

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



**KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİNİN
SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR AFİNİTE JELİNİN
SENTEZLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GAMZE ÖKEMLER

BALIKESİR, HAZİRAN - 2016

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



**KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİNİN
SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR AFİNİTE JELİNİN
SENTEZLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GAMZE ÖKEMLER

Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Yrd. Doç. Dr. Başak GÖKÇE

BALIKESİR, HAZİRAN - 2016

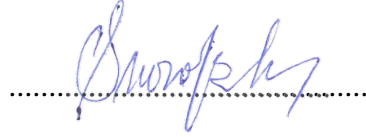
KABUL VE ONAY SAYFASI

Gamze ÖKEMLER tarafından hazırlanan “**KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR AFİNİTE JELİNİN SENTEZLENMESİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20.06.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

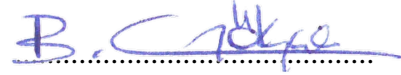
Danışman
Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK



Üye
Prof. Dr. Oktay ARSLAN



Üye
Yrd. Doç. Dr. Başak GÖKÇE



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

**KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN
YENİ BİR AFİNİTE JELİNİN SENTEZLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GAMZE ÖKEMLER
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR SEMRA IŞIK)**

BALIKESİR, HAZİRAN - 2016

Bu çalışmada, tüm canlılarda bulunan ve solunum sisteminin önemli enzimlerinden biri olan karbonik anhidraz enzimi insan eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Proteinlerin saflaştırılmasında en kolay ve kullanışlı bir teknik olan afinite kromatografisi kullanılmıştır. Çalışmamızda matriks olarak kullanılan Sepharose-4B'ye hiçbir uzantı kolu bağlanmadan sülfonamid türevi olan 4-(6-amino-hekziloksi)-benzensülfonamid, ligand olarak bağlanıp yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir.

Sentezlenen yeni afinite jeli, Sepharose-4B-4-(6-amino-hekziloksi)-benzensülfonamid kullanılarak hCA-I ve hCA-II izoenzimleri saflaştırılmıştır.

Saflaştırma sonunda elde edilen hCA-I izoenzimi için verim ve saflaştırma derecesi sırasıyla % 81.3 ve 65.1 kat; hCA-II izoenzimi için verim ve saflaştırma derecesi sırasıyla % 97.8 ve 97.8 kat olarak bulunmuştur. Sentezlenen yeni afinite jelinin en uygun çalıştığı pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değerleri, her bir CA izoenzimi için bulunmuştur. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için en uygun koşullar pH: 8.5, 25°C, 0.1 iyonik şiddeti olarak tespit edilmiştir. CA izoenzimlerinin elüsyonu için ise en uygun çözelti hCA-I için 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH: 6.3 ve hCA-II içinde 50 mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN, pH: 6.3 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen her CA izoenziminin saflığı, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile kontrol edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Karbonik anhidraz, izoenzim, afinite kromatografisi, Sepharose-4B.

ABSTRACT

A NEW AFFINITY GEL SYNTHESIS FOR PURIFICATION OF CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYMES

MSC THESIS

GAMZE ÖKEMLER

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: ASSIST.PROF. DR. SEMRA IŞIK)

BALIKESİR, JUNE 2016

In this study, Carbonic anhydrase enzyme which is ubiquitously found in all kingdoms of life and one of the most important enzyme of the respiratory system was purified from human erythrocytes. Affinity chromatography which is the easiest and the most practical technique was used. A new affinity gel was prepared on a Sepharose-4B matrix which is activated by CNBr, followed by reaction with the CA inhibitor 4-(6-amino-hexyloxy)-benzenesulfonamide as a ligand was bound to activated matrix without using any spacer arm.

Using newly synthesised affinity gel Sepharose-4B-4-(6-amino-hexyloxy)-benzenesulfonamide, both carbonic anhydrase isoenzymes hCA-I and hCA-II were purified.

The overall purification and yield for hCA-I were % 81.3 and 65.1-fold; for hCA-II were % 97.8 and 97.8-fold, respectively. The binding capacity of the new affinity gel was determined at different temperatures, pH values, ionic strengths and elution buffers. The maximum binding of hCA-I and hCA-II were achieved at 25°C with pH 8.5 and ionic strength around 0.1. The most convenient elution buffer for hCA-I was 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH: 6.3 and 50 mM Na₂HPO₄ / 0,2 M KSCN, pH: 6.3 for hCA-II.

The purity of the enzymes was controlled by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis.

KEYWORDS: Carbonic anhydrase, isoenzyme, affinity chromatography, Sepharose-4B.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Karbonik Anhidraz Enzimi (E.C. 4.2.1.1).....	2
1.2 Karbonik Anhidraz Ailesinin Sınıflandırılması	6
1.2.1 α - Sınıfı CA.....	6
1.2.2 β -Sınıfı CA.....	9
1.2.3 γ -Sınıfı CA.....	10
1.2.4 δ -Sınıfı CA.....	10
1.2.5 ζ -Sınıfı CA.....	11
1.2.6 η -Sınıfı CA.....	12
1.3 CA Enzimlerinin Fizyolojik Fonksiyonları	12
1.4 CA Enziminin Katalitik Mekanizması	17
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	20
2.1 Materyaller	20
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	21
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	21
2.2 Yöntemler	25
2.2.1 Protein Tayini	25
2.2.1.1 Kalitatif Protein Tayini	25
2.2.1.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini	26
2.2.2 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini	26
2.2.3 Afinite Jelinin Hazırlanması	27
2.2.3.1 Sepharose-4B Afinite Kolonunun Hazırlanması.....	27
2.2.4 İnsan Eritrosit İzoenzimlerinin Saflaştırılması	29
2.2.4.1 Kan Numunelerinin Alınması, Hemolizat Eldesi, Afinite Kolonuna Uygulanması ve CA Enziminin Elüsyonu.....	29
2.2.4.2 İzoenzimleri Ayırma Deneyleri.....	30
2.2.4.3 Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	32
3. BULGULAR	34
3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	34
3.2 CA İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	34
3.2.1 CA İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları Sonuçları	36
3.2.2 İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimi (hCA-I ve hCA-II).....	36
3.2.3 İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	40

