTGCACAGACTTTTACAAATGCTGAGTTTACTGAGCAGTTAAAGCG  310099

SmuCA 310     GGATTTAAACTGTTGATGCTGGAGATCAGGACTTTCTTCCGTTTACAGATATTGAAGAGAG  369
          |||
SMU_328 310100 GGATTTAGGCTGTTGATGCTGGAGATCAGGACTTTCTTCCGTTTACAGATATTGAAGAGAG  310159
          ↑

SmuCA 370     TGTGCGAGAGGATATTGCTCTTTTGAAAAATTCTCCTCTGATTCCCTGAAGATATTATTAT  429
          |||
SMU_328 310160 TGTGCGAGAGGATATTGCTCTTTTGAAAAATTCTCCTCTGATTCCCTGAAGATATTATTAT  310219

SmuCA 430     TTCTGGAGCTATTTATGATGTTGATACAGGACGAGTAAGAGAAGTCAATTAA  481
          |||
SMU_328 310220 TTCTGGAGCTATTTATGATGTTGATACAGGACGAGTAAGAGAAGTCAATTAA  310271

```

Şekil 3.5 SMU_328 geni ile dizi analizinden gelen *S. mutans* CA dizisinin karşılaştırılması

3.7 *S. mutans* CA'nın Ekspresyonu ve Saflaştırılması

3.7.1 *S. mutans* CA'nın Ekspresyonu

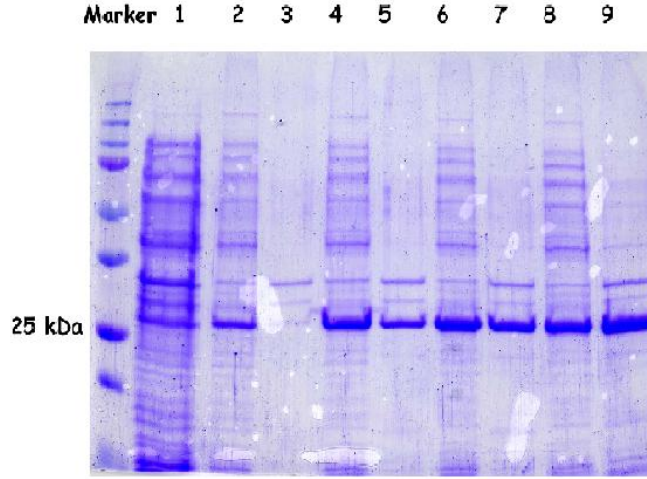
Ekspresyonu T7 promoter sistemi ile başlatılması için, ilgili genleri taşıyan pET plazmid, BL21 (DE3) *E. coli* soyuna transforme edildi.

500 mL'lik steril erlene 100 mL LB konuldu ve 50 mg/mL kanamisininden 60 µL katıldı. LB-Agar + Kanamisin petri kabı üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C' de 300 rpm de 3-4 saat inkübasyona bırakıldı.

IPTG uygulaması ile ekspresyonun varlığının tespiti için kontrol olarak plazmid içermeyen BL-21(DE3) *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 250 µL 5 mM ZnCl₂ ve 400 µL 0.1 M IPTG bakteri kültürüne eklendi. Kültür 30°C' de 300 rpm'de büyümeye bırakıldı.

Hücreler 6 saat inkübasyon sonrasında 3000 rpm'de +4°C' de 20 dakika santrifüj edildi ve -20°C' de ertesi gün kullanılmak üzere saklandı.

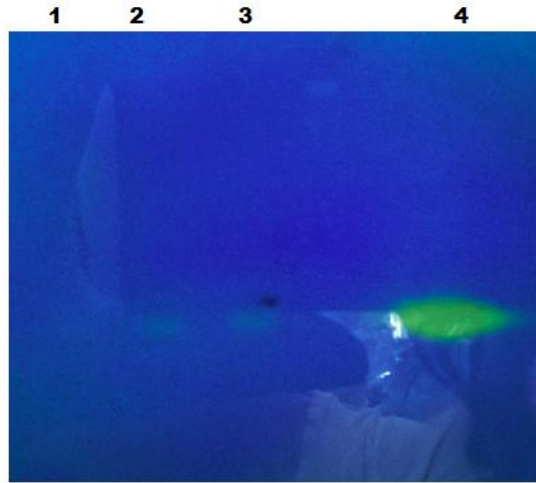
Saflaştırma basamağına geçmeden önce protein ekspresyonu aşamasında indükleme öncesi, indükleme sonrası ve liziz aşaması sonucunda proteinin üretilip üretilmediğini kontrol etmek için ayrılan örnekler SDS-PAGE ile kontrol edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Ekspresyon sonucu SDS PAGE görüntüsü: 1, indükleme öncesi; 2, indüklemeden 2 saat sonra supernatant; 3, indüklemeden 2 saat sonra pellet; 4, indüklemeden 4 saat sonra supernatant; 5, indüklemeden 4 saat sonra pellet; 6, indüklemeden 6 saat sonra supernatant; 7, indüklemeden 6 saat sonra pellet; 8, 16 saat indükleme sonrası supernatant; 9, 16 saat indükleme sonrası pellet.

3.7.1.1 Protonografi ile Aktivite Kontrolü

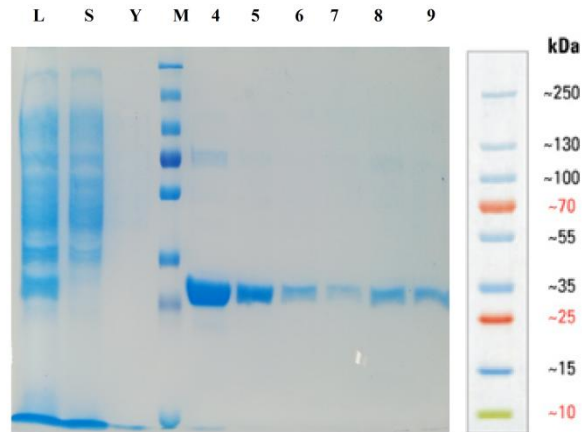
Protonografi, zimografiye benzeyen ve ondan türetilmiş bir tekniktir. Zimografinin aksine bu teknik farklı sınıftan proteinlerin (karbonik anhidraz gibi) SDS-PAGE üzerinde aktivitesini belirlemeyi mümkün kılmaktadır. Zimografi basit bir elektroforetik ve proteolitik aktivitenin ölçümü için fonksiyonel analiz metod olarak tanımlanmıştır ve yaygın olarak tüm proteaz sınıfları (serine-/threonine-, sisteine, aspartik ve metaloproteazlar) için uygulanmaktadır. Standart metod genellikle jelatin veya kazein gibi bir protein substratı ile hazırlanmış SDS jeli dayanmaktadır [98] Protein saflaştırma basamağına geçmeden önce liziz sonucu elde edilen süpernatantlar protonografi jeline yüklenerek CA aktivite kontrolü yapıldı.



Şekil 3.7.Protonografi jeli görüntülemesi. 1, indüklemeden 2 saat sonra süpernatant; 2, , indüklemeden 4 saat sonra süpernatant; 3, indüklemeden 6 saat sonra süpernatant; 4 750 ng bCA(sığır eritrosit CA'sı, kontrol).

3.7.2 Protein Saflaştırma Basamağı

Ni-NTA kolonundan elüe edilen ve OD₂₈₀' de absorbands gösteren fraksiyonlar SDS PAGE ile görüntülendi (Şekil 3.8).



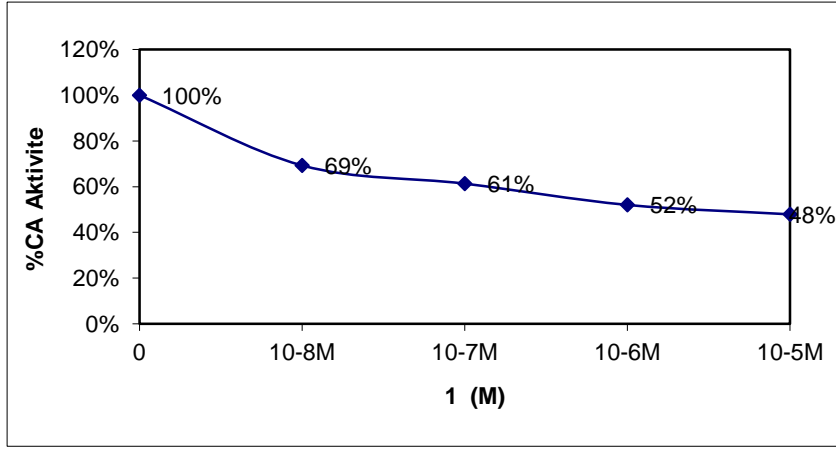
Şekil 3.8. Ni-NTA kolonu ile elüe edilen SmuCA enziminin SDS PAGE ile görüntülenmesi. L, Lizat; S, yıkama öncesi kolondan süzülen lizat; Y, yıkama; M, protein marker (Şekil A.3.); 4-9 nolu bandlar, sırasıyla 4-9 nolu fraksiyonlar.

3.8 *S. mutans* CA'sının Aktivite Tayini

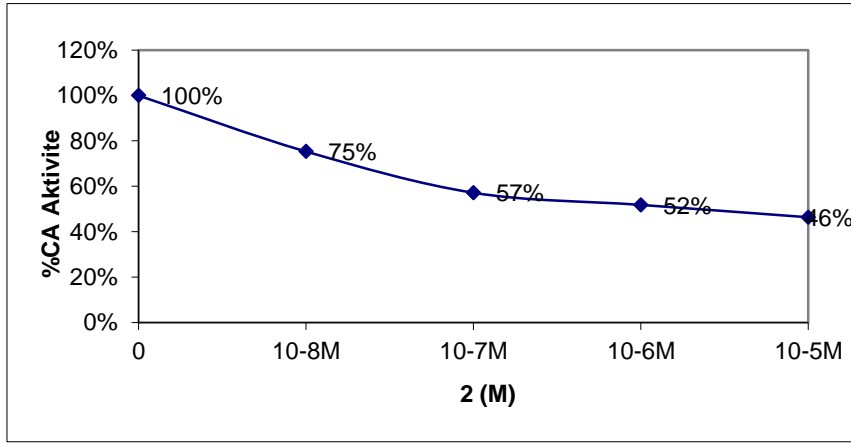
Stopped flow cihazıyla SmuCA Hidrataz aktivitesi belirlendi. SmuCA' nın $4.2 \times 10^5 \text{ k}_{\text{cat}} \text{ s}^{-1}$ ve $5.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1} \text{ k}_{\text{cat}}/\text{K}_m$ ile CO₂ hidrataz aktivitesi göstermiştir.

3.9 Bazı CA İnhibitörleri ile *S. mutans* CA'sının İnhibisyonu

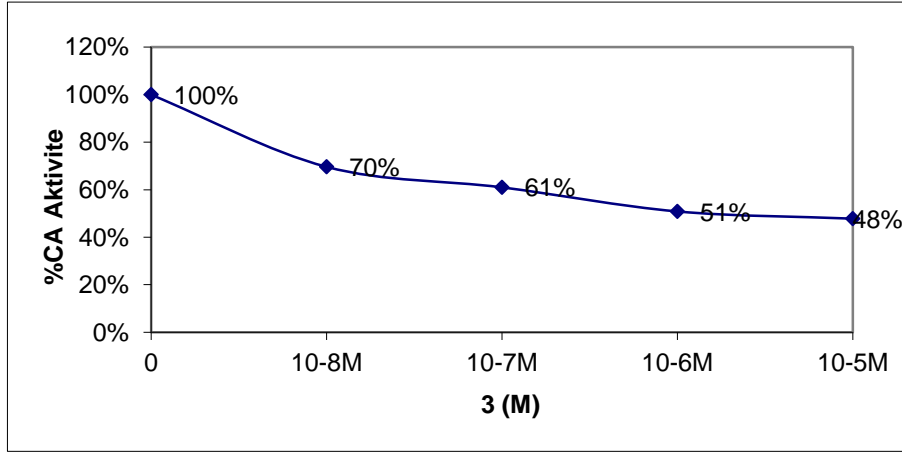
İnhibisyon çalışmalarında klasik CA inhibitörü olarak 40 bileşik (39 adet sulfonamide ve bir tane de sülfamat) kullanıldı. 1-24 ve AAZ-HCT yaygın olarak CA enzim ailesini inhibe etmek için kullanılan aromatic veya heterosiklik sülfonamidlerdir. Bu inhibitörlerin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi amacıyla substrat konsantrasyonu sabit tutulmak suretiyle farklı konsantrasyonlarda inhibitör çözeltileri kullanılarak enzimin hidrataz aktiviteleri belirlendi. %Aktivite-[I] grafiği çizilerek oluşturulan eğri denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı.