4. TARTIŞMA SONUÇ	41
5. KAYNAKLAR.....	46

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izoenzimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri.....	4
Şekil 1.2: Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri [35].....	7
Şekil 1.3: Karbonik anhidrazın katalizlediği CO ₂ -hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi [37].	8
Şekil 1.4: β karbonik anhidraz molekülünün yapısı.	9
Şekil 1.5: <i>Methanosarcina thermophila</i> karbonik anhidrazın kristalografik yapısı [37].	10
Şekil 3.1: Bradford yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik.	34
Şekil 3.2: Kolona tutunmuş hCA-I izoenziminin 50 mM Na ₂ HPO ₄ / 1 M NaCl (pH: 6.3) tamponu ile elüsyonu sonucu Protein-Aktivite grafiği.....	35
Şekil 3.3: Kolona tutunmuş hCA-II izoenziminin 0.1 M NaCH ₃ COO/0.5 M NaClO ₄ (pH: 5.6) tamponu ile elüsyonu sonucu Protein-Aktivite grafiği	35
Şekil 3.4: Farklı pH değerlerinde kolona tutunan, insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO ₂ -hidrataz aktivite değerleri.....	37
Şekil 3.5: Farklı sıcaklık değerlerinde kolona tutunan, insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO ₂ -hidrataz aktivite değerleri	38
Şekil 3.6: Farklı iyonik şiddet değerlerinde kolona tutunan, insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO ₂ -hidrataz aktivite değerleri.....	38
Şekil 3.7: Farklı elüsyon tamponlarıyla kolona tutunan, insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO ₂ -hidrataz aktivite değerleri.....	39
Şekil 3.8: Afinite kolonundan saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin SDS-PAGE elektroforezi.	40

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Memeli α -CA izoenzimlerinin organ/doku dağılımı, hücresel lokalizasyonu, CO ₂ hidrataz aktivitesi ve hastalıklarla ilişkisi.....	16
Tablo 1.2: CA enziminin saflaştırılması için daha önceki araştırmacılar tarafından sentezlenen afinite jelleri [15].....	19
Tablo 2.1: SDS-elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.	24
Tablo 3.1: hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için saflaştırma tablosu.....	36

SEMBOL LİSTESİ

CA	: Karbonik anhidraz enzimi
hCA-I	: İnsan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimi-I
hCA-II	: İnsan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimi-II
E.C.	: Enzim kod numarası
U	: Enzim ünitesi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	: N, N, N, N, -tetrametil etilendiamin
CNBr	: Siyanojenbromür
CARP	: Protein bağlı karbonik anhidraz
IOP	: Göz içi basıncı
Da	: Dalton
His	: Histidin
Glu	: Glutamat
Thr	: Threonin
Å	: Angstrom

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK danışmanlığında Kimya Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmaları sırasında bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK'a,

Üniversiteye başladığımdan beri bilimsel yönünü her zaman kendime örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, en zor süreçlerde her daim bana destek olan değerli arkadaşlarım Dr. Nurcan DEDEOĞLU, Beste ŞİPAL ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Ayrıca çalışmalarım esnasında maddi ve manevi tüm desteklerini benden esirgemeyen, beni yetiştiren, her zaman yanımda olan çok kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, Haziran 2016

Gamze ÖKEMLER

1. GİRİŞ

Canlı sistemlerde biyokimyasal reaksiyonların hemen hemen tamamına yakını temelde protein yapılı olan ve enzimler olarak bilinen biyolojik katalizörler tarafından gerçekleştirilir [1].

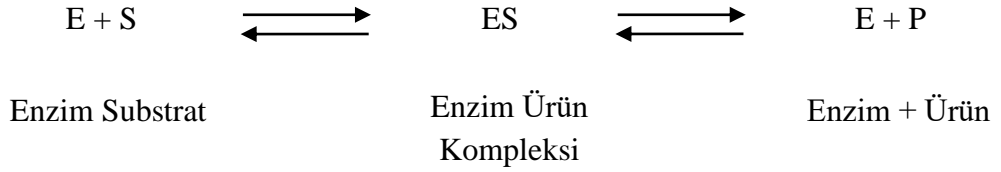
Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürünün oluşmasına fırsat vermeden spesifik olarak % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir [2]. Tüm canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonların hemen hemen tamamı enzimlerle ilgilidir [3].

Enzimler gereken aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonların 10^5-10^{17} kat daha hızlı gerçekleşmesini sağlar. Böylece laboratuvar şartlarında gerçekleşmesi çok zaman alan ve birçok basamağa ihtiyaç duyan, bazen de yüksek sıcaklık ve basınç asidik veya bazik ortam gerektiren reaksiyonların, hücre içi şartlarda birkaç saniye gibi çok kısa bir zamanda meydana gelmesini sağlar [4]. Örneğin üre, enzim olmadan yüz yılda parçalanırken üreaz enziminin varlığında ise saniyede 30 000 üre molekülü parçalanabilir [5].

Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile tanımlanır. Turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzim, $40.000.000 \text{ sn}^{-1}$ ile katalazdır [6].

Enzimin özgül olarak etki ettiği maddeye veya madde karışımına bu enzimin "substratı" denir. Reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise "ürün" adı verilir [7].

Genel olarak reaksiyonu Şu Şekilde Őematize edebiliriz :



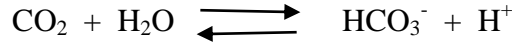
Substratlarına ve katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre enzimler son derece spesifiktirler. Genellikle bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip reaksiyonları katalizler. Farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip, aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen enzimler de vardır. Bu tip enzimler izoenzim olarak adlandırılırlar. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri deęiŐiktir [8]. İzoenzimlere örnek olarak, karbonik anhidraz, laktat dehidrogenaz, alkalen fosfataz verilebilir [9].

Her enzimin 4 rakamlı bir sistematik kod numarası vardır. E.C. adı verilen bu isimlendirmede birinci numara grubunu, ikinci numara alt grubunu, üçüncü numara alt alt grubunu, dördüncü numara da kendine özgü sıra numarasını verir. Örnek olarak karbonik anhidraz enziminde (E.C.4.2.1.1.) baştaki 4 numara bu enzimin bir liyaz olduğunu diğer numaralar da alt gruplarını belirtir. Liyazlar, hidrolizden farklı olarak substratların uzaklaştırılıp çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Karbonik anhidraz enzimi (E.C.4.2.1.1.) bu sınıfta incelenir [7, 10].

1.1 Karbonik Anhidraz Enzimi (E.C.4.2.1.1)

Bütün canlı organizmalarda anahtar bir metabolit olan CO₂' in çevresel konsantrasyonu nadiren yüksektir. Ayrıca CO₂, karbonik asit ve bikarbonat oluşumu ile dengededir. Karbonik anhidraz (CA) enzimi canlı organizmalarda CO₂'in hidratasyon ve HCO₃⁻ 'in dehidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzim ailesidir [11].