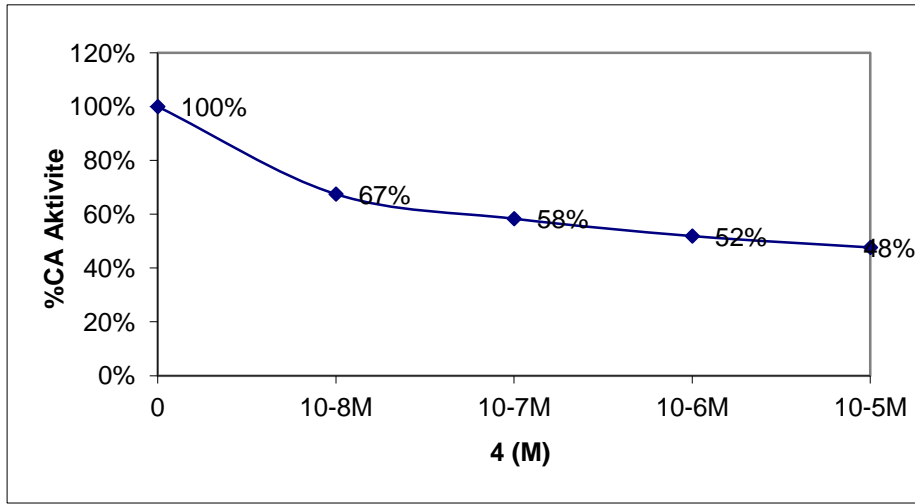
Şekil 3.9 1 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



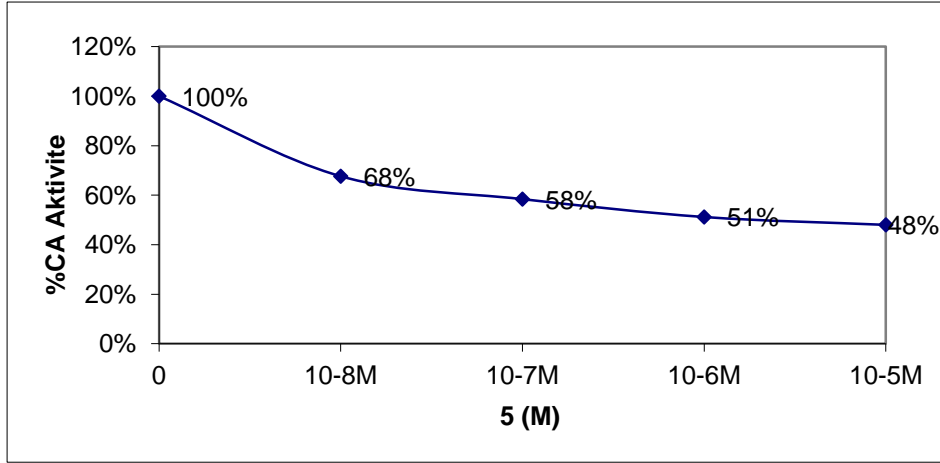
Şekil 3.10 2 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



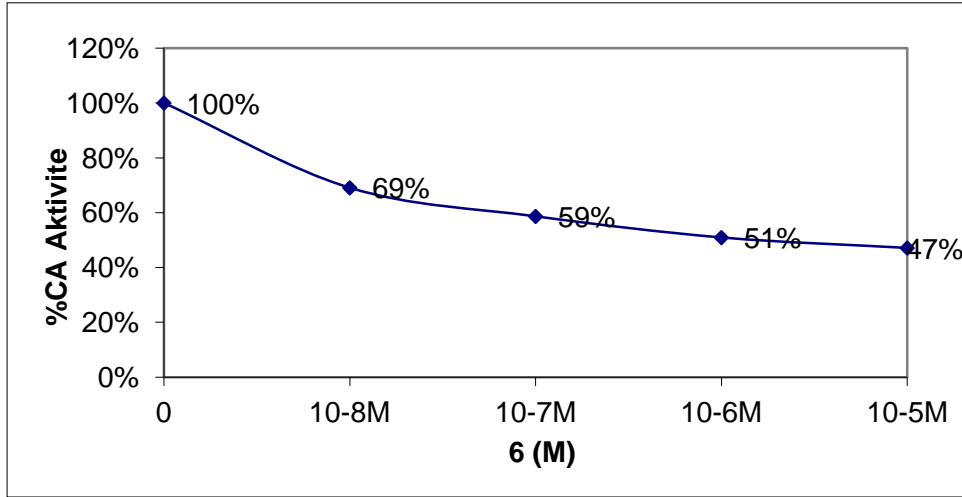
Şekil 3.11 3 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



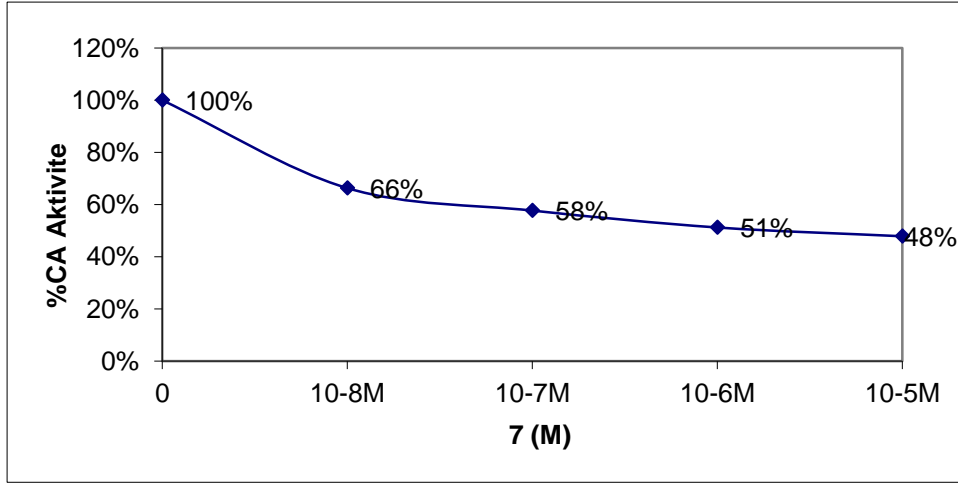
Şekil 3.12 4 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



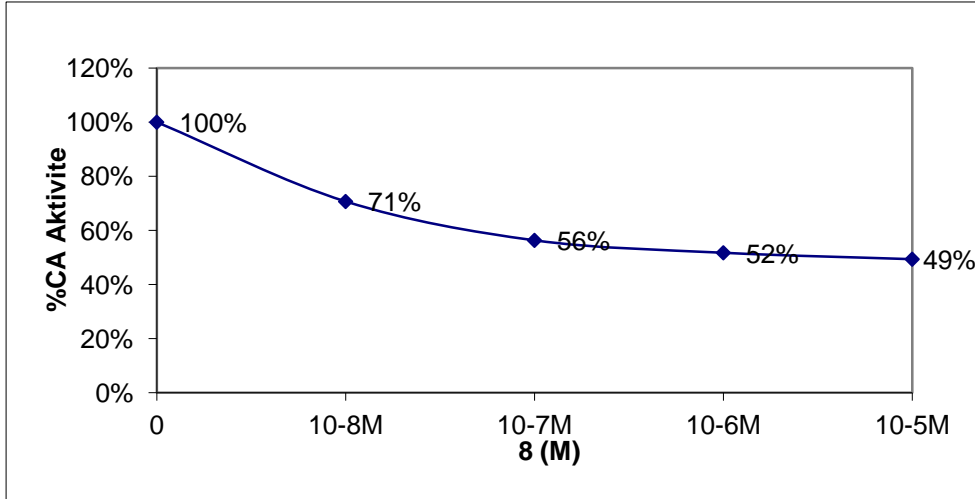
Şekil 3.13 5 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



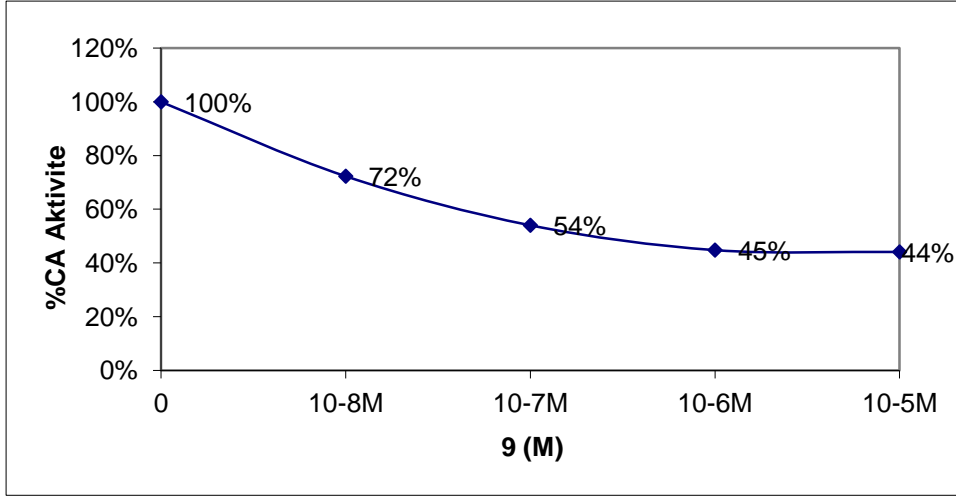
Şekil 3.14 6 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



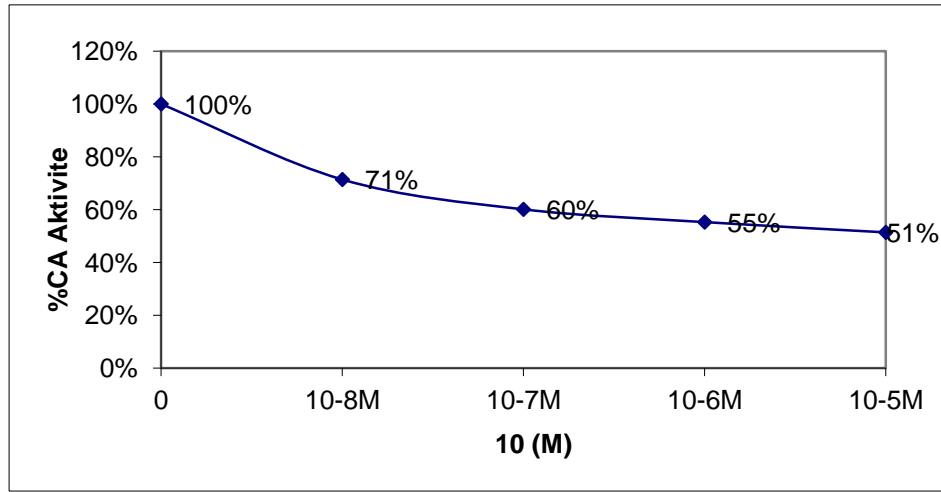
Şekil 3.15 7 nolu inhibitörün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



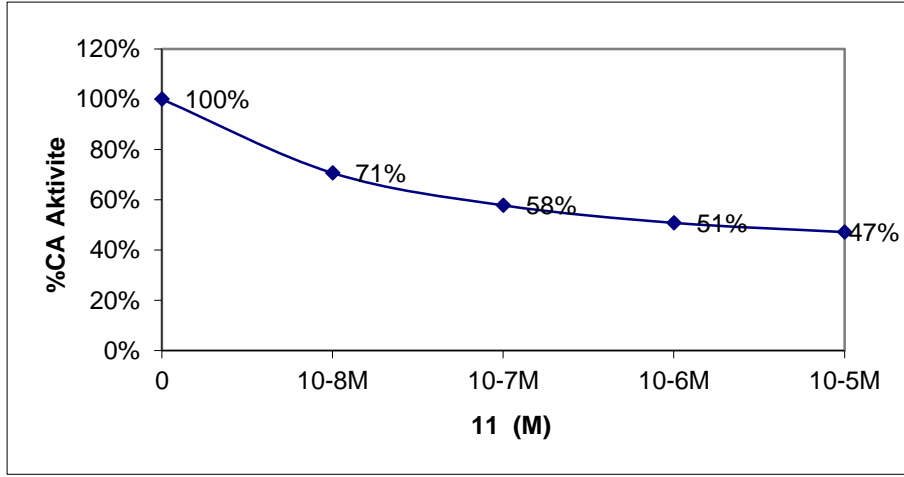
Şekil 3.16 8 nolu inhibitörün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



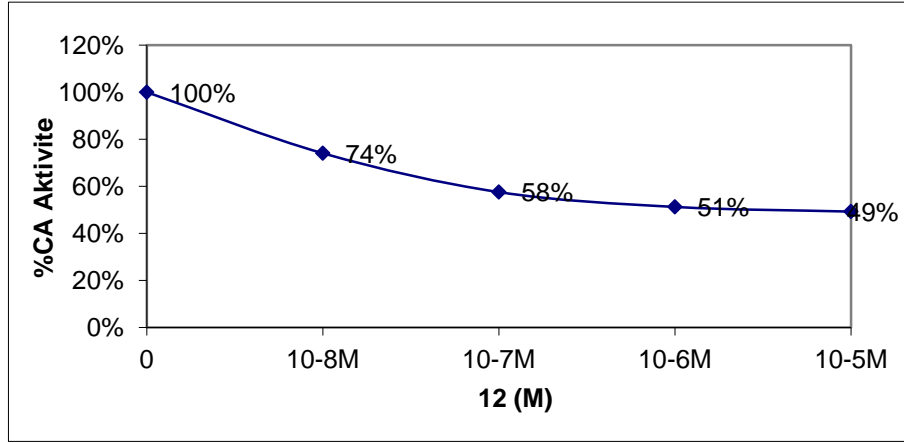
Şekil 3.17 9 nolu inhibitörün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



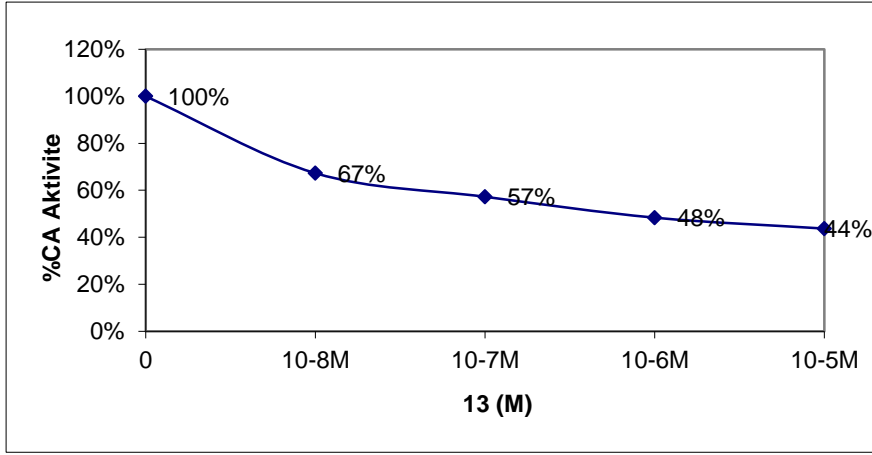
Şekil 3.18 10 nolu inhibitörünün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



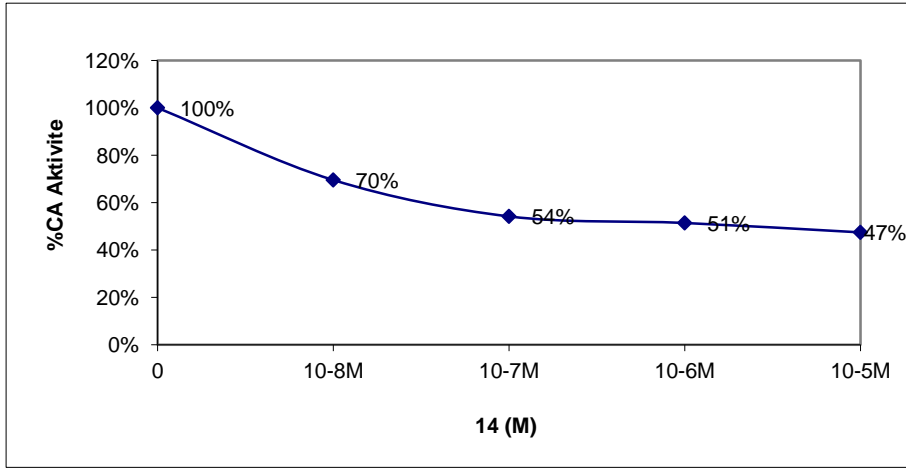
Şekil 3.19 11 nolu inhibitörün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



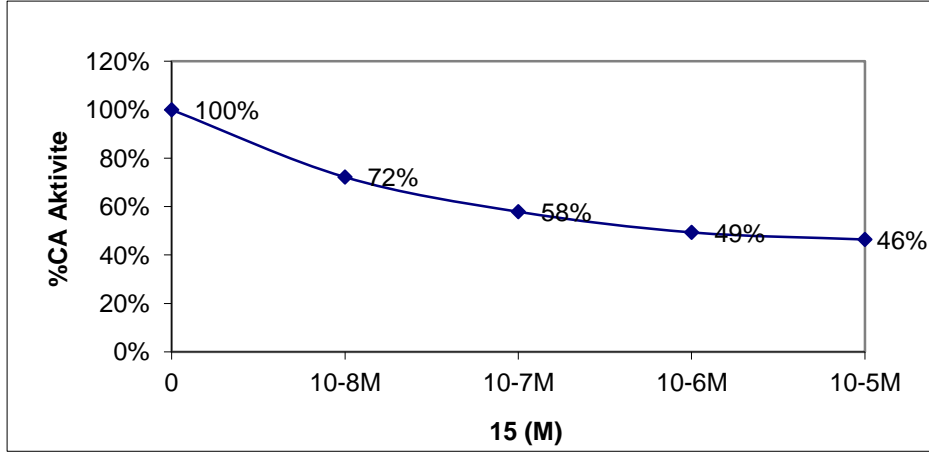
Şekil 3.20 12 nolu inhibitörün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



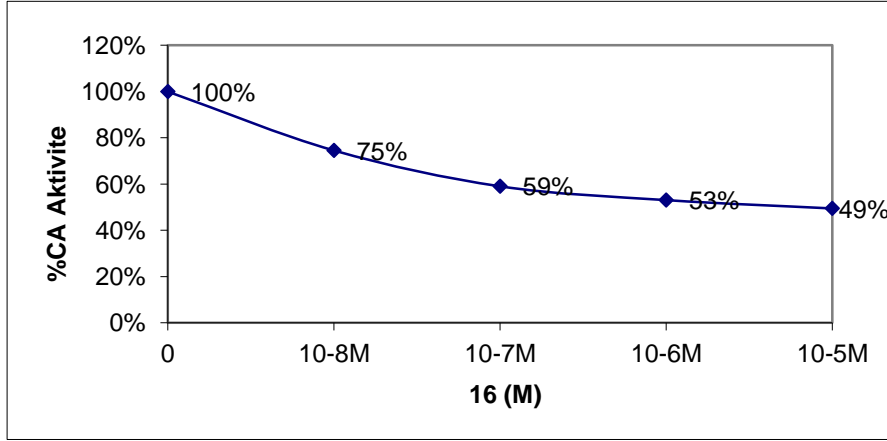
Şekil 3.21 13 nolu inhibitörün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



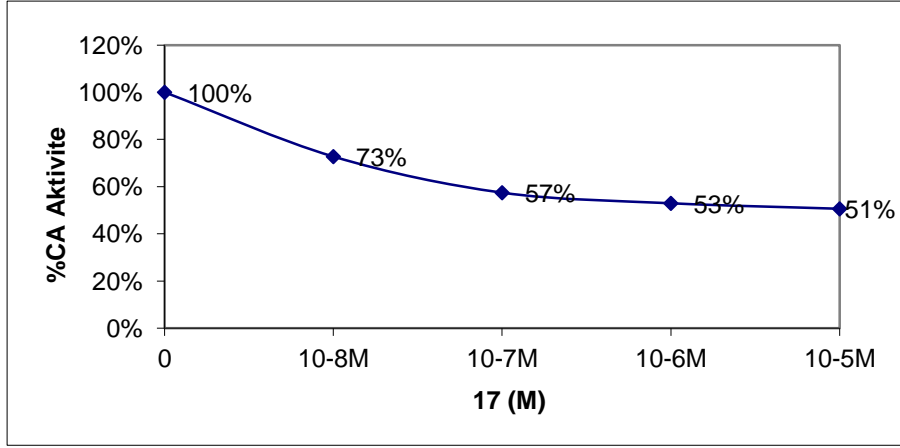
Şekil 3.22 14 nolu inhibitörün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



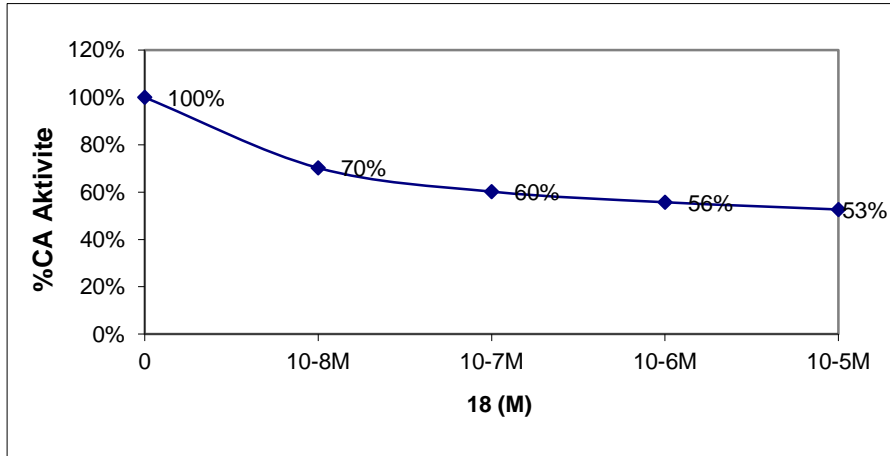
Şekil 3.23 15 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



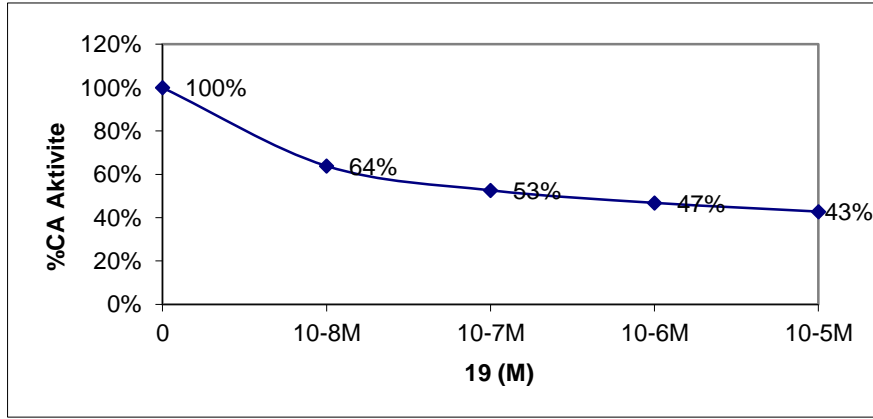
Şekil 3.24 16 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



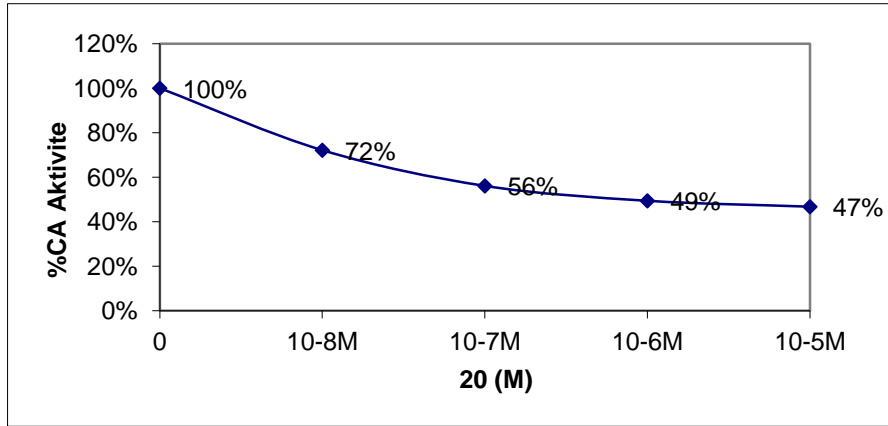
Şekil 3.25 17 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



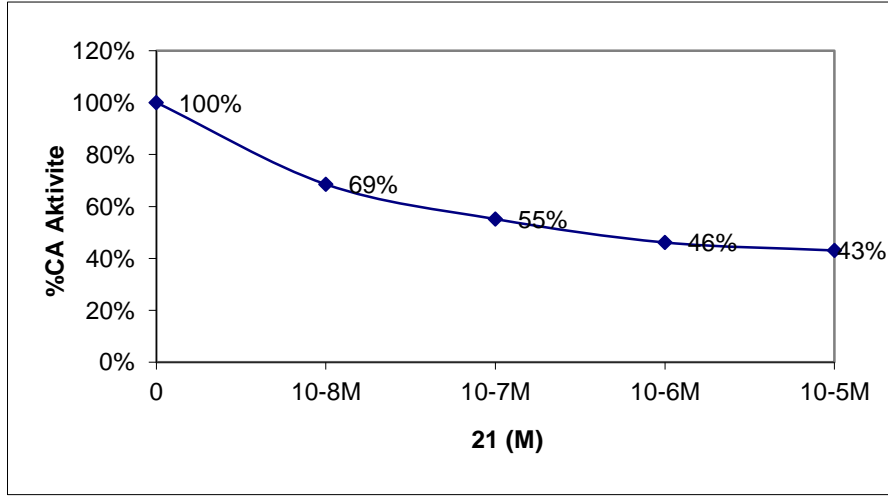
Şekil 3.26 18 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



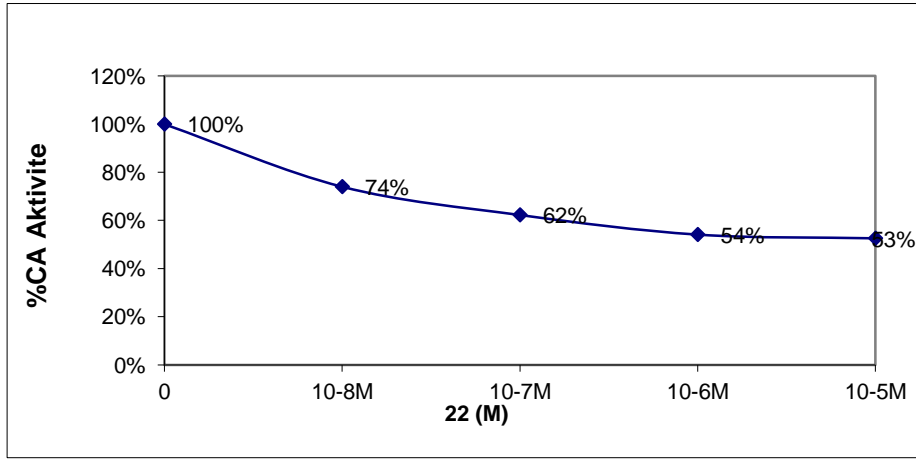