Biyolojik sistemler için çok önemli olan karbonik anhidraz enzimi, aktif bölgesinde çinko iyonu (Zn^{+2}) bulunduran metaloenzimdir. CO_2 ve HCO_3^- arasındaki reaksiyon nötral pH civarında kendiliğinden gerçekleşse de oldukça yavaş bir reaksiyondur. Bu yüzden CA biyolojik sistemler için oldukça önem taşımaktadır [12].

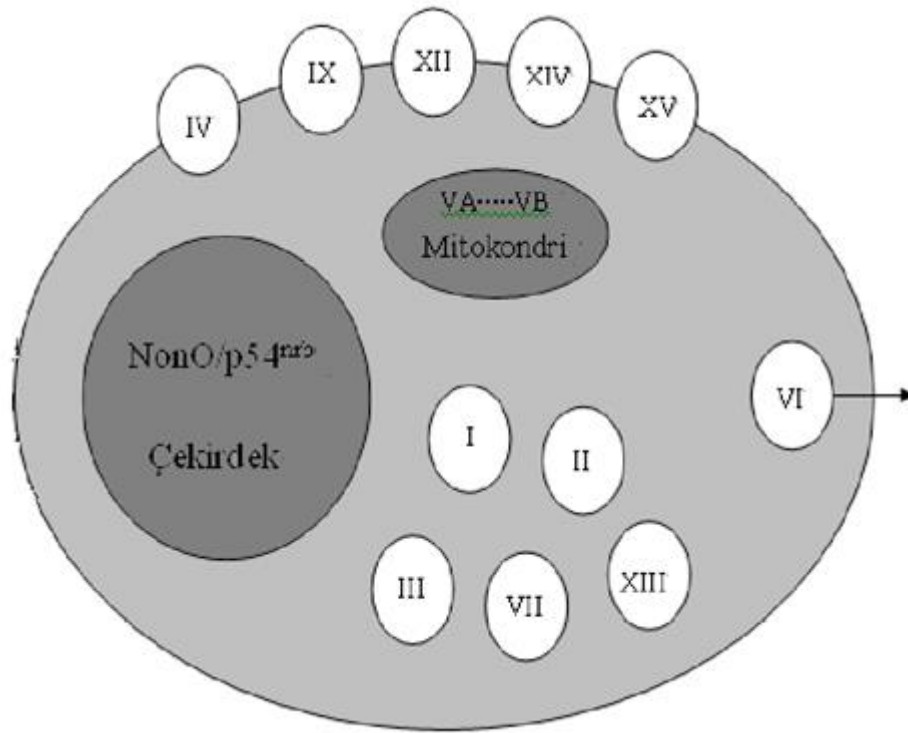


Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği bu reaksiyonun çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları vardır. Pek çok farklı dokuda bulunan bu enzim kemik oluşumu, kalsifikasyon, CO_2 ve iyon taşınımı, asit-baz dengesi gibi farklı fizyolojik proseslerde görev alır [13].

Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1), 1933 yılında ilk olarak sığır eritrositlerinde keşfedilmiştir. Daha sonraki yıllarda tüm memeli dokularında, prokaryot, ökaryot ve archaea'da yaygın bir şekilde bulunduğu kanıtlanmıştır [11, 14]. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir.

Karbonik anhidraz enziminin genetik olarak 6 farklı enzim sınıfı (α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -CA) bulunmaktadır [15, 16]. Aminoasit dizilişleri bakımından önemli bir benzerlik göstermeyen karbonik anhidraz ailesinin üç sınıfı (α -, β - ve γ -) yaygın olarak bakterilerde görülmektedir. γ -sınıfı CA'lar bazı bitkilerde, β -sınıfı CA'lar ise bitkilerin yanı sıra algler, fungi, bakteri ve arkeada bulunmaktadır. α -sınıfı CA'lar baskın olarak hayvanlarda ve arkealar hariç çoğu gruplarda bulunurlar. δ ve ζ -sınıfı CA'lar deniz mikroorganizmalarında son sınıf olan η -sınıfı CA'lar ise Del prete ve ark. tarafından keşfedilen *Plasmodium falciparum*'da görülmektedir [16, 17].

Memelilerde katalitik aktivite, çeşitli inhibitör sınıflarına verdikleri tepkiler ve doku dağılımları yönünden farklılık gösteren, α -CA gen ailesine bağlı 16 farklı (insanlar 15 farklı) CA izoenzimi ve CA bağlantılı protein (CARP) tanımlanmıştır [18]. CA izoenzimlerinin hücre içindeki yerleşimleri de oldukça farklılık göstermektedir. CA I, II, III, VII, ve XIII sitozolik formda, CA IV, IX, XII, XIV, ve XV membrana bağlı, CA VA ve VB mitokondriyal formda, CA VI tükürük ve süt salgılarında ve NonO/p54^{nrb} formu ise çekirdekte bulunmuştur [15, 18, 19].



Şekil 1.1: Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izoenzimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri [15].

Aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran CA enzimi genel olarak metabolik CO_2 transportunun yanı sıra birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- iyonlarının birikimini sağlayarak, vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında da son derece önemli rol oynamaktadır [11, 20, 21]. Bu dokulara böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi örnek olarak verilebileceği gibi, histokimyasal yöntemlerle tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA enzimine rastlanmış ve biyokimyasal özellikleri incelenmek üzere saflaştırılmıştır.

Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır [21, 22].

Üzerinde en çok çalışma yapılan ve en yaygın olarak bulunan izoenzimler CA-I ve CA-II'dir. hCA-II, 29.3 kDa büyüklüğünde olan protein yapılı bir enzimdir. hCA-II diğer izoenzimlere göre katalitik aktivitesi oldukça yüksek olup, insan doku ve organlarında yaygın olarak bulunmaktadır. hCA-I ise 30 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Eritrositlerde, kolon epitelinde, göz lensi ve korneal epitelyumda bulunur. Hücre içinde sitozolde yer alan hCA-I çözünebilir karakterdedir ve eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir [23, 24, 25]. Eritrositlerde hCA-I, hCA-II'ye göre beş kat daha fazla bulunmasına rağmen katalitik aktivitesi hCA-II'nin sadece % 15'i kadardır [26, 27].

Yüksek göz içi basıncı ile (IOP) olarak ortaya çıkan glokom en ciddi göz hastalıklarından birisidir. Glokom göz hastalıkları içinde % 15-20 oranı ile körlüğe neden olmaktadır [18]. Göz retinasında bulunan CA-II göz içi basıncı oluşumunun başlıca sorumlusudur. Glokomlu hastalarda IOP'yu düşürmenin en etkili yolu CA-II aktivitesini bloke etmektir. Bu amaçla başta asetazolamid olmak üzere heteroaromatik sülfonamidler uzun yıllardan beri kullanılmaktadır [14, 28].