Şekil 3.27 19 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



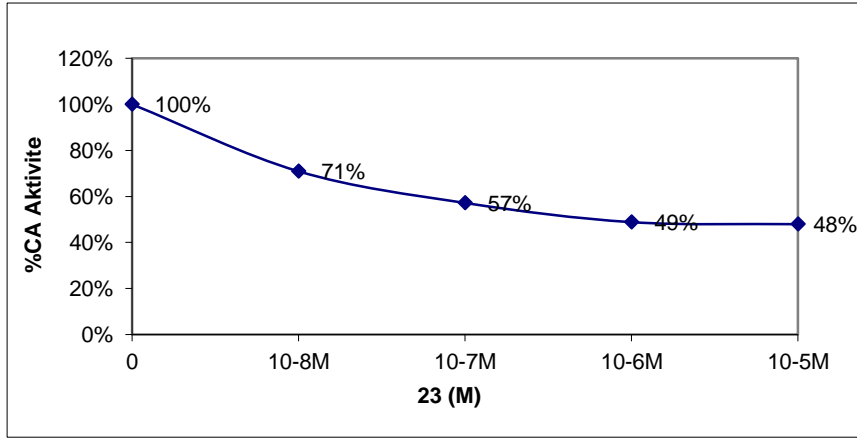
Şekil 3.28 20 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



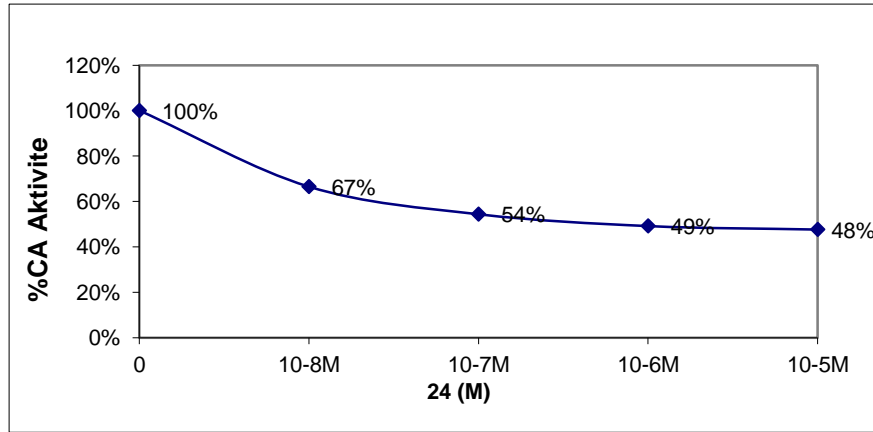
Şekil 3.29 21 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



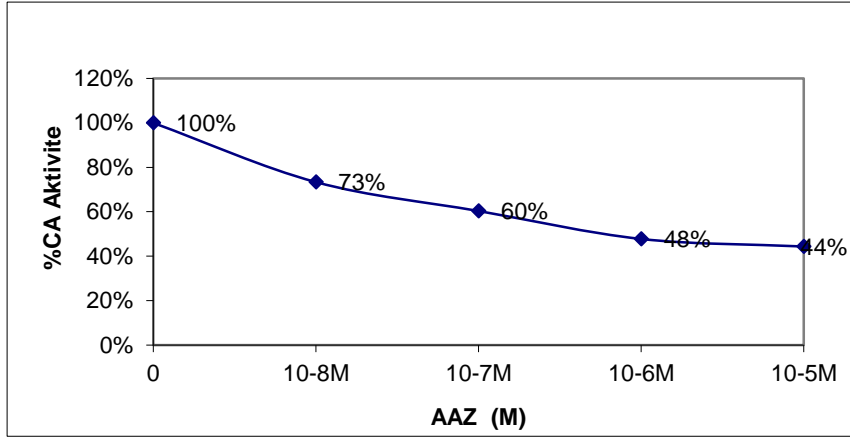
Şekil 3.30 22 nolu inhibitörün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



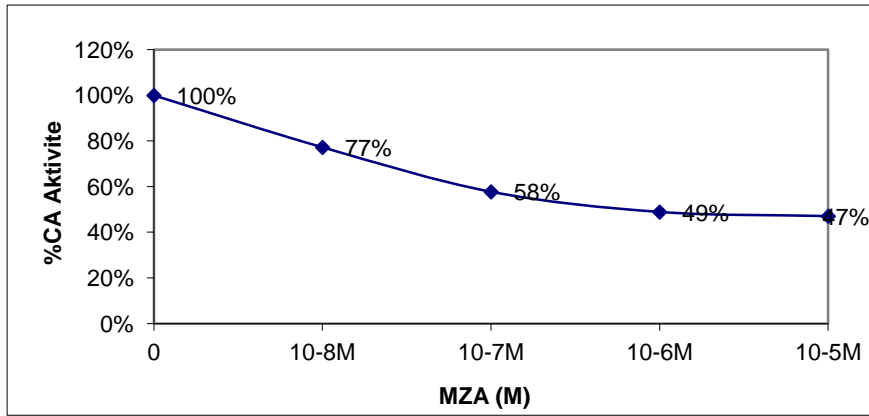
Şekil 3.31 23 nolu inhibitörün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



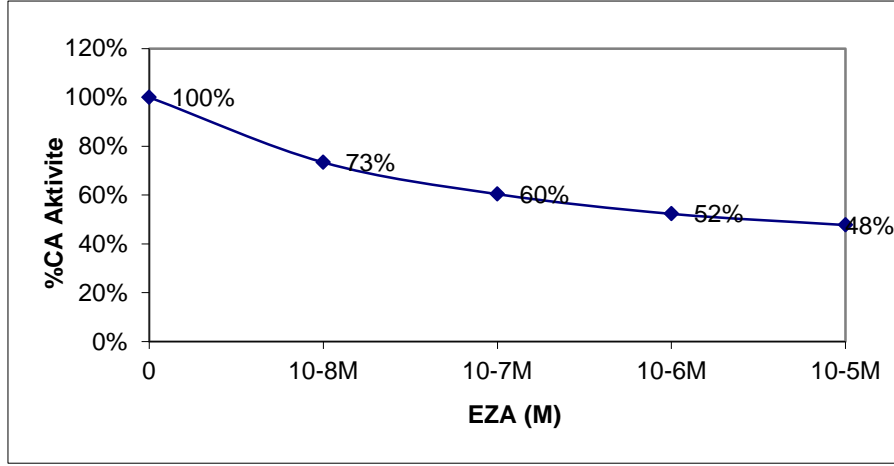
Şekil 3.32 24 nolu inhibitörün SmuCA enzimi enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



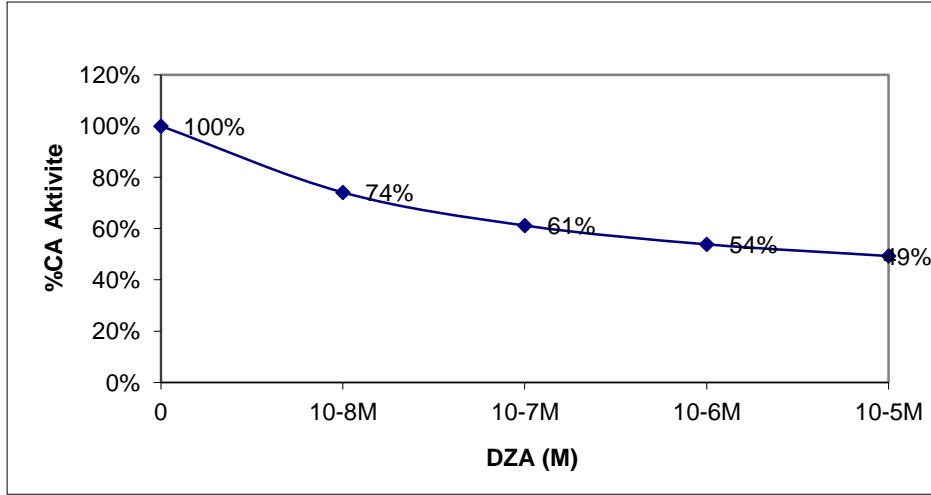
Şekil 3.33 Asetazolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



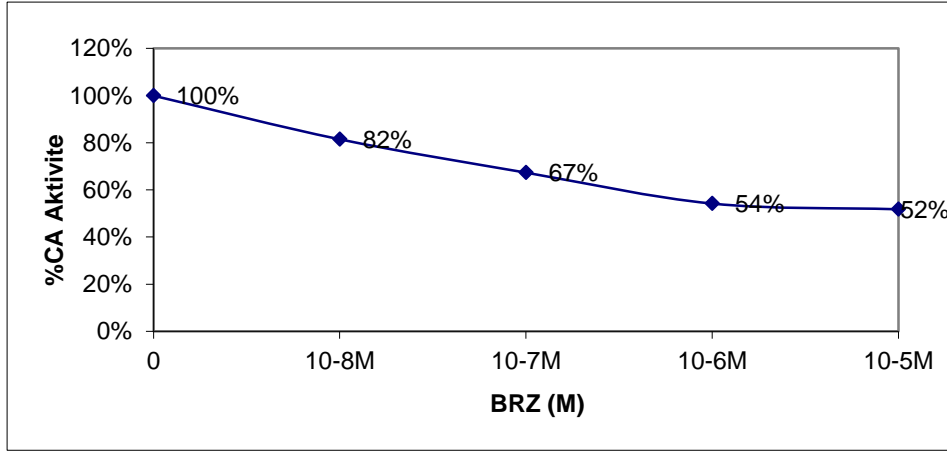
Şekil 3.34 Metazolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



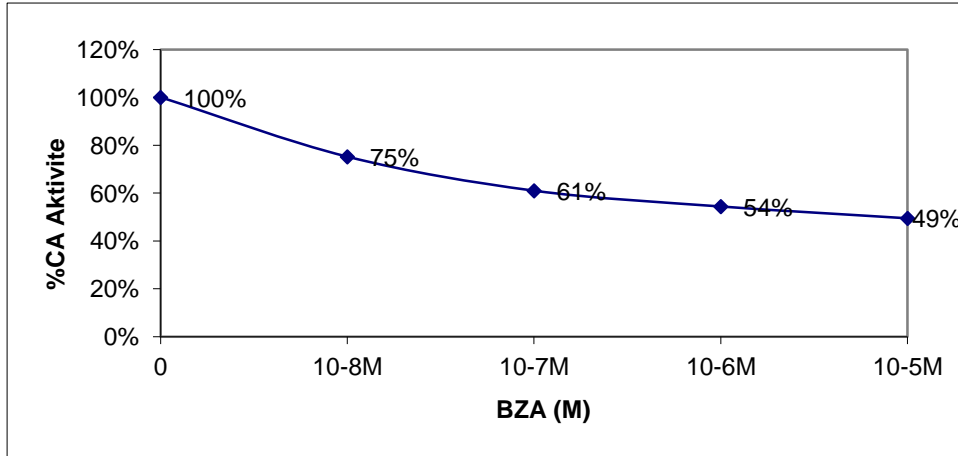
Şekil 3.35 Etokzolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



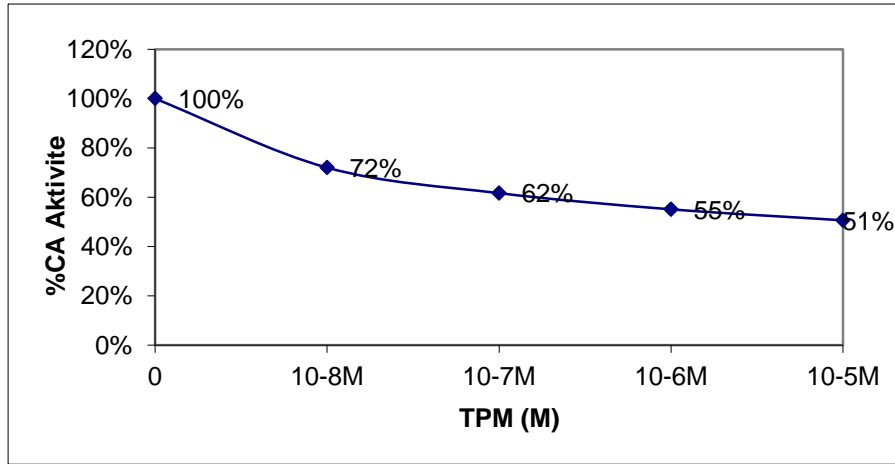
Şekil 3.36 Dorzolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



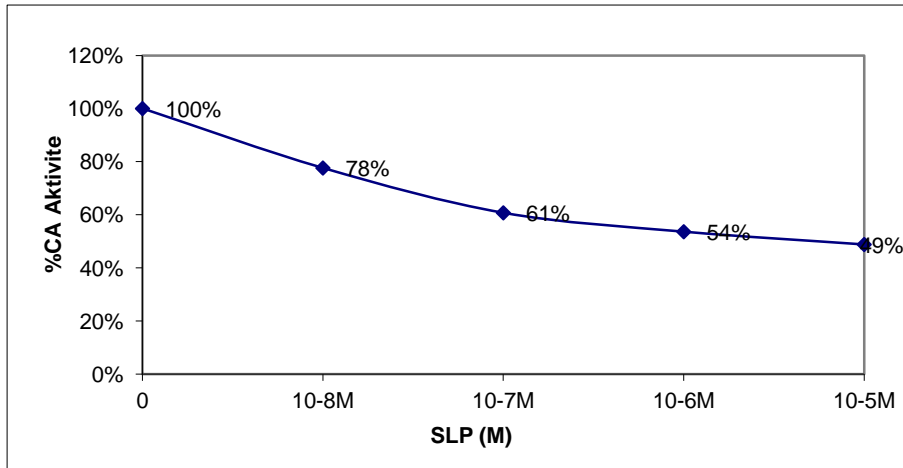
Şekil 3.37 Brinzolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



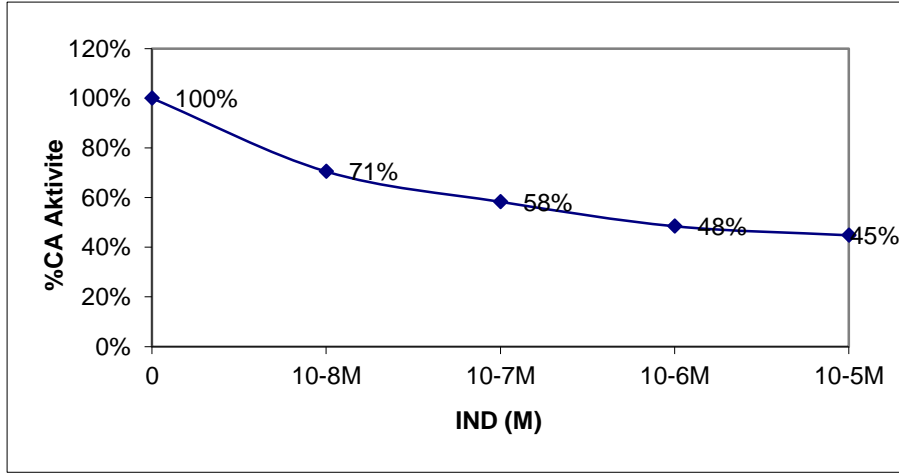
Şekil 3.38 Benzolamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



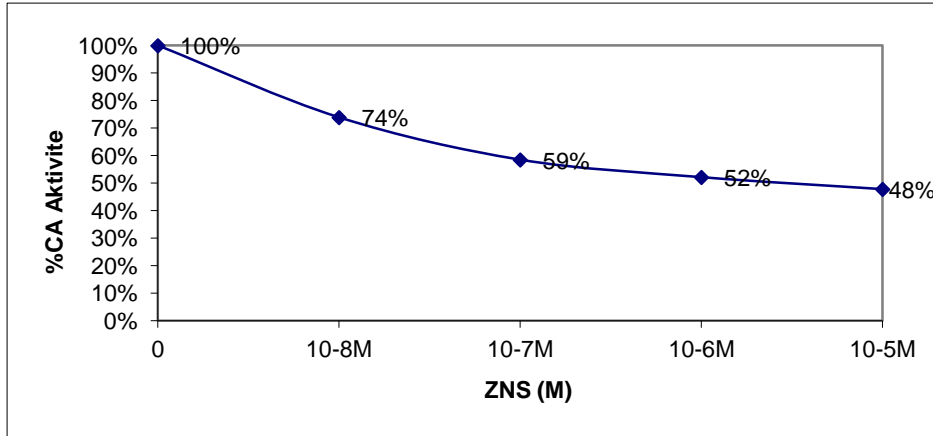
Şekil 3.39 Topiramate sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



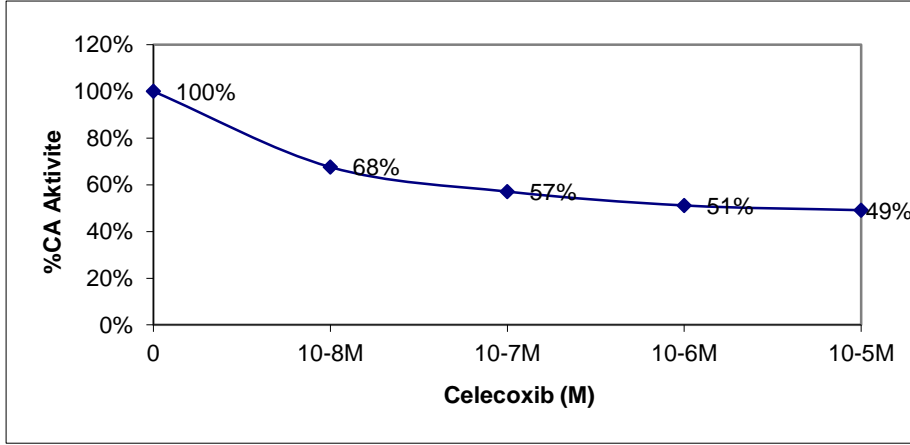
Şekil 3.40 Sulpirid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



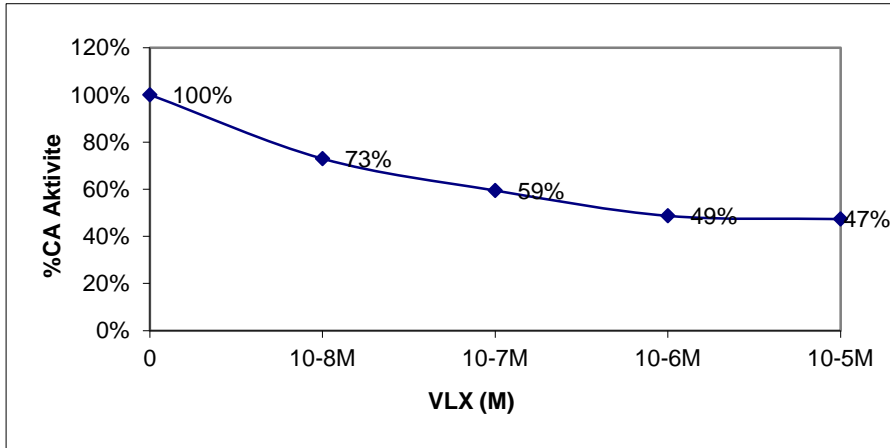
Şekil 3.41 İndisulam sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



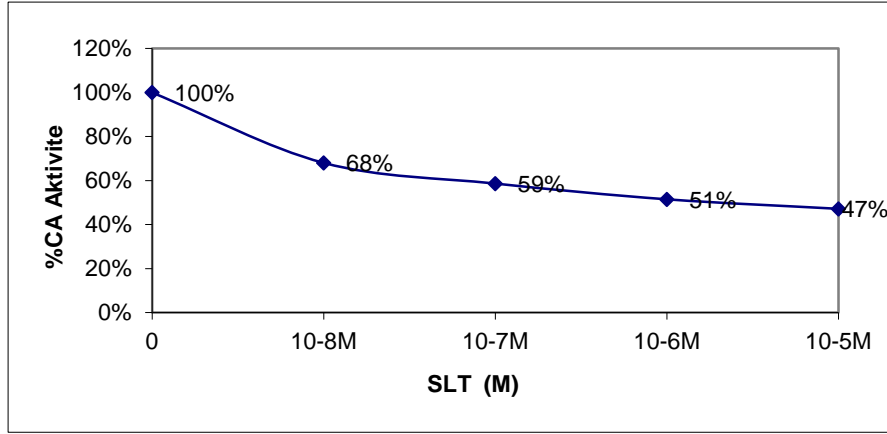
Şekil 3.42 Zonisamid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



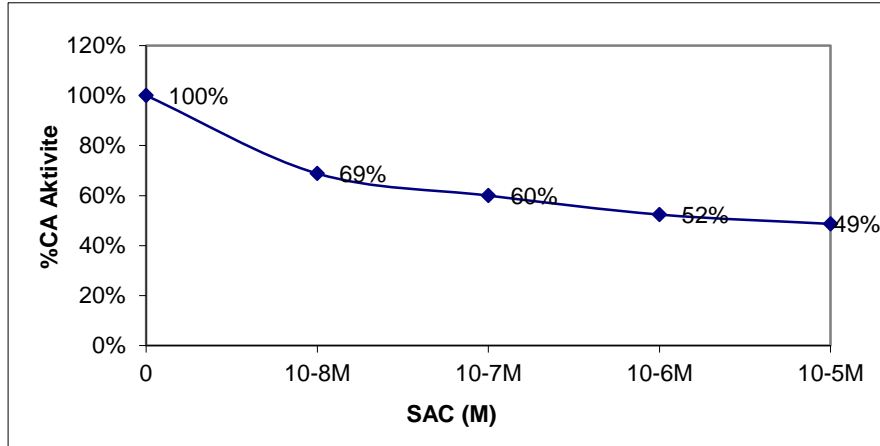
Şekil 3.43 Selekoksib sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



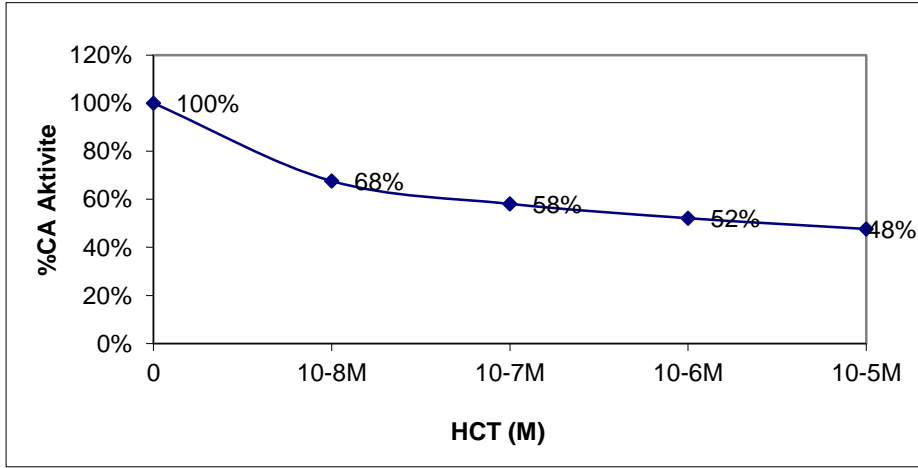