Hidrataz aktivitesi ile CA enziminin, son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidrasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmektedir. Bu nedenle, CA enziminin saflaştırılmasında daha etkili ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır [29].

Günümüzde enzim saflaştırılması için, çok çeşitli kromatografik teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında, yüksek ayırma avantajının yanında, saflaştırma aşamasındaki adım sayısının azlığından dolayı afinite kromatografisi birçok proteinin ya da enzimin saflaştırılması için ideal bir yöntem olarak kullanılmaktadır [30]. CA enziminin saflaştırılması için farklı uzantı kolları ve ligandlar kullanılarak sentezlenen değişik afinite jelleri bulunmaktadır [31].

1.2 Karbonik Anhidraz Ailesinin Sınıflandırılması

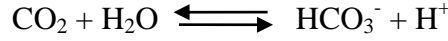
1933'de karbonik anhidraz enzimi Meldrum & Roughton ve Stadie & O'Brien tarafından ilk kez keşfedilmiştir. O zamandan beri yapılan çalışmalar sonucunda karbonik anhidraz enziminin ökaryot ve prokaryotlarda yaygın olarak görüldüğü tespit edilmiş olup; α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -CA olmak üzere 6 farklı gen ailesi tarafından sentezlendiği literatürlerde görülmektedir. Karbonik anhidrazların farklı yapılar da olmasının sebebi, aktif bölgelerindeki aminoasit dizilişlerinin ve katlanmalarının farklı olmasıdır. Bu farklılıklara rağmen karbonik anhidraz enzimlerinin aktif bölgelerinde Zn^{+2} iyonu içermeleri ve reaksiyon mekanizmalarının aynı olması oldukça ilginçtir [32, 33].

1.2.1 α - Sınıfı CA

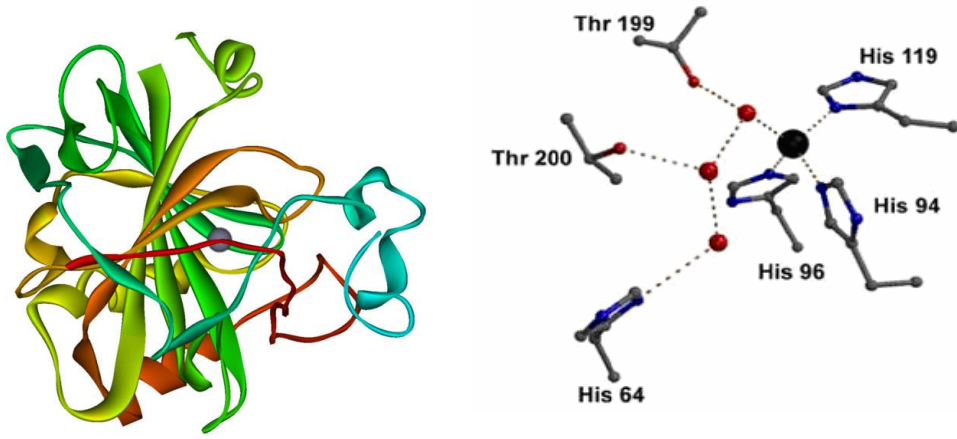
Memelilerde katalitik aktivite, çeşitli inhibitör sınıflarına verdikleri tepkiler ve doku dağılımı, oligometrik düzenlenmeler yönünden farklılık gösteren, α -CA gen ailesine bağlı 16 farklı (insanlar 15 farklı) CA izoenzimi ve CA bağlantılı protein (CARP) tanımlanmıştır [18]. CA izoenzimlerinin hücre içindeki yerleşimleri de oldukça farklılık göstermektedir. CA I, II, III, VII, ve XIII sitozolik formda, CA IV, IX, XII, XIV, ve XV membrana bağlı, CA VA ve VB mitokondriyal formda, CA VI tükürük ve süt salgılarında ve NonO/p54^{nrB} formu ise çekirdekte bulunmuştur [15, 18, 19].

Bunlara ek olarak ise üç tane CA gen ailesine ait CA-ilişkili protein vardır. CA-I ve CA-II, karbonik anhidraz izoenzimleri arasında en yaygın olarak bulunmaktadırlar.

Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir:



Tüm α -CA'larda bulunan Zn^{+2} metal iyonu kataliz için önemli bir rol oynamaktadır. CA'larda bulunan metal iyonunun, aktif bölgenin 15Å derinliğinde bir yarığın tabanında olduğu X-ray kristalografik veriler sonucunda bulunmuştur. Aktif olan bütün CA'lar H94, H96 ve H119 olmak üzere üç farklı histidin rezidüsü ve bir su molekülü/hidroksit iyonu ile koordine şeklinde bulunmaktadır [33]. (Şekil1.3)



Şekil 1.2: Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri [33].

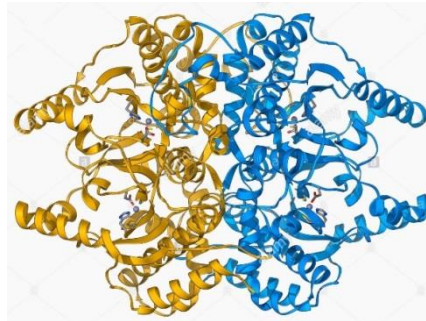
Aktif bölgede Zn^{+2} metal iyonu ile koordine bir şekilde bulunan su molekülü, aynı zamanda Thr199'un hidroksil kısmıyla hidrojen bağı oluşturduğu görülmektedir. Aynı zamanda Glu106'nın karboksilat kısmı Thr99 ile bağı bulunmaktadır. Zn^{+2} iyonu ve su molekülünün koordine bir şekilde bulunup etkileşimlerinin sonucunda, su molekülünün nükleofil karakteri artmaktadır. Ayrıca substrat olan CO_2 'yi de nükleofil atak için uygun konuma yönlendirmekte önemli rol oynamaktadır. Zn^{+2} iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur ve bu formda bulunan enzim baziktir (Şekil 1.3-A). Oluşan aktif form, hidrofobik cepte komşularıyla bağı olan CO_2 molekülüne saldırır (Şekil 1.3-B).

1.2.2 β -Sınıfı CA

β - CA'lar, α -CA'lara göre daha yaygın olarak bakterilerde bulunmalarına rağmen β -sınıfının anlaşılması α -sınıfının çok gerisinde kalmıştır [37]. Başlarda bu enzimin sadece bitkilerde var olduğu düşünülürken, günümüzde β -sınıfına ait olup CA içeren yapılar arasında protozomlar, funguslar, algler, bazı archaealar, çoğu bakteriler örnek olarak gösterilebilmektedir. Ayrıca yapılan son çalışmalarda yeşil alg *C. reinhardtii* mitokondrisinde de β -CA bulunduğu tespit edilmiştir.

Yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonucu β -sınıfının, α -sınıfı ve γ -sınıfından keskin farklılıklarla ayrıldığını göstermektedir. α -sınıfı enzimler monomer yapıda iken γ -sınıfı enzimler ise trimer yapıdadır. β -sınıfının üyeleri dimer, tetramer, heksamer ve oktamer gibi birçok yapının birleşmesiyle oluşarak diğer enzimlerden farklı bir yapı oluşturmaktadır. Sekonder yapıdaki farklılıklar kristal yapıda da görülmektedir. Son olarak, β -sınıf enziminin kristal yapısına bakıldığında çinkonun iki sistein ve bir histidin ile bağlandığı görülmektedir [38].

β -sınıfı enzimler ile α -CA arasındaki en önemli fark molekül ağırlıklarıdır. β -CA'lar genellikle 25-30 kDa molekül ağırlığında olup 2-6 kadar monomerlerden oluşmuş oligomerlerdir. Aynı zamanda aktif bölgedeki Zn^{+2} iyonuna bağlanmak için kullanılan aminoasit rezüdüleri de bu iki sınıf arasındaki önemli farklar arasındadır [39].

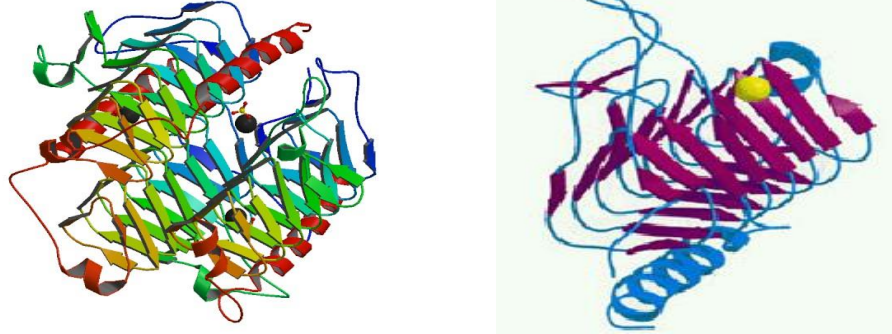


Şekil 1.4: β karbonik anhidraz molekül yapısına örnek [38].

1.2.3 γ -Sınıfı CA

3 ile 4,5 milyar yıl önce γ -sınıfının evrimleştiği düşünülmektedir. Arkea *Methanosarcina thermophila*' da (Cam) keşfedilen ilk γ -sınıfını CA enzimidir. Bulunan bu yapı α -sınıfı CA'dan farklı bir katlanma yaparak trimerik bir molekül yapısı oluşturduğu görülmektedir. γ -sınıfı CA'ların prokaryotlarda bulunup ökaryotlarda bulunmaması oldukça enteresan bir olaydır. γ -CA'ların bazılarında Zn^{+2} iyonu içerdiği bazılarında ise Co içerdiği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir [40, 41].

γ -sınıfı CA'ların metal bağlama bölgesi monomerik α -sınıfına benzer şekilde tetrahedral geometrideki üç histidin biriminden oluşmaktadır. Bununla birlikte Cam'da histidinlerin ikisi (His81, His122) bir monomerden sağlanırken, diğeri (His117) komşu monomerden verilmektedir [41].



Şekil 1.5: *Methanosarcina thermophila* karbonik anhidrazının kristalografik yapısı [41].

1.2.4 δ -Sınıfı CA

CA sınıfları arasında en az araştırılan sınıf δ -CA'dır. Roberts isimli bir bilim adamının 1997'de yapmış olduğu çalışmalar sonucunda, bir deniz diatomu *Thalassiosira weissflogii*'den 27 kDa'luk monomerik bir karbonik anhidrazı (TWCAI) saflaştırmayı başardığını rapor etmiştir [42].

X-ışını absorpsiyon spektroskopisi ile gösterilen katalitik çinko, α -sınıf ve γ -sınıf karbonik anhidrazların aktif merkezlerinde de olduğu gibi üç histidin ve bir su molekülü ile koordine halindedir. TWCA1, karbonik anhidrazın diğer bilinen sınıfları ile hiçbir dizi benzerliği yoktur [42].

Deniz diatomu *Thalassiosira weissflogii* CA'nın (TWCA1) X-ışını ile yapılan çalışmaları sonucunda aktif merkezinin memeli α -CA'ninkine şaşırtıcı şekilde benzediğini göstermektedir [42, 43].

δ -CA enzimi hakkında detaylı bir bilgi henüz bulunmamasına rağmen haptitler, diatomlar ve dinoflagellatlarda yaygın olarak bulunduğu söylenebilmektedir [44].

1.2.5 ζ -Sınıfı CA

İlk olarak *Thalassiosira weissflogii*'den elde edilen ζ -sınıfı CA, CDCA1 olarak adlandırılmaktadır ve Cd (II) içeren CA enzimine ilk örnek olarak gösterilmektedir. Yaklaşık 69 kDa'luk bir molekül ağırlığına sahiptir. CDCA1-R1 ve CDCA1-R2, iki sistein, bir histidin rezidüsü ile bir su molekülü sıkı bir şekilde tetrahedral geometride koordine olmuş durumda bulunmaktadır. Metal iyonunun ise huni şeklindeki cebin derinliklerinde bulunduğu görülmektedir.

Aktif bölgesinde Cd (II) veya Zn (II) iyonlarını kullanmasından dolayı CDCA1 çoklu metal bağlayıcı enzim olarak sınıflandırılmıştır. Cd (II) ve Zn (II) iyonlarının ikisiylede yüksek CA aktivitesi göstermesine rağmen çinko ile biraz daha yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir [42, 44].

TWCA1'in seviyesinin *T.weissflogii* üzerinde düşük olduğu koşullarda ekspre edildiğinde bu karbonik anhidrazın molekül kütlesi ve primer yapısının diğer CA izozimleri ile bir benzerlik göstermediği tespit edilmiştir. Bundan dolayı bu CA yeni bir CA sınıfı (ζ -CA) olarak kabul edilmiştir [42, 45].