Şekil 3.44 Valdekoksib sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.45 Sultiam sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.46 Sakarin sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.47 Hidroklorotiazid sülfonamid inhibitörünün SmuCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Tablo 3. 2 İnhibitörlerin SmuCA enzimi üzerindeki IC₅₀ ve Ki değerleri

İnhibitör	IC₅₀ ×10⁻⁶M	Ki Değerleri (nM)
1	5,5	2750
2	3,90	1975
3	3,41	1710
4	5,02	2520
5	4,40	2200
6	3,18	1580
7	4,41	2155
8	7,68	3840
9	4,93	246
10	>0,0001	12000
11	2,88	1870
12	6,86	3430
13	8,27	414
14	4013	2050
15	9,36	468

Tablo 3.2 : (Devam)		
16	8,69	4355
17	>0,0001	13500
18	>0,0001	> 50000
19	0,501	250
20	0,912	455
21	0,615	307
22	>0,0001	> 50000
23	0,876	438
24	0,860	430
Asetazolamid	0,839	344
Metazolamid	0,891	445
Etokszolamid	5,58	2430
Diklorfenamid	6,75	2700
Dorzolamid	8,73	4315
Brinzolamid	>0,0001	> 50000
Benzolamid	9,08	4040

Tablo 3.2 : (Devam)		
Topiramet	>0,0001	> 50000
Zonisamid	5,47	3620
Sulpirid	7,74	2710
İndisulam	0,859	412
Valdekoksib	0,889	444
Selekoksib	5,85	2425
Sulthiam	3,97	1865
Sakarın	6,67	3320
Hidroklorotiazid	5,24	2615

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Patojenik bakteri *Streptococcus mutans* dünya çapında büyük bir problem olan diş çürüklerinin ana etkeni olarak dikkate alınmaktadır[1]. Eğer bu diş çürükleri tedavi edilmez ise patojenik bakteri kan dolaşımına girerek tedavi edilmediğinde ölümcül olabilen bakteremia, infekte endokarditis veya kalp kapakçığı enfeksiyonu gibi çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilmektedir[3]. Bu bakterinin önemli bir özelliği de patojenin karyojenitesini güçlendiren intra- ve ekstrasellüler polisakkaritlerin büyük miktarını üretebilmesi özelliğinden dolayı hem asidojenik hem de asidürik olmasıdır[3, 4]. Geleneksel antibiyotik ilaçlar genellikle *S. mutans* tarafından oluşan bakteriyel enfeksiyon için etkili olsalar da antibiyotik direnç probleminden dolayı yeni ilaçlara ihtiyaç artmaktadır [99]. Son yıllarda çoğu *S. mutans* izolatları yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere büyük ölçüde direnç göstermeye başlamışlardır ve bu durum sağlık sistemi için pahalıya mal olurken bir yandan da infekte hastalar için istenmeyen sonuçlara sebep olmaktadır[4, 7, 8].