1.2.6 η -Sınıfı CA

Çok kısa bir zaman önce patojen malaria *Plasmodium falciparum*'dan elde edilen bu yeni sınıf CA, Supuran ve ark. tarafından keşfedilmiştir ve α -, γ - ve δ -sınıfı gibi üç histidin rezidüsü ve bir katalitik su molekülüyle koordine Zn (II) iyonu içerdiği düşünölmektedir. Söz konusu enzimin α -sınıfı ile benzerlikleri olsa da bazı noktalarda farklılıklar göstermektedir [46].

Ayrıca aminoasit rezidülerinin sayısı bakımından η -CA enzimi (600 amino asit rezidüsü), α -CA'ya (260-280 aminoasit rezidüsü) göre daha fazla sayıda rezidüye sahiptir [46].

1.3 CA Enzimlerinin Fizyolojik Fonksiyonları

Karbonik anhidraz enzimi, hücrede CO_2 'in hidrasyon ve HCO_3^- 'in dehidrasyon reaksiyonunu dönüşümlü olarak katalizleyerek CO_2 taşınmasını sağlamanın yanında bazı dokulardaki (böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi gibi) H^+ ve HCO_3^- 'in birikiminde görev almaktadır. Bunların dışında önemli miktarda tükruk bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometrium dokularında da belirli miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir [47].



pH ve CO₂ homeostasisi, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, çeşitli doku/organlarda elektrolit salınımı, biyosentetik reaksiyonlar (glokoneogenez, lipogenez, ve ürojenez gibi), tümör oluşumu ve pek çok diğer fizyolojik ve patolojik süreçlerde de bu enzimin varlığı söz konusudur [48].

Glokom hastalığı, yüksek göz içi basıncından ileri gelen (intraocular pressure), (IOP) ve dönüşümsüz körlüğe neden olan bir göz hastalığıdır. IOP'nin tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (humor aköz) ve karbonik anhidraz enziminin humor aközün salgılanmasında uyarıcı etkisi olduğu bilinmektedir. Bu enzimin inhibisyonu sonucunda göz içi sıvısının salgılanma oranının yaklaşık olarak yarı yarıya azaldığı görülmektedir. Glokom durumunda ise göz içi basıncını düşürmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda CA enziminin inhibitörleri uzun yıllardan beri glokom tedavisinde kullanılmıştır [18, 49].

Memelilerde farklı doku dağılımları gösteren α -CA gen ailesine bağlı 16 farklı CA izoenzimi ve CA bağlantılı protein (CARP) tanımlanmıştır. CA-I, CA-II, CA III ve CA VII sitozolik form; CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV membrana bağlı; CA V mitokondriyel form; CA VI tükürük gibi çeşitli salgılarda mevcut olan karbonik anhidraz formlarıdır [18, 19, 50].

hCA-II ve hCA-I ilk saflaştırıldığında CA C ve CA B olarak isimlendirilmiştir. Bu formlardan CA C (CA-II)'nin eritrositlerde az miktarda bulunmasına rağmen yüksek aktiviteye sahip olduğu, CA B (CA-I)'nin ise çok miktarda olup daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir [34]. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri insan eritrosit hücrelerinde bulunur.

hCA-I izoenziminin turnover sayısı $2.5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmış ve söz konusu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu hCA-II kadar belirgin değildir [51]. 30 kDa molekül ağırlığında sitoplazmik bir enzimdir.

Karbonik anhidraz enziminin en çok çalışılan, en verimli formu hCA-II'dir. Pek çok farklı organ ve hücre tipinde bulunan CA-II'nin doku dağılımı oldukça geniştir. Turnover sayısı 25°C'de 10^6 s^{-1} olarak tespit edilmiştir. Glokom, ödem, epilepsi ve yükseklik hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [19]. Kemikte, böbrekte ve beyinde oldukça önemli görevleri vardır [33].

CA III'ün turnover sayısı 8.10^3 s^{-1} , düşük aktiviteli, 30 kDa molekül kütlesine sahip bir enzimdir. Sülfonamidlerin inhibisyonunda, diğer CA izoenzimlerine göre daha hassastır. Başlıca çözümlü protein olduğu ve CO_2 'in doku kılcal damarlarına difüzyonunu kolaylaştırmada rol oynadığı sanılmaktadır. En çok yavaş kasılan kırmızı kas liflerinde bulunmaktadır ve yağ hücrelerinde de bu izoenzimin konsantrasyonu oldukça yüksektir. Ayrıca CA III'ün fosfataz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir [33].

CA IV, glokom (CA II ve XII ile birlikte) ve pigmenter retinopati (tavuk karası) gibi bir çok patolojik süreç için hedef olmaktadır [52, 53]. Membrana bağlı ilk izoenzim olarak tanımlanmıştır.

Üregenez, glukoneogenez ve lipogenez gibi biyosentetik süreçlerde rol oynayan mitokondriyal izoform VA ve VB obezite ile de ilişkilidir. CA VI izoenzimi ise kariyogenez ile ilişkilidir [54].

I, II ve IV izoenzimleri solunum ve asit-baz homeostasisinin düzenlenmesinde görev alırken bu kompleks süreç $\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$ 'ün metabolize olduğu dokular ile boşaltım bölgeleri arasında taşınmasını içermektedir [55].

Ökaryotik ve prokaryotik genomların dizilenmesi sonucunda malarya, tüberküloz ve diğer bakteriyel ve fungal enfeksiyona sebep olan patojenlerin de CA içerdikleri tespit edilmiştir. Bu patojenlerin büyümesi ve virulans özelliği için yapılan inhibisyon çalışmaları CA'nın önemli olduğunu göstermiştir [32].

Tablo 1.1: Memeli α -CA izoenzimlerinin organ / doku dağılımı, hücrel lokalizasyonu, CO₂ hidrataz aktivitesi ve hastalıklarla ilişkisi.

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

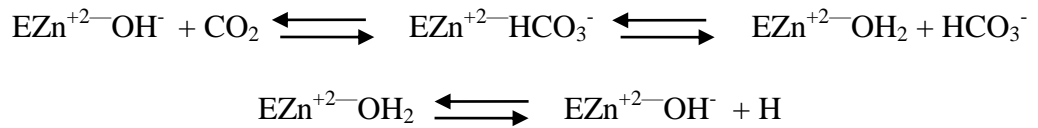
1.4 CA Enziminin Katalitik Mekanizması

Son 60 yıldır yapılan çalışmaların neticesinde aydınlatılmaya çalışılmış ve bu çalışmalar sonucunda CA enziminin tetrahedral yapıda olduğu anlaşılmıştır. CA enzimi, metabolizma için son derece önemlidir. Bunun yanı sıra çözelti ortamında kararlıdır ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi enzimin avantajlı özelliklerindedir [56].