Bu çalışmada, *Streptococcus mutans* patojenik bakterisinden PCR ile β -sınıfı karbonik anhidraz enzimini kodlayan SMU_328 geni çoğaltılmıştır. Elde edilen gen restriksiyon enzimi ile kesime ihtiyaç duymadan doğrudan pGEM-T Easy vektörüne, daha sonra da ekspresyon amacı ile pET30a vektörüne klonlanarak *E.coli*'ye transforme edilmiştir. Plazmid otomatik dizi analizine gönderilmiş ve alınan sonucun biyoinformatiği yapılmıştır. Elde edilen dizi analizi sonuçları Bölüm 3, Şekil 3.4'de görülmektedir. Yapılan biyoinformatik çalışmalara göre 337. nükleotid olan Guanin (G), adenin (A)' e dönüşmüş. Bu dönüşüm amino asit dizisindeki 113. rezidü olan alaninin (Ala), treonine (Thr) dönüşmesine sebep olmuştur (Şekil 4.1). Yapılan kinetik ve inhibisyon çalışmalarından elde edilen verilerin diğer β -CA'ların kinetik ve inhibisyon verileri ile benzer aralıkta olduğunu göz önüne aldığımızda mutasyonun meydana geldiği amino asit rezidüsünün enzimin aktivitesi üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığını düşünmekteyiz.

```

SmuCA_1.....MVMSYFDNFIKANQAYVDLHGTAHLPLKPKTRVAIVTCMDSRLHVAPALGLALGDAHILR 60
                MVMSYFDNFIKANQAYVDLHGTAHLPLKPKTRVAIVTCMDSRLHVAPALGLALGDAHILR
S.mutans_1 MVMSYFDNFIKANQAYVDLHGTAHLPLKPKTRVAIVTCMDSRLHVAPALGLALGDAHILR 60

SmuCA_61  NAGGRVIDDVIRSLVISEQQLGTSEIVVLHHTDCGAQFTTNAEFTEQLKRDLTVDAGDQD 120
                NAGGRVIDDVIRSLVISEQQLGTSEIVVLHHTDCGAQFTTNAEFTEQLKRDL  VDAGDQD
S.mutans_61 NAGGRVIDDVIRSLVISEQQLGTSEIVVLHHTDCGAQFTTNAEFTEQLKRDLAVDAGDQD 120

SmuCA_121  FLPFTDIEESVREDIALLNKNSPLIPEDIIISGAIYDVTGRVREVN 166
                FLPFTDIEESVREDIALLNKNSPLIPEDIIISGAIYDVTGRVREVN
S.mutans_121 FLPFTDIEESVREDIALLNKNSPLIPEDIIISGAIYDVTGRVREVN 166

```

Şekil 4. 1 Rekombinant olarak üretilen SmuCA'nın amino asit dizisinin *Streptococcus mutans* βCA'sı ile karşılaştırılması

```

SmuCA_beta.....
BsuCA_beta.....
PgiCA_beta.....-MKKIVLFS AAMAMLIACGNQTQTKSDTPTAAVEGR---
FbiCA_beta.....MSAASAFAMNAPS FVNAS SLKKASTSARSGVLSARFTCNSSSSSSSATP PSLIRNEPVFY
VraCA_beta.....MSSSSINGWCLS SI SPAKT SLKKATLRPSVFATLTT---PS SPSSSSSFPSLIQDKPVFY
.....
SmuCA_beta.....-MVMSYFDN-----
BsuCA_beta.....-MPMKNDHSPDQRTLSELF EHN RQ-----
PgiCA_beta.....IGEVL TQDI QQGLTPEA-VLVGLQEGNAR-----
FbiCA_beta.....AAPAPIITPNWTE DGNESYEEA IDALKKTLIEKGELE PVAATRIDQITAQ--AAPDTKA
VraCA_beta.....AAPSHIITPTVREIDMAKDYEQAI EELQKLLREKTELKATAAEKVEQITASLGTSSSDSIP
.....
SmuCA_beta.....-160
BsuCA_beta.....FIKANQAYVDLHGTAHLPL--KPKTRVAIVTCMDSRLHVAPALGLALGD
BsuCA_beta.....WAEKQ---EKDPEYFSRLLSSQRPEFLWIGCSDSRVPANVVTGLQPG
PgiCA_beta.....YVANKQLPRDLNAQAVAGL-EGQFPEALILS CIDS RVPVEYIFDKGIGD
FbiCA_beta.....PFDPPERIKSGFVKFKTEKFVTNPALYDELAKGQSPKFMVFA CSDSRVCP SHVLD FQPG
VraCA_beta.....SSEASDRIKSGFLYFKK KYDKNPALYELAKGQSPKFMVFA CSDSRVCP SHVLD FQPG
.....
SmuCA_beta.....-220-223
BsuCA_beta.....AHILRNAGGRV---TDDVIR---SLVISEQQLGTSEIVVLHHTDCGAQFT-----
BsuCA_beta.....VFVHRNVANLVHRADLNLLS---VLEFVGVLEIKHII VCGHYCGGVRAMDG YGHGI
PgiCA_beta.....LFVGRVAGNVV---DDHMLG---SLEYACEVSGSKVLLVLGHEDCGAIKSAIKGVEMGN
FbiCA_beta.....AFVVRNVANMVPPFDKTKYSGVAVEYAVLHLKVQE IFVIGHRCGGIKLMTFPDEGP
VraCA_beta.....AFVVRNVANIVAPYDQSKYSGTGAIEYAVLHLKVNIVVIGH SACGGIKGLLSFPFDGT
.....
SmuCA_beta.....-NAEFTEQLKR-----DLAVDAGDQDFLPF-TDIE-ESVREDIALLNK-SPLIPE---
BsuCA_beta.....-IDNWLPQIRDI AQANQAE LDTIENTQDRLD--RLCE-LSVSSQVE SLRS-TPVLQSAWK
PgiCA_beta.....-ITSIMEI KPSVEATQYTGERTYANKEFAD--AVVK-ENVIQTMDEIRRDSPILKKLEE
FbiCA_beta.....HSTDFIEDWVKVCLPAKSKVVAEHNGTHLDDQC VLCEKEAVNVSLGNLLT-YPFVRDGLR
VraCA_beta.....YSTDFIEEWVKIGLPAKAKVKTQHG DAPFAELCTHCEKEAVNVSLGNLLT-YPFVRDGLV
.....
SmuCA_beta.....-DIIISGAIYDVTGRVREVN-----
BsuCA_beta.....DGKDIIVHGWMYNLKDGLLRD IGCDC TRNALQFACQPAE
PgiCA_beta.....EG-KIKICGAIYEMSTGKVHFL-----
FbiCA_beta.....NK-TLALKGGHYDFVNGT FELWALDFGLSSPTS V-----
VraCA_beta.....NK-TLALKGGYDFVKGT FELWALDFGLSSPTS V-----
.....

```

Şekil 4. 2 *S. mutans* CA'sının diğer β-CA' lar ile amino asit dizilerinin karşılaştırılması

Bakteri içerisinde ekspre edilen *S. mutans* β -sınıfı karbonik anhidraz (SmuCA) enzimi Ni-NTA afinite kolonu ile yüksek oranda saflaştırılarak bu enzim üzerinde 24 klasik sulfonamid inhibitörü ve klinik amaçlı kullanılan 16 farklı sulfonamid bileşiğinin inhibisyon etkileri incelenmiştir.

S. mutans genomunda SMU_328 geni 166 amino asit rezidüsü ve her bir monomeri 18096 Da moleküler ağırlığında olan dimerik β -CA enzimini kodlamaktadır [100]. Bu yeni β -CA'nın (SmuCA) amino asit dizisi diğer bazı bakteriyel (*B. suis* – BsuCA; *P. gingivalis* – PgiCA; *Vigna radiata* - VraCA)[101,102] ve bitki *Flaveria bidentis* (FbiCA) [103] CA enzimleriyle karşılaştırılmıştır (Şekil 4.2).

Şekil 4.1'den elde edilen verilere göre SmuCA katalitik açıdan önemli olan Zn(II) iyonu ile koordine olan üç rezidüyü (iki sistein ve bir histidin rezidüsü; Cys160, His220 ve Cys223) de içeren bir β -CA'nın tüm tipik özelliklerini göstermektedir. Ayrıca enzimin aktif bölgesinde çinko iyonu ile koordine olan su molekülünün aktivasyonuna dahil olan katalitik çift (Asp162-Arg164), daha önce araştırılan diğer β -CA'larda olduğu gibi SmuCA'da da korunmuştur.

Yeni bir proteinin ekspre edildikten sonra aktif olup olmadığını anlamak için kullanışlı bir yöntem olan protonografi Capasso ve ark. tarafından ilk defa bir patojenik bakteri olan *Vibrio cholera* α -CA ile geliştirilmiştir [98]. SmuCA'nın ekspresyonu sonrasında yapılan protonografi sonucunda enzimin katalitik olarak aktif olduğu belirlenmiştir.

SmuCA aktivitesi ve inhibitörlerin IC₅₀ değerlerini bulmak için Stop Flow kinetik cihazında [104,105] optimum şartlarda CO₂ substratının doygun konsantrasyonunda çalışıldı. Bu amaçla kullanılan Maren metodu CA aktivitesinde bilinen eski ve en çok tercih edilen metottur [106]. Ancak bakteriyel CA'ların, α -CA'lar gibi monomer olmayıp 2'den 6'ya kadar değişen oligomer olmalarından dolayı enzim inhibitör etkileşmesi bu metod ile daha zor olmaktadır ve aktivitesi

gözlemlenememektedir. Bu yüzden çalışmamızda daha hassas olan Stopped Flow cihazı ile aktivite ve inhibisyon ölçümü yapılmıştır.

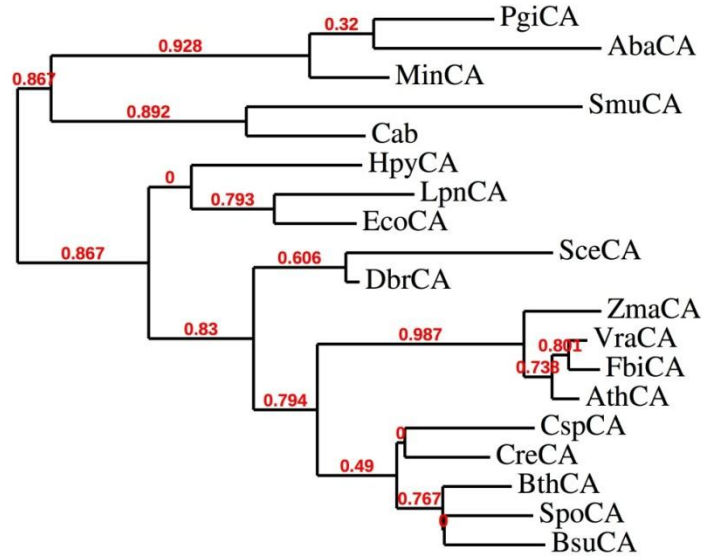
S. mutans β -CA' sınıfının CO₂ hidrataz aktivitesi ölçüldü ve α - (insan hCA I ve II) ve β -sınıfı (PgiCAb, HpyCA, ve BsuCA) enzimlerinin aktivite değerleri ile karşılaştırıldı. Tablo 4.1'den görüldüğü üzere, $4.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1} k_{\text{cat}}$ ve $5.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1} k_{\text{cat}}/K_m$ değerleri ile SmuCA, CO₂' nin bikarbonat ve protona dönüşmesi gibi fizyolojik açıdan önemli bir reaksiyon için iyi bir katalitik aktiviteye sahiptir. Aslında *S. mutans* enziminin katalitik aktivitesi *P. gingivalis* (PgiCAb), *H. pylori* (HpyCA), veya *Brucella suis* (BsuCA), gibi daha önce araştırılmış olan β -CA'lara kıyasla biraz daha iyidir [101,104].

Tablo 4. 1 İnsan sitozolik izoenzimleri hCA I ve II (α -sınıfı); bakteriyel β -CA' lar: PgiCAb, HpyCA, LpCA1, LpCA2 and β -SmuCA tarafından katalizlenen CO₂ hidrasyon reaksiyonu için kinetik parametreler.