Aktif bölgede Zn^{+2} metal iyonu ile koordine bir şekilde bulunan su molekülü, aynı zamanda Thr199'un hidroksil kısmıyla hidrojen bağı oluşturduğu görülmektedir. Aynı zamanda Glu106'nın karboksilat kısmı Thr99 ile bağlı bulunmaktadır. Zn^{+2} iyonu ve su molekülünün koordine bir şekilde bulunup etkileşimlerinin sonucunda, su molekülünün nükleofil karakteri artmaktadır (Şekil 1.3).

Ayrıca substrat olan CO_2 'yi de nükleofil atak için uygun konuma yönlendirmekte önemli rol oynamaktadır [33]. Zn^{+2} iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur ve bu formda bulunan enzim baziktir. Oluşan aktif form, hidrofobik cepte komşularıyla bağlı olan CO_2 molekülüne saldırır. Bu da, Zn^{+2} iyonu ile koordine bikarbonat iyonunun oluşmasına neden olur. Daha sonra, HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirirerek çözeltiliye geçer ve Zn^{+2} iyonuna su bağlanarak enzim asit formuna dönüşür [33].

Bu süreç aşağıdaki eşitlikte şematik olarak gösterilmiştir:



İkinci reaksiyon katalizin hızını sınırlayan basamaktır. CA II, CA IV, CA V, CA VII ve CA IX gibi katalitik olarak çok aktif olan izoenzimlerde bu işlem aktif bölgede yerleşmiş histidin (His-64) rezidüsü yardımıyla çok etkili bir proton transfer işlemi gerçekleştirilir [57].

1.5 Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için, en çok uygulanan metot, afinite kromotografisidir. Bu metotla, hedef protein kısa zamanda ve tek basamakta yüksek bir verimle binlerce kez saflaştırılmış şekilde elde edilmektedir [58]. İlk defa 1970'lerde uygulanmaya başlamış olan bu yöntemle sonraları karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir. Bu yöntemlerde destek maddesi olan jelle enzimin güçlü bir şekilde bağlandığı inhibitörleri takılmakta ve enzimin bu moleküller aracılığıyla kolonda tutulması sağlanmaktadır. Bu anlamda en çok kullanılan inhibitörler de sülfanilamidlerdir [32].

Tablo 1.2'de gösterildiği üzere, bitki CA enzimi dışında ligand olarak benzen sülfonamid türevleri kullanılmıştır. Bu tabloda gösterilen, uzantı koluna sahip afinite jellerinin yüksek bir kapasiteye sahip oldukları vurgulanmaktadır. Ayrıca matrikse takılan uzantı kollarının farklılığı da, kolon verimi üzerindeki değişikliklere neden olmaktadır.

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için literatürde, farklı uzantı kolları ve ligandlar kullanılarak değişik afinite jelleri sentezlenmiştir (Tablo 1.2). Bu çalışmada, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için önceki araştırmacılardan farklı olarak, uzantı koluna ihtiyaç duyulmadan yüksek verimli bir afinite jeli sentezi planlanmıştır. Sentezi düşünülen afinite jelinin reaksiyon süresinin kısa oluşu ve taşıyıcı materyalin daha az kimyasal reaksiyona maruz kalması büyük bir avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, ligand olarak tasarlanan karbonik anhidraz enziminin spesifik inhibitörü 4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensülfonamid doğrudan aktive edilmiş Sepharose-4B matriksine bağlanmasının son derece avantajlı olacağı kanaatindeyiz.

Tablo 1.2: CA enziminin saflaştırılması için daha önceki araştırmacılar tarafından sentezlenen afinite jelleri[15].

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

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyaller

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmamızda kullanılan siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, sülfonamid, akrilamid, N, N'-metilen bisakrilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, sodyum karbonat, sodyum sülfat, sodyum klorür, sodyum perklorat, sodyum asetat, di sodyum hidrojen fosfat di hidrat, potasyum tiyosiyanat, potasyum iyodür, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum dodesil sülfat (SDS), N, N, N, N-tetrametiletildiamin (TEMED), fenol-red, standart serum albumin, coomassie brillant blue G-250, Coomassie brillant blue R-250, etanol, metanol, asetik asit, fosforik asit, sülfürik asit, hidroklorik asit, gliserol, β -merkaptto etanol, brom timol mavisi, glisin, amonyum persülfat, CO₂ gazı ve diğer kimyasal madde ve malzemeler piyasadan temin edilmiştir.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

UV-Spektrometresi : Biotek Power Wax XS

Soğutmalı santrifüj : Sigma, EBA-12R

pH-metre : Orion- model 920A

Elektroforez tankı : Hoefer, HIS

Peristaltik pompa : Pharmacia Fine Chemicals (Chromatograph Attd.S1211)

Hassas terazi : Libror, AEG-220 (Shimadzu)

Kromotografi kolonu:Sigma (1,5x 10 cm)

Kronometre : Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr

Otomatik pipetler : Eppendorf, Medisis

Magnetik karıştırıcı : IKA Combimag RCO

Çalkalayıcı : Clifon

Buz makinesi : Fiocchetti Scotsman Automatic ice machine AF 10

Vorteks : Fisons Whirli Mixer

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

0.1 M NaHCO₃ Tamponu (pH 10.0);afinite jelinin sentezlenmesinde kullanılan tampon çözelti: 8.401 g (0.1 mol) NaHCO₃ 950 mL distile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 10.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

25 mM Tris-Base / 0.1 M Na₂SO₄, (pH: 9.5, 9.0, 8.5, 8.0, 7.5, 7.0, 6.5) afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon çözeltiler : 3,0275 g (25 mmol) Tris-Base ve 14.2 g (0.1 mol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözülüp, 1 N HCl ile yukarıda belirtilen pH'lara getirilir. Daha sonra son hacimler 1 litreye tamamlanarak çözelti hazırlanır.

Hemolizat tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan 25 mM Tris-Base / 22 mM Na₂SO₄, (pH: 9.5, 9.0, 8.5, 8.0, 7.5, 7.0, 6.5) tampon çözeltiler: 3.0275 g (25 mmol) Tris- Base ve 3.124 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözülüp, 1 N HCl ile yukarıda belirtilen pH'lara getirilir. Daha sonra son hacimler 1 litreye tamamlanarak çözelti hazırlanır.