Enzim	Sınıf	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ x s ⁻¹)	K _I (asetazolamid) (nM)
hCA I	α	2.0×10^5	5.0×10^7	250
hCA II	α	1.4×10^6	1.5×10^8	12
PgiCAb	β	2.8×10^5	1.5×10^7	214
HpyCA	β	7.1×10^5	4.8×10^7	40
LpCA1	β	3.4×10^5	4.7×10^7	76.8
LpCA2	β	8.3×10^5	8.5×10^7	72.1
SmuCA	β	4.2×10^5	5.8×10^7	344

Bakteri, fungi, alg ve bitkiler gibi bazı organizmaların β -CA'sı ile SmuCA'nın dizisi kıyaslanarak filogenetik analizi yapıldı (Şekil 4.2). SmuCA, *P. gingivalis*, *Escherichia coli* ve anaerobik bakteri *Methanobacterium thermoautotrophicum*'dan Cab gibi diğer bakteriyel enzimlerle bir filogenetik ağacı oluşturuldu [8,102,105]. SmuCA ile en çok benzeyen enzim ilk olarak detaylı bir

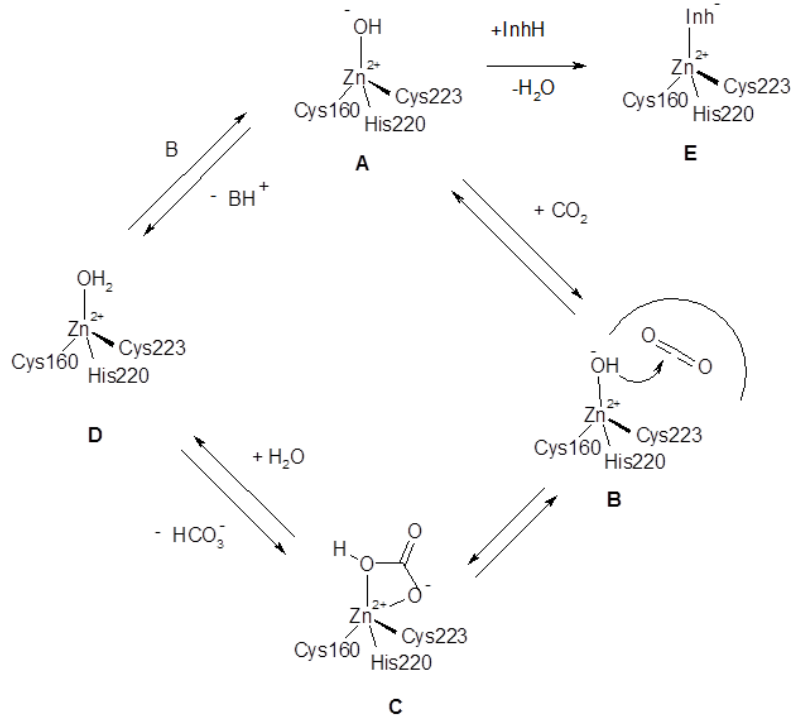
şekilde araştırılan bacterial β -CA olan Cab iken, sonraki ilişkili enzimler *P. gingivalis*, *Acinetobacter baumannii* and *Myroides injenensis*'dandır. Bu ağaçta farklı dallarda kümelenen diğer bakterilerden (*H. pylori*, *L. pneumophila*, *E. coli*, *B. suis*) β -CA'ların SmuCA'nın ait olduğu dallanmadaki diğer bakteriyel enzimlerden oldukça farklı özellikte olması da ilginçtir. Ayrıca bir ağız boşluğu patojeninden (*S. mutans*) CA' nın metan üreten organizma olan, aerobik organizmadan bir enzim, Cab'a neden bu kadar çok benzediği cevaplanması güç bir sorudur.



Şekil 4. 3 Prokaryotik ve ökaryotik türlerden seçilen bazı β -CA'ların filogenetik ağacı

Şekil 4.3'de filogenetik ağaç, program PhyML 3.0. Legend kullanılarak oluşturuldu. Kullanılan türler ve kısaltmaları: SmuCA, *Streptococcus mutans* (Accession number: NP_720781.1); FbiCA, *Flaveria bidentis*, izoform I (Accession number: AAA86939.2); VraCA, *Vigna radiata* (Accession number: AAD27876); SceCA, *Saccharomyces cerevisiae* (Accession number: GAA26059); HpyCA, *Helicobacter pylori* (Accession number: BAF34127.1); PgiCA, *Porphyromonas gingivalis* (Accession number: YP_001929649.1); MinCA, *Myroides injenensis* M09-0166 (Accession number: ZP_10784819); AbaCA, *Acinetobacter baumannii* (Accession number: YP_002326524); Cab, *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Accession number: GI: 13786688); EcoCa, *Escherichia coli* (Accession number:

ACI70660); LpnCA, *Legionella pneumophila* (Accession number: YP_003619232); DbrCA, *Dekkera bruxellensis* AWRI1499 (Accession number: EIF49256); SpoCA, *Schizosaccharomyces pombe* (Accession number: CAA21790); CspCA, *Coccomyxa* sp. (Accession number: AAC33484.1); CreCA, *Chlamydomonas reinhardtii* (Accession number: XP_001699151.1); BsuCA, *Brucella suis* (Accession number: NP_699962.1); BthCA, *Burkholderia thailandensis* (Accession number: ZP_02386321); AthCA, *Arabidopsis thaliana* (Accession number: AAA50156); ZmaCA, *Zea mays* (Accession number: NP_001147846.1).



Şekil 4.4 SmuCA için önerilen katalitik mekanizma (SmuCA aminoasit numaralandırılması)

CA'ların katalizi ve inhibisyonu metal merkeze bağlanan çoğu inhibitör türleri için iyi bilinen bir süreçtir (Şekil 4.4). İncelenen tüm sınıflarda olduğu gibi,

SmuCA'nın şekilden de görüldüğü üzere aktif bölgede bulunan CO₂ molekülüne saldıran ve onu nükleofilik saldırıya uygun pozisyona yönlendiren (Şekil 4.4 B) katalitik döngüde aktif nükleofil olarak bir çinko hidroksit türü (Şekil 4.4 A) içermektedir. CO₂ böylece Şekil 4.4 C'de de görüldüğü gibi Zn(II) iyonu ile iki dişli koordine olan bikarbonata dönüşür ve ondan sonra bikarbonat iyonu bir su molekülü ile yerdeğiştirerek çözeltiye geçer ve enzimin katalitik olarak inaktif olduğu asidik formuna dönüşür(Şekil 4.4 D). Bu form genellikle aktif bölgedeki amino asit rezidüleri yardımıyla su ile kordine metal iyondan bir protonun çözeltiye transferi ile katalitik olarak aktif hale dönüşür (Şekil 4.4 A). α -CA'ların aksine β -CA'ların hem CO₂ bağlama bölgesi hem de proton mekik rezidüleri detaylı olarak bilinmemektedir. Sülfonamid inhibitörleri genellikle aktif merkezde metal iyonu ile dördüncü, proteinden olmayan, koordinasyonunu değişmesiyle koordine olurlar (Şekil 4.4 E)

39 sülfonamid ve bir sülfamatı içeren 40 bileşik bu çalışmada da kullanıldığı üzere daha önce α -, β - veya γ -CA'lar için inhibitör olarak araştırılmıştır. 1-24 türev ve AAZ-HCT bileşikleri farmokolojik ajan olarak yaygın olarak kullanılan aromatik/heterosiklik sülfonamidlerdir. Tablo 4.2'deki veriler stopped flow CO₂ hidrataz analizi ile SmuCA' nın bu sulfonamidler/sülfamat ile inhibisyon verilerini göstermektedir. Ayrıca Tablo 2'de en yaygın iki insan izoformu hCA I ve II (α -sınıfına ait) ve *H. pylori* ve *P. gingivalis*' den bakteriyel β -CA'lar da kıyaslama amaçlı gösterilmiştir.

18 ve 22 nolu bileşik ile BRZ ve TPM SmuCA' yı 50 μ M konsantrasyona kadar önemli ölçüde inhibe edemezken inhibisyon sabiti 12 ve 13.5 μ M arasında değişen bileşik 10 ve 17 de oldukça zayıf bir inhibisyon etkisi göstermiştir.

Test edilen bileşiklerin büyük çoğunluğu SmuCA için Ki değeri 1.58 – 4.35 μ M arasında değişen mikromolar seviyede inhibisyon etkisi göstermiştir. Bunlar **1-8, 11, 12, 14, 15** nolu türevler ve **EZA, DCP, DZA, BZA, ZNS, SLP, CLX, SLT, SAC** ve **HCT** gibi klinik amaçlı kullanılan sülfonamidlerdir (Bölüm 2, Tablo 2.18). Bu nedenle küçük ve kompakt grupları içeren (amino, aminoalkil, halojen,

hidroksialkil) benzensülfonamidler, heterosiklik mono- veya bisiklik halkalı sistemler (deasetile MZA'da görülen 1,3,4-thiadiazolin, EZA'da bulunan benzothiazole vb.) ve SO₂NHCO grubu içeren asillenmiş sulfonamide (SAC) bu türler arasındadır. Her ne kadar küçük yapısal değişiklikler oldukça farklı inhibisyon profiline yol açsa da yapı ve aktivite arasındaki ilişki anlaşılması kolay değildir. Örneğin, halojenosülfonamid 7-9'lari örnek alacak olursak, floro (7) ve kloro(8) türevleri ile inhibisyon oldukça kötü iken brom substitute bileşik 9 K_I 246 nM ile şüana kadar belirlenen en iyi SmuCA inhibitörüdür (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 İnsan izoformları hCA I ve hCA II ve *H. pylori* (HypCA), *P. gingivalis* (PgiCAb) and *S. mutans* (SmuCA) gibi bazı β-sınıfı bakteriyel CA enzimlerinin klasik **1-24** ve klinik amaçlı kullanılan **AAZ – HCT** sülfonamidlerle inhibisyonu

Inhibitor/ Enzim Sınıfı	K _I (nM)				
	hCA I α	hCA II α	HpyCA β	PgiCAb β	SmuCA β
1	28000	300	nt	477	2750
2	25000	240	1845	715	1975
3	79	8	nt	364	1710
4	78500	320	2470	710	2520
5	25000	170	2360	783	2200
6	21000	160	3500	475	1580
7	8300	60	1359	818	2155
8	9800	110	1463	4525	3840
9	6500	40	1235	6620	246
10	7300	54	nt	5040	12000
11	5800	63	973	4765	1870
12	8400	75	640	3898	3430
13	8600	60	2590	7100	414
14	9300	19	768	>20000	2050
15	5500	80	nt	>20000	468
16	9500	94	236	8955	4355

Tablo 4.2 (devamı)

17	21000	125	218	>20000	13500
18	164	46	450	>20000>	50000
19	109	33	38	9150	250
20	6	2	64	7645	455
21	69	11	nt	6450	307
22	164	46	nt	3405	50000
23	109	33	87	9240	438
24	95	30	71	7960	430
AAZ	250	12	40	214	344
MZA	50	14	176	393	445
EZA	25	8	33	280	2430
DCP	1200	38	nt	>20000	700
DZA	50000	9	73	2415	4315
BRZ	45000	3	128	408	> 50000
BZA	15	9	54	2675	4040
TPM	250	10	32	4250	> 50000
ZNS	56	35	254	345	3620
SLP	1200	40	35	1470	2710
IND	31	15	143	1353	412
VLX	54000	43	nt	2395	444
CLX	50000	21	nt	4150	2425
SLT	374	9	nt	3140	1865
SAC	18540	5959	nt	2244	3320
HCT	328	290	nt	1572	2615

nt: test edilmedi

Örneğin, halojenosülfonamid 7-9'lari örnek alacak olursak, floro (7) ve kloro(8) türevleri ile inhibisyon oldukça kötü iken brom substitute bileşik 9 K_I 246 nM ile şuana kadar belirlenen en iyi SmuCA inhibitörüdür (Tablo 4.2). Her ne kadar yapıları

birbirine benzese de CLX ve VLX bileşikleri arasında oldukça farklı bir inhibitör etkisi vardır. Buradan da anlaşıldığı üzere inhibitör molekülünün yapısındaki ufak yapısal değişiklikler çoğu CA inhibitörlerinin farklı sınıf CA enzimlerine karşı afinitesinde dramatik değişikliklere yol açmaktığı görülmektedir [44,62,106].

En etkili SmuCA inhibitörleri ise bromosülfonamid (9), deasetile asetazolamid (13), 4-hidroksimetilbenzensülfonamid (15), primidin-yerdeğiştirmiş sülfonamid (19), aminobenzolamid (20), yapısal olarak benzer bileşikler 21,23 ve 24 ve ayrıca AAZ, MZA, IND ve VLX bileşikleridir. Bu bileşikler inhibisyon sabiti 246 ve 468 nM arasında değişen inhibisyon etkisi göstermişlerdir (Tablo 4.2). Tüm bu bileşikler çinko koordine eden yapı olarak ya benzensülfonamid ya da 1,3,4-thiadiazol-2-sülfonamid ihtiva etmektedirler ve genellikle ya küçük gruplar (bromür, hidroksi metil) veya daha büyük lineer sülfonil tipte gruplar (aminobenzolamid ve 21,23 ve 24 gibi yapıca benzer bileşiklerde görülen) ihtiva etmektedirler. Ancak bileşik 22 aminobenzolamid ve diğer 23, 24 nolu bileşiklere yapıca benzese de etkili bir CAI özelliği göstermemiştir.

Tablo 4.2’de açıkça görüldüğü gibi hCA II, HpyCA ve hatta PgiCAb gibi diğer enzimlere kıyasla SmuCA, sülfonamid inhibisyonuna karşı çok duyarlı değildir. Bu enzimler arasından her ikisi arasındaki farklılıklar belirgin olsa da SmuCA ile inhibisyon profili en çok benzeyen *Porphyromonas* enzimidir. Büyük oranda $KI < 100$ nM gösteren ve dolayısıyla bu tür inhibitörlere karşı en hassas olanı *Helicobacter* enzimidir (bu durum SmuCA veya PgiCAb için gözlemlenmemiştir).

SmuCA sindirimin ilk aşamasında ağız boşluğunda oluşan asidik ortamda çalışması gereken bir enzimdir ve muhtemelen bu durum onu sülfonamidlerle gösterdiği nanomolar seviyedeki inhibisyon profili [104] ile bir insan α -CA izoformu olan ve tükürüğe salgılanan hCA VI ile benzer yapmaktadır. Son zamanlarda Parkilla ve ark., CAVI-içermeyen farelerin tükürüklerinde CA VI içeren normal farelere kıyasla daha düşük oranda çürük geliştirmeye meyilli olduğunu rapor etmişlerdir [106] ve bu durum tükürük CA VI inhibisyonunun bir antikaryojenik strateji

olduğunun güçlü bir göstergesidir [103]. Ayrıca, *S. mutans*'ın oral kolonizasyonu ve çürük gelişimi tükrükte CA VI ekspresyonunun delesyonu ile azalmaktadır [107]. Bu nedenle uygun ve güçlü sülfonamidlerin kullanılmasıyla tükrükte bulunan hem insan (CA VI) ve hem de bakteriyel (SmuCA) enzimlerin inhibisyonu önemlidir.

Sonuç olarak bu yeni enzim için etkili inhibitörlerin belirlenmesi *S. mutans* CA'sının diş çürüğündeki rolünün anlaşılması için uygun farmakolojik araçlara öncülük edebilir ve nihayetinde yeni bir antibakteriyel mekanizma ile farmakolojik ajanların geliştirilmesi sağlanabilir.

Sonuç olarak yapılan çalışmada aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

- PCR ile genomik DNA'dan bir β -sınıfı CA kodlayan SMU_328 geni çoğaltılmıştır.
- PCR ürünü gen pGEM-T Easy vektörüne ve daha sonra da bir ekspresyon vektörü olan pET 30a' ya klonlanmıştır.
- İlgili geni içeren pET 30a vektörü BL21(DE3) E. coli ekspresyon soyu içerisine transforme edilerek *S. mutans* β -sınıfı CA'nın (SmuCA) gen ifadesi gerçekleştirilmiştir.
- Protein saflaştırma öncesi bakteri hücreleri liziz yapılarak SDS-PAGE elektroforezi ile proteinin görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca protonografi ile ekspre edilen proteinin katalitik olarak aktif olduğu tespit edilmiştir.
- Ni-NTA kolonu ile SmuCa enzimi saflaştırılarak SDS-PAGE ile saflık kontrolü yapılmıştır. Elde edilen jel görüntüsüne göre enzimin yüksek oranda saflaştırıldığı sonucuna ulaşılmıştır.
- *S. mutans* β -CA' sınıfın CO₂ hidrataz aktivitesi ölçülerek diğer bazı α - (insan CA I ve II) ve β -sınıfı (PgiCAb, HpyCA, ve BsuCA) enzimlerinin aktivite değerleri ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda SmuCA'nın katalitik aktivitesinin diğer β -sınıfı CA'lar ile benzer olduğu gösterilmiştir.

- 39 sülfonamid ve bir sülfamatı içeren 40 bileşik (1-24 sülfonamid türevi ve klinik olarak kullanılan AAZ-HCT bileşikleri) bu çalışmada kullanılarak enzimin aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Elde edilen K_i değerleri bazı İnsan izoformları (hCA I ve hCA II) ve *H. pylori* (HypCA), *P. gingivalis* (PgiCAb) gibi bazı β -sınıfı bakteriyel CA enzimlerinin inhibisyon sabitleri ile karşılaştırılmıştır.
- En etkili SmuCA inhibitörleri inhibisyon sabiti 246 ve 468 nM arasında değişen bromosulfanilamid (9), deasetile asetazolamid (13), 4-hidroksimetilbenzensülfonamid (15), pirimidin-yerdeğiştirmiş sulfanilamid (19), aminobenzolamid (20) ve yapıcı benzeri olanlar (21, 23 ve 24) ile birlikte asetazolamid, metazolamid, indisulam ve valdekoksib olarak belirlenmiştir.

Elde edilen verilere göre *S. mutans* β -CA'sının sülfonamidler ile nanomolar seviyedeki inhibisyonun, patojenin büyümesinin engellenmesinde antiinfektif etki gösteren yeni ilaçların tasarımı için öncülük edebileceğini düşünmekteyiz.

5. KAYNAKLAR

- [1] Ajdic, D., McShan, W.M., McLaughlin, R.E., Savic, G., Chang J., Carson MB, et al., “Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 4434-9, (2002).
- [2] Marsh, P.D., “Are dental diseases examples of ecological catastrophes”, *Microbiology*, 149, 279-94, (2003).
- [3] Nakano, K., Nomura, R., Ooshima, T., “*Streptococcus mutans* and cardiovascular diseases”, *Japanese Dental Science Review*, 44, 29-37, (2008).
- [4] Dhamodhar, P., Karthik, C., Neha, R., Shantha, G., Varuvelil, J.G., “Antibacterial efficacy of *Syzygium aromaticum* extracts on multi-drug resistant *Streptococcus mutans* isolated from dental plaque samples”, *J. Biochem Tech*, 3, 155-7, (2012).
- [5] Axel, C., “Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104”, *Veterinary Research*, 32, (2001).
- [6] Ginsberg, A.M., “Emerging drugs for active tuberculosis”, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 29, 552-9, (2008).
- [7] Dye, C., “Doomsday postponed? Preventing and reversing epidemics of drug-resistant tuberculosis”, *Nature Reviews Microbiology*, 7, 81-7, (2009).
- [8] Supuran, C.T., “Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics”, *Frontiers in Pharmacology*, 2, 34, (2011).
- [9] Puskas, L.G., Inui M., Zahn, K., Yukawa, H., “A periplasmic, alpha-type carbonic anhydrase from *Rhodospseudomonas palustris* is essential for bicarbonate uptake”, *Microbiology*, 146, 2957-66, (2000).
- [10] Del Prete, S., Vullo, D., Fisher, G.M., Andrews, K.T., Poulsen, S.A., Capasso, C., et al., “Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum* the eta-carbonic anhydrases”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 4389-96, (2014).
- [11] Supuran, C.T., “Carbonic anhydrase inhibitors”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 3467-74, (2010).

- [12] McDevitt, M.E., Lambert. L.A., “Molecular evolution and selection pressure in alpha-class carbonic anhydrase family members”, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1814, 1854, 61, (2011).
- [13] Alterio, V., Di Fiore, A., Ambrosio. K., Supuran, C.T., De Simone, G., “Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms” *Chemical reviews*, 112, 4421, 68, (2012).
- [14] Leppilampi, M., “Functional and Immunohistological Studies on Cancer-associated Carbonic Anhydrase IX”, Oulu, U, *Faculty of Medicine*, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, Finland, (2006).
- [15] Supuran, C.T., Scozzafava, A., “Carbonic anhydrases as targets for Medicinal Chemistry”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 4336, 50, (2007).
- [16] Alkon, M., “Carbonic anhydrase gating of attention: memory therapy and enhancement”, *Trends in Pharmacological Sciences*, 23, 83, 9, (2002).
- [17] Peker, M.S., “Streptococcus Mutans'ın Anne-Çocuk Geçişinin AP-PCR Metoduyla Saptanması ve Diş Çürüğü İle İlişkisi”, Doktora Tezi, *Marmara Üniversitesi*, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (2007).
- [18] Hata, S., Mayanagi, H., “Acid Diffusion Through Extracellular Polysaccharides Produced by Various Mutants of Streptococcus Mutans”, *Archives of Oral Biology*, 48, 431, 8, (2003).
- [19] Krzysciak, W., Jurczak, A., Koscielniak, D., Bystrowska, B. and Skalniak, A., “The Virulence of Streptococcus Mutans and the Ability to form Biofilms”, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33, 499-515, (2014).
- [20] Lendenmann, U., Grogan, J. and Oppenheim, F.G., “Saliva and Dental Pellicle-A Review”, *Advances in Dental Research*, 14, 22, 8, (2000).
- [21] Maruyama, F., Kobata, M., Kurokawa, K., Nishida, K., Sakurai, A., Nakano, K., et al. “Comparative genomic analyses of Streptococcus mutans provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content”, *BMC Genomics*, 10, 358, (2009).
- [22] Banas, J.A., Biswas, S. and Zhu, M., “Effects of DNA Methylation on Expression of Virulence Genes in Streptococcus Mutans”, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 7236, 42, (2011).

- [23] Klengel, T., Liang, W.J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schroppel, K., Naglik, J.R., et al. “Fungal Adenylyl Cyclase Integrates CO₂ Sensing with cAMP Signaling and Virulence” *Current Biology : CB*, 15, 2021, 6, (2005).
- [24] Bahn, Y.S., Cox, G.M., Perfect, J.R. and Heitman, J., “Carbonic Anhydrase and CO₂ Sensing During *Cryptococcus Neoformans* Growth, Differentiation, and Virulence”, *Current Biology : CB*, 15, 2013, 20, (2005).
- [25] Innocenti, A., Muhlschlegel, F.A., Hall, R.A., Steegborn, C., Scozzafava, A., Supuran, C.T., “Carbonic Anhydrase Inhibitors: Inhibition of the beta-class Enzymes from the Fungal Pathogens *Candida Albicans* and *Cryptococcus Neoformans* with sSimple Anions”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18, 5066, 70, (2008).
- [26] Işık, S., Koçkar. F., Aydin, M., Arslan, O., Güler, O.O., Innocenti, A., et al. “Carbonic Anhydrase Inhibitors: Inhibition of the beta-class Enzyme from the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* with Sulfonamides and Sulfamates”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 1158, 63, (2009).
- [27] Jeff, D., Cronk, R.S.R., Kam Y.J.Z., Chingkuang, T., Endrizzi, J., Lee, J., Gareiss P.C. and Preiss J.R., “Identification of a Novel Noncatalytic Bicarbonate Binding Site in Eubacterial β -Carbonic Anhydrase”, *Biochemistry*, 45, 4351, 61, (2006).
- [28] Innocenti, A., Hall, R.A., Schlicker, C., Scozzafava, A., Steegborn, C., Muhlschlegel, F.A., et al. “Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition and Homology Modeling Studies of the Fungal beta-Carbonic Anhydrase from *Candida Albicans* with Sulfonamides”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 4503, 9, (2009).
- [29] Syrjanen, L., Parkkila, S., Scozzafava, A., Supuran, C.T., “Sulfonamide Inhibition Studies of the beta Carbonic Anhydrase from *Drosophila Melanogaster*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24, 2797, 801, (2014).
- [30] Sudaratana, R., Krungkrai, N.S., Sunant, R., Jerapan, K., “Characterisation of Carbonic Anhydrase in *Plasmodium Falciparum*” *International Journal for Parasitology*, 31,661,8, (2001).
- [31] Heinhorst, S., Williams, E.B., Cai, F., Murin, C.D., Shively, J.M., Cannon, G.C., “Characterization of the Carboxysomal Carbonic Anhydrase CsoSCA from *Halothiobacillus Neapolitanus*”, *Journal of Bacteriology*, 188, 8087, 94, (2006).
- [32] Ferry, B., “A carbonic anhydrase from the archaeon *Methlinsarcina thermophila*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 6909, 13, (1994).

- [33] Satoshi, M., Eiki, Y., Masaki, Y., Takashi, K., Hideaki, M., Tatzuo, U., Shigetoh, M. and Tomitake, T., “X-ray Structure of β -Carbonic Anhydrase from the Red Alga, *Porphyridium purpureum*, Reveals a Novel Catalytic Site for CO₂ Hydration”, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 5521, 6, (2000).
- [34] Pai, M., “The Active Site Architecture of *Pisum Sativum* β -carbonic Anhydrase is a Mirror Image of that of α -Carbonic Anhydrases”, *The EMBO Journal*, 19, 1407, 18, (2000).
- [35] Tina, M., Iverson B., Caroline, K., James, G. and Douglas, C. R., “A Closer Look at the Active Site of γ -Class Carbonic Anhydrases: High-Resolution Crystallographic Studies of the Carbonic Anhydrase from *Methanosarcina thermophila*”, *Biochemistry*, 39, 9222, 31, (2000).
- [36] Park, H., Song, B., Morel, F.M., “Diversity of the Cadmium-Containing Carbonic Anhydrase in Marine Diatoms and Natural Waters”, *Environmental Microbiology*, 9, 403, 13, (2007).
- [37] M.F. Sugrue, P.G., Mallorga, P., Nolan, T.E., Graham, S.L., Schwam, H., Shepard, K.L. and Smith, R.L., “L-662,583 is a Topically Effective Ocular Hypotensive Carbonicanhydrase Inhibitor in Experimental Animals”, *British Journal of Pharmacology*, 99, 59, 64, (1990).
- [38] McIntosh, J.E., “Carbonic Anhydrase Isoenzymes in the Erythrocytes and Dorsolateral Prostate of the Rat”, *Biochemical Journal*, 114, 463, 76, (1969).
- [39] Thomas, P., Kubis, H. and Gros, G., “Properties of a Carbonic Anhydrase Inhibitor Protein In flounder Serum”, *The Journal of Experimental Biology*, 203, 3003, 9, (2000).
- [40] Kerry, S., “Prokaryotic carbonic anhydrases”, *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 335, 66, (2000).
- [41] Lindskog, S., “Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase”, *Pharmacology and Therapeutics*, 74, 1, 20, (1997).
- [42] Gilmour, K.M., “Perspectives on Carbonic Anhydrase”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 157, 193, 7, (2010).
- [43] De Simone, G., Supuran, C.T., “Carbonic anhydrase IX: Biochemical and Crystallographic Characterization of a Novel Antitumor Target”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 404, 9, (2010).
- [44] Supuran, C.T., “Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators”, *Nature reviews Drug Discovery*, 7, 168, 81, (2008).

- [45] J. V. MORONEY SGBGS., “Carbonic Anhydrases in Plants and Algae. *Plant, Cell and Environment*, 24, 141, 53, (2001).
- [46] Mem, E.S.R. and Coleman, J.R., “Identification and Characterization of a Gene Encoding a Vertebrate-type Carbonic Anhydrase in Cyanobacteria”, *Journal of Bacteriology*, 179, 769, 74, (1997).
- [47] Karlsson, J., Chen, Z., Huggins, S., Park, Y., V. Moroney, J. and Göran, S., “A novel α -type Carbonic Anhydrase Associated with the Thylakoid Membrane in *Chlamidomonas Reinhardtii* is Required for Growth at Ambient CO_2 ”, *The EMBO Journal*, 17, 1208, 16, (1998).
- [48] Laura, C., Chirica, B.E., Bengt-Harald, J. and Sven, L., The Complete Sequence, Expression in *Escherichia Coli*, Purification and Some Properties of Carbonic Anhydrase from *Neisseria Gonorrhoeae* European”, *Journal of Biochemistry*, 755, 60, (1997).
- [49] Laura, C. Chirica, B.E., Sven, L., “Cloning, Expression and Some Properties of K-Carbonic Anhydrase from *Helicobacter Pylori*”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544, 55, 63, (2001).
- [50] Del Prete, S., Işık, S., Vullo, D., De Luca, V., Carginale, V., Scozzafava, A., et al., “DNA Cloning, Characterization and Inhibition Studies of an alpha-Carbonic Anhydrase from the Pathogenic Bacterium *Vibrio Cholerae*”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 10742, 8, (2012).
- [51] Kerry, S., Smith, C.J., Thomas, S. and James, G. F., “Carbonic anhydrase is an Ancient Enzyme Widespread in Prokaryotes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 15184, 9, (1999).
- [52] Syrjanen, L., Vermelho, A.B., Rodrigues, A., Corte, S., Salonen, T., Pan, P., et al. “Cloning, Characterization and Inhibition Studies of a beta-Carbonic Anhydrase from *Leishmania Donovanii* Chagasi, the Protozoan Parasite Responsible for Leishmaniasis”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 7372, 81, (2013).
- [53] Hewitson, K.S., Vullo, D., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., “Molecular Cloning, Characterization and Inhibition Studies of a beta-Carbonic Anhydrase from *Malassezia Globosa*, a Potential Antidandruff Target”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 3513, 20, (2012).
- [54] Hoffmann, K.M., Million-Perez, H.R., Merkhofer, R., Nicholson, H., Rowlett, R.S., “Allosteric Reversion of *Haemophilus influenzae* beta-Carbonic Anhydrase via a Proline Shift”, *Biochemistry*, 54, 598, 611, (2015).
- [55] Lehneck, R., Neumann, P., Vullo, D., Elleuche, S., Supuran, C.T., Ficner, R., et al., “Crystal Structures of Two Tetrameric beta-Carbonic Anhydrases from the Filamentous Ascomycete *Sordaria Macrospora*”, *The FEBS Journal*, 281, 1759, 72, (2014).

- [56] Shenghua, H., Elisabeth, S.E., Laura, C.J., “Crystal Structure of Carbonic Anhydrase from *Neisseria Gonorrhoeae* and its Complex with the Inhibitor Acetazolamide” *Journal of Molecular Biology*, 301,10, (1998).
- [57] Vullo, D., Nishimori, I., Minakuchi, T., Scozzafava, A., Supuran, C.T., “Inhibition Studies with Anions and Small Molecules of two Novel beta-Carbonic α Anhydrases from the Bacterial Pathogen *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21, 3591, 5, (2011).
- [58] Satoshi, T.M., Eiki, Y., Masaki, Y., Takashi, K., Hideaki, M., Tatzuo, U., Shigetoh, M. and Tomitake, T., “X-ray Structure of β -Carbonic Anhydrase from the Red Alga, *Porphyridium Purpureum*, Reveals a Novel Catalytic Site for CO₂ Hydration”, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 5521, 6, (2000).
- [59] Lindskog, S. “Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase”, *Pharmacology&Therapeutics*, 74, 1, 1-20,(1997)
- [60] Del Prete, S., Vullo, D., Scozzafava, A., Capasso, C., Supuran, C.T., “Cloning, Characterization and Anion Inhibition Study of the Delta-Class Carbonic Anhydrase (TweCA) from the Marine Diatom *Thalassiosira Weissflogii*”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22, 531, 7, (2014).
- [61] Vullo, D., Del Prete, S., Osman, S.M., De Luca, V., Scozzafava, A., Alothman, Z., et al., ‘Sulfonamide Inhibition Studies of the delta-Carbonic Anhydrase from the Diatom *Thalassiosira Weissflogii*’, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24, 275, 9, (2014).
- [62] Alterio, V., Langella, E., Viparelli, F., Vullo, D., Ascione, G., Dathan, N.A., et al., “Structural and Inhibition Insights into Carbonic Anhydrase CDCA1 from the Marine Diatom *Thalassiosira Weissflogii*”, *Biochimie*, 94, 1232, 41, (2012).
- [63] Vullo, D., Del Prete, S., Fisher, G.M., Andrews, K.T., Poulsen, S.A., Capasso, C., et al., “Sulfonamide Inhibition Studies of the eta-class Carbonic Anhydrase from the Malaria Pathogen *Plasmodium Falciparum*”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23, 526, 31, (2015).
- [64] Gao, B.B., Clermont, A., Rook, S., Fonda, S.J., Srinivasan, V.J., Wojtkowski, M., et al., “Extracellular Carbonic Anhydrase Mediates Hemorrhagic Retinal and Cerebral Vascular Permeability Through Prekallikrein Activation”, *Nature Medicine*, 13, 181, 8, (2007).
- [65] Hussain, E., “Protein Carbonylation in Skeletal Muscles: Impact on Function”, *Antioxidants and Redox Signaling*, 12, 417, 29, (2010).

- [66] Zimmerman, U.J., Wang, P., Zhang, X., Bogdanovich, S., Forster, R., “Anti-Oxidative rResponse of Carbonic Anhydrase III in Skeletal Muscle”, *IUBMB Life*, 56, 343, 7, (2004).
- [67] H. Matsui, M.M., Wynns, G.C., Conroy, C.W., Mead, A., Maren, T.H. and Sears, M.L., “Membrane Carbonic Anhydrase (IV) and Ciliary Epithelium. Carbonic Anhydrase Activity is Present in the Basolateral Membranes of the Non-pigmented Ciliary Epithelium of Rabbit Eyes”, *Experimental Eye Research*, 62, 409, 17, (1996).
- [68] Datta, R., Waheed, A., Bonapace, G., Shah, G.N., Sly, W.S., “Pathogenesis of Retinitis Pigmentosa Associated with Apoptosis-Inducing Mutations in Carbonic aAnhydrase IV”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 3437, 42, (2009).
- [69] Tang, Y., Xu, H., Du, X., Lit, L., Walker, W., Lu, A., et al., “Gene Expression in Blood Changes Rapidly in Neutrophils and Monocytes after Ischemic Stroke in humans: a Microarray Study”, *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26, 1089, 102, (2006).
- [70] Isao, N., Saburo, O., Daniela, V., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., “Carbonic Anhydrase Inhibitors. DNA Cloning, Characterization, and Inhibition Studies of the Human Secretory Isoform VI, a New Target for Sulfonamide and Sulfamate Inhibitors”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 381, 8, (2007).
- [71] De Simone, G., Scozzafava, A., Supuran, C.T., “Which Carbonic Anhydrases are Targeted by the Antiepileptic Sulfonamides and Sulfamates”, *Chemical Biology and Drug Design*, 74, 317, 21, (2009).
- [72] Jian Yan, Y.J., Feng, J., John, S., Donahue L.R., Wesley, G., Beamer, X., Bruce, A., Roe, M.S., Doux, L. and Gu, W., “Effects of carbonic anhydrase VIII Deficiency on Cerebellar Gene Expression Profiles in the Wdl Mouse”, *Neuroscience Letters*, 413, 196, 201, (2007).
- [73] Keisuke, T., Tamotsu, T., Yuji, O., Saburo, O., “cDNA Cloning and Developmental Expression of Murine Carbonic Anhydrase-related Proteins VIII, X, and XI”, *Molecular Brain Research*, 109, 207, 15, (2002).
- [74] Imtaiyaz, M., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F., Sly, W.S., “Structure, Function and Applications of Carbonic Anhydrase Isozymes”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 1570, 82, (2013).
- [75] Maresca, A., Scozzafava, A., Kohler, S., Winum, J.Y., Supuran, C.T., Inhibition of beta-Carbonic Anhydrases from the Bacterial Pathogen *Brucella Suis* with Inorganic Anions”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 110, 36, 9, (2012).
- [76] Doğanay, S., “Karbonik Anhidraz İnhibitörleri. Glokom-Katarakt”, 2, 213, 8, (2007).

- [77] Daka, Q., Trkulja, V., “Efficacy and Tolerability of Mono-Compound Topical Treatments for Reduction of Intraocular Pressure in Patients with Primary Open Angle Glaucoma or Ocular Hypertension”, *Croatian Medical Journal*, 55, 468, 80, (2014).
- [78] Supuran, C.T., “Inhibition of Carbonic Anhydrase IX as a Novel Anticancer Mechanism”, *World Journal of Clinical Oncology*, 3, 98, 103, (2012).
- [79] Jean-Yves, W., Cheikh, K.E., Innocenti, A., Vullo, D., Ciattini, S., Montero, J.L., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., “Carbonic Anhydrase Inhibitors: Clash with Ala65 as a Means for Designing Inhibitors with Low Affinity for the Ubiquitous Isozyme II, Exemplified by the Crystal Structure of the Topiramate Sulfamide Analogue”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 7024, 31, (2006).
- [80] Alp, C., Ekinici, D., Gultekin, M.S., Senturk, M., Sahin, E., Kufrevioglu, O.I., A novel and One-Pot Synthesis of New 1-tosyl pyrrol-2-one Derivatives and Analysis of Carbonic Anhydrase Inhibitory Potencies”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 4468, 74, (2010).
- [81] Carta, F., Maresca, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 5- and 6-Membered (thio)Lactones are Prodrug Type Carbonic Anhydrase Inhibitors”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22, 267, 70, (2012).
- [82] Durdagi, S., Senturk, M., Ekinici, D., Balaydin, H.T., Goksu, S., Kufrevioglu, O.I., et al., “Kinetic and Docking Studies of Phenol-Based Inhibitors of Carbonic Anhydrase Isoforms I, II, IX and XII Evidence a New Binding Mode Within the Enzyme Active Site”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19, 1381, 9, (2011).
- [83] De Simone, G., Supuran, C.T., “(In)Organic Anions as Carbonic Anhydrase Inhibitors”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111, 117, 29, (2012).
- [84] Burghout, P., Vullo, D., Scozzafava, A., Hermans, P.W., Supuran, C.T., “Inhibition of the beta-Carbonic Anhydrase from *Streptococcus Pneumoniae* by Inorganic Anions and Small Molecules: Toward Innovative Drug Design of Antiinfectives”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19, 243, 8, (2011).
- [85] Mangani, S. and Hakansson, K., “Crystallographic Studies of the Binding of Protonated and Unprotonated Inhibitors to Carbonic Anhydrase Using Hydrogen Sulphide and Nitrate Anions”, *European Journal of Biochemistry*, 210, 867, 71, (1992).
- [86] pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Protocol. <https://itapromegacom/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>.
- [87] pET-30a_map. <http://richsingisercom/4402/Novagen%20pET%20system%20manualpdf> (08.10.2011)

- [88] Temizkan, G., Arda, N., “Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler”, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (B/YOGEM), Yayın no: 2, Nobel Tıp Kitapevleri, 2004.
- [89] <http://bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/primer.cgi> (08.10.2011)
- [90] <http://www.restrictionmapper.org/cgi-bin/sitefind3.pl> (08.10.2011)
- [91] <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx> (08.10.2011)
- [92] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning 3, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 1989.
- [93] 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)
- [94] Aydoğan S., “Yönlendirilmiş Mutagenез ile Mutant hCAII Geninin Eldesi ve Mutant Proteinlerin İnhibitörlere Karşı İlgisinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi (2006)
- [95] 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
- [96] Molecular techniques: Protein Chemistry and Molecular Cloning, Laboratory Manual, August 20-October 2, 2002, Interdisciplinary Center for Biotechnology Research University of Florida.
- [97] Laemelli, D. K., “Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄”, *Nature*, (1970), London, 227-680.
- [98] De Luca V, Del Prete S, Supuran CT, Capasso C. Protonography, a new technique for the analysis of carbonic anhydrase activity. *Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry* 2015;30:277-82.
- [99] Prete, S.D., Vullo, D., Osman, S.M., Scozzafava, A., Alothman, Z., Capasso, C., et al., “Sulfonamide Inhibition Study of the Carbonic Anhydrases from the Bacterial Pathogen *Porphyromonas Gingivalis*: the beta-class (PgiCAb) Versus the Gamma-Class (PgiCA) Enzymes”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22, 4537, 43, (2014).
- [100] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1027888>
- [101] Nishimori, I., Minakuchi, T., Kohsaki, T., Onishi, S., Takeuchi, H., Vullo, D., et al., “Carbonic Anhydrase Inhibitors: the beta-Carbonic Anhydrase from *Helicobacter Pylori* is a New Target for Sulfonamide and Sulfamate Inhibitors”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17, 3585, 94, (2007).

- [102] Joseph, P., Turtaut, F., Ouahrani-Bettache, S., Montero, J.L., Nishimori, I., Minakuchi, T., et al., "Cloning, Characterization and Inhibition Studies of a beta-Carbonic Anhydrase from *Brucella Suis*", *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 2277, 85, (2010).
- [103] Monti, S. M., De Simone, G., Dathan, N.A., Ludwig, M., Vullo, D., Scozzafava, A., Capasso, C., Supuran, C. T. "Kinetic and anion inhibition studies of a β -carbonic anhydrase (FbiCA 1) from the C₄ plant *Flaveria bidentis*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Volume 23, Issue 6, 15 March 2013, Pages 1626–1630
- [104] Zimmerman, S., Innocenti, A., Casini, A., Ferry, J.G., Scozzafava, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of the Prokariotic beta and gamma-Class Enzymes from Archaea with Sulfonamides", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14, 6001, 6, (2004).
- [105] Vullo, D., Kumar, R.S., Scozzafava, A., Capasso, C., Ferry, J.G., Supuran, C.T., "Anion Inhibition Studies of a beta-Carbonic Anhydrase from *Clostridium Perfringens*", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23, 6706, 10, (2013).
- [106] Krebs, H.A." Inhibition of Carbonic Anhydrase by Sulphonamides." *Biochemical Journal*;43 525-8 (1948).
- [107] Culp, D. J., Robinson, B., Parkkila, S., Pan, P.W., Cash, M. N., Truong, H.N., et al. "Oral colonization by *Streptococcus mutans* and caries development is reduced upon deletion of carbonic anhydrase VI expression in saliva." *Biochimica et biophysica acta*;1812:1567-76(2011).
- [108] <http://www.restrictionmapper.org/cgi-bin/sitefind3.pl> (08.10.2011)
- [109] <http://www.bio-rad.com/en-tr/product/precision-plus-protein-unstained-standards> (12.09.2014)

EKLER

6. EKLER

EK A

Tablo A1. prokaryotlarda karbonik anhidraz olduğu varsayılan genlerin dağılımı

Organizma	Sınıf		
	α	β	γ
Archaea			
<i>Methanobacterium thermoformicicum</i>	-	1	-
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	0	1	1
<i>Methanococcus jannaschii</i>	0	0	1
<i>Methanosarcina thermophila</i>	-	-	1
<i>Pyrococcus furiosus</i>	0	0	1
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	0	0	1
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	-	1	-
Bacteri			
<i>Anabaena sp. strain PCC7120</i>	1	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	0	2	1
<i>Bordetella pertussis</i>	-	1	1
<i>Caulobacter crescentus</i>	-	2	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	1	1
<i>Chlorobium tepidum</i>	-	-	1
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	0	1	1
<i>Clostridium difficile</i>	-	1	-
<i>Deinococcus radiodurans</i>	-	1	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	-	1
<i>Escherichia coli</i>	0	2	2
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	1	0
<i>Helicobacter pylori 2669</i>	1	1	-

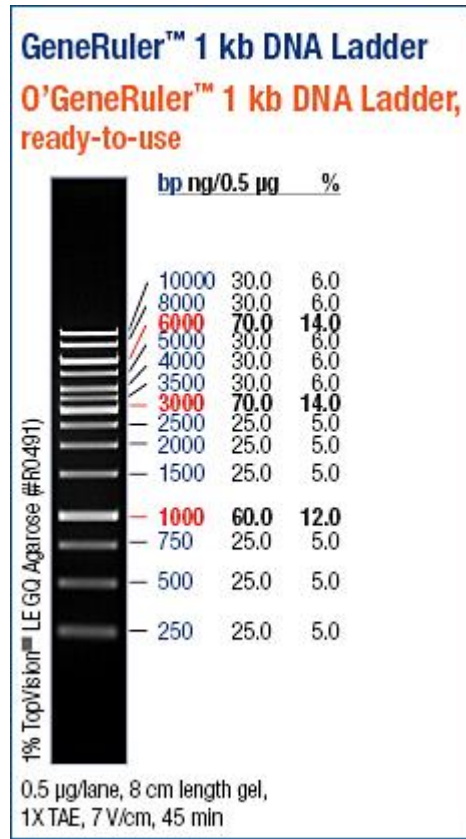
Tablo A1. (devamı)

<i>Helicobacter pylori J99</i>	1	1	0
<i>Mycobacterium avium</i>	-	2	1
<i>Mycobacterium bovis</i>	-	3	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0	3	1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1	1	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	-	1	1
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	-	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	3	3
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	1
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	-	1	1
<i>Rickettsia prowazekii</i>	0	0	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	1	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	1	-
<i>Streptomyces coelicolor</i>	-	2	-
<i>Synechocystis sp. strain PCC6803</i>	0	2	2
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	-	1	-
<i>Vibrio cholerae</i>	1	1	1
<i>Yersinia pestis</i>	-	2	1

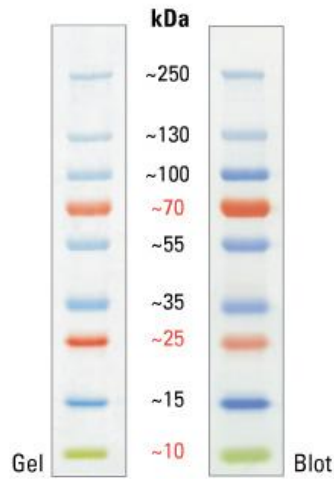
Numaralar, putative karbonik anhidraz genlerini göstermektedir. Sıfır, tüm genomda putative genlerin bulunmadığını gösterirken; - şüana kadar hiç putative gen bulunmadığını göstermektedir.

AatII, AbsI, AccI, AclI, AcyI, AgeI, AjuI, AlfI, AloI, AlwNI, ApaI, ArsI, AscI, AsuII, AvaI, AvaII, AvrII, BaeI, Ball, **BamHI**, BarI, BbvI, BbvCI, BccI, BcgI, BciVI, BclI, BdaI, BfiI, BglI, BglIII, BplI, Bpu10I, BsaBI, BsaXI, BsePI, BseYI, BsgI, BsmI, BsmAI, Bsp1407I, BspHI, BsrI, BstEII, BstXI, BtgZI, BtrI, BtsI, Cfr10I, ClaI, CspCI, DraII, DraIII, DrdI, Eam1105I, EciI, Eco31I, Eco47III, EcoNI, EcoP15I, EcoRI, EcoRII, EcoRV, Esp3I, FalI, FseI, FspAI, HaeII, HaeIV, HgaI, Hin4I, HindII, HindIII, HpaI, HphI, Hpy99I, **KpnI**, MauBI, MfeI, MmeI, MslI, NaeI, NarI, NcoI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, NspI, OliI, PacI, PasI, PflMI, PfoI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PstI, PvuI, PvuII, RsrII, SacI, SacII, SalI, SanDI, SapI, ScaI, PI-SceI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, StyI, SwaI, TaqII, TatI, TseI, Tsp45I, TspDTI, TspRI, TstI, Tth111I, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XhoII, XmnI

Şekil A.1 SMU_328 genini kesmeyen enzimler [108]



Şekil A.2: 1kb DNA Marker [109]



Şekil A.3. SDS PAGE için kullanılan protein markerı (Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder Katalog no: 26620)