50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH: 6.3 (kolona tutunmuş hCA-I izoenziminin elüsyonu için kullanılan çözelti) : 3.55 g (25 mmol) Na₂HPO₄ ve 29.25 g NaCl 450 mL destile suda çözülüp, pH'sı 6.3'e getirildikten sonra toplam hacim 500 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlanır.

0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄, pH: 5.6 (kolona tutunmuş hCA-II izoenziminin elüsyonu için kullanılan çözelti) : 15.31 g (0.125 mol) NaClO₄ ve 2.04 g (0.15 mol) NaCH₃COO alınarak 200 mL destile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 5.6'ya getirildikten sonra, toplam hacim destile su ile 250 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlanır.

0.1 M KI / 0.1 M Tris- SO₄, pH: 7.0 (hCA-I izoenzimi için kullanılan elüsyon çözeltisi) : 33.2 g (0.2 mol) KI ve 6.05 g (0.05 mol) Tris 450 mL destile suda çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7.0'ye getirildikten sonra, son hacim 500 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlanır.

50 mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN, pH: 6.3 (hCA-II izoenzimi için kullanılan elüsyon çözeltisi) : 3.55 g (25 mmol) Na₂HPO₄ ve 9.7 g (0.1 mol) KSCN 450ml destile suda çözülerek, pH'sı 6.3'e getirildikten sonra toplam hacim 500 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlanır.

0.15 M Na₂CO₃ / 0.1 M NaHCO₃, pH: 10.0 (CO₂- hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi) : 15.9 g (0.15 mol) Na₂CO₃ ve 8.4 g (0.1 mol) NaHCO₃ alınarak, 1 litre destile suda çözülmesiyle hazırlanır.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu :

1.5 g Tris ve 7.2 g glisin 50 mL suda çözülür. Daha sonra bunun üzerine 5 mL'lik % 0.1'lik SDS (sodyum dodesil sülfat) ilave edilir ve toplam hacim destile su ile 500 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlanır.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu :

0,5 M Tris-HCl (pH: 6.8)	2.5 mL
% 10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkapto etanol	1.0 mL
Brom timol mavisi	0.01 g
Destile su	0.5 mL

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu :

Tris-HCl	3.0 g
Glisin	14.4 g
SDS	1.0 g

Destile su ile son hacim 1 L'ye tamamlanır.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı :

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları, Tablo 2.1'de verilmektedir.

Tablo 2.1: SDS-elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayrırma Jeli	Yığıma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akril amid/Bis (% 30)</u> Akril amid 15 g Bis 0.4 g Son hacim destile su ile 50 ml' ye tamamlanır.	<u>1.65 mL</u>	<u>2.6 mL</u>
<u>Destile su</u>	<u>20.1 mL</u>	<u>12.2 mL</u>
<u>1,5 M Tris-HCl (pH: 8.8)</u> 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.	<u>12.5 mL</u>	–
<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.	–	<u>5 mL</u>
<u>% 10'luk SDS</u> SDS 1 g Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	<u>0.5 mL</u>	<u>200 µL</u>
<u>TEMED</u>	<u>25 µL</u>	<u>20 µL</u>
<u>% 10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1 g Son hacim destile su ile 10 mL olur.	<u>750 µL</u>	<u>400 µL</u>

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan boyama çözeltisi :

0.66 g Coomassie brilliant blue R-250, 120 mL metanolde çözülür ve bu çözeltiliye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL saf su eklenerek çözelti hazırlanır.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi : % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL saf su içermektedir. Çözelti 75 mL asetik asit, 50 mL metanol ve 875 mL saf su eklenerek hazırlanır.

Protein tayininde kullanılan standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL) : 25 mg standart serum albumin 25 mL saf suda çözülerek çözelti hazırlanır.

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti : 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanolde çözülür ve bu çözelti üzerine 100 mL % 95'lik fosforik asit ilave edilir. Çözeltinin son hacmi saf su ile 1 litreye tamamlanarak çözelti hazırlanır.

2.2 Yöntemler

2.2.1 Protein Tayini

2.2.1.1 Kalitatif Protein Tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm'de maksimum absorbanans göstermesi esasına dayanan Warburg metodu olarakta bilinen yolla gerçekleştirilmektedir [60]. Eluatlar eşit hacimde kuvars küvetlere alınarak, absorbanansları UV-spektrofotometrede köre karşı okutulmuştur.

2.2.1.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Bu yöntemle, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltileri ve hemolizatlardaki protein miktarları belirlenir. Negatif bir yüke sahip olan ve boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, fosforik asitli ortamda protein üzerindeki pozitif yüklere bağlanmaktadır. Oluşan kompleks, 595 nm dalga boyunda maksimum absorbands göstermektedir. Protein ile boyanın bağlanması çok hızlı gerçekleşmektedir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [61].

Tayin işlemlerinde; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alınır ve destile su ile tüm tüplerin hacmi 0.1 mL'ye tamamlanır. 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi her bir tüpe ilave edilerek vorteks ile karıştırılır. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm dalga boyunda 3 mL'lik kuvars küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okunur. Kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanılır. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri, standart grafik olarak elde edilir (Şekil 3.1). Elde edilen bu değerler ile standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlenir.

2.2.2 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

2.2.2.1 CO₂ - Hidrataz Aktivitesi

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması esnasındaki aktivite ölçümleri, CO₂- hidrataz aktivitesi yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur- Anderson yöntemidir [62].

Bu yöntemde; CO₂'in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH'ın 10.0'dan 7.4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Tampon olarak da pH'sı 10 olan karbonat tamponu kullanılmıştır (0.15 M Na₂CO₃ + 0.1 M NaHCO₃) [63].

Deney prosedürü, şu şekilde gerçekleşmektedir :

Reaksiyon tüpüne önce 2 mL indikatör ve 1.5 mL doymuş CO₂ çözeltisi konulmuştur. Bu karışımın üzerine, 0.1 mL kolondan alınmış enzim çözeltisi eklendikten hemen sonra aynı anda 0.4 mL karbonat tamponu ilave edilerek, kırmızı rengin sarıya dönmesi için geçen süre kronometre ile belirlenir (tc). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce enzim çözeltisi yerine 0.1 mL saf su konularak tekrarlanır.

Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak belirlenmiştir. Enzimin aktivitesi; enzimsiz CO₂- hidratasyon süresi (to) ile enzimli reaksiyon süresi (tc) arasındaki farkın tc' ye bölünmesi ile bulunmaktadır ve

$$EU = (t_o - t_c) / t_c$$

formülüne göre hesaplanmaktadır [63].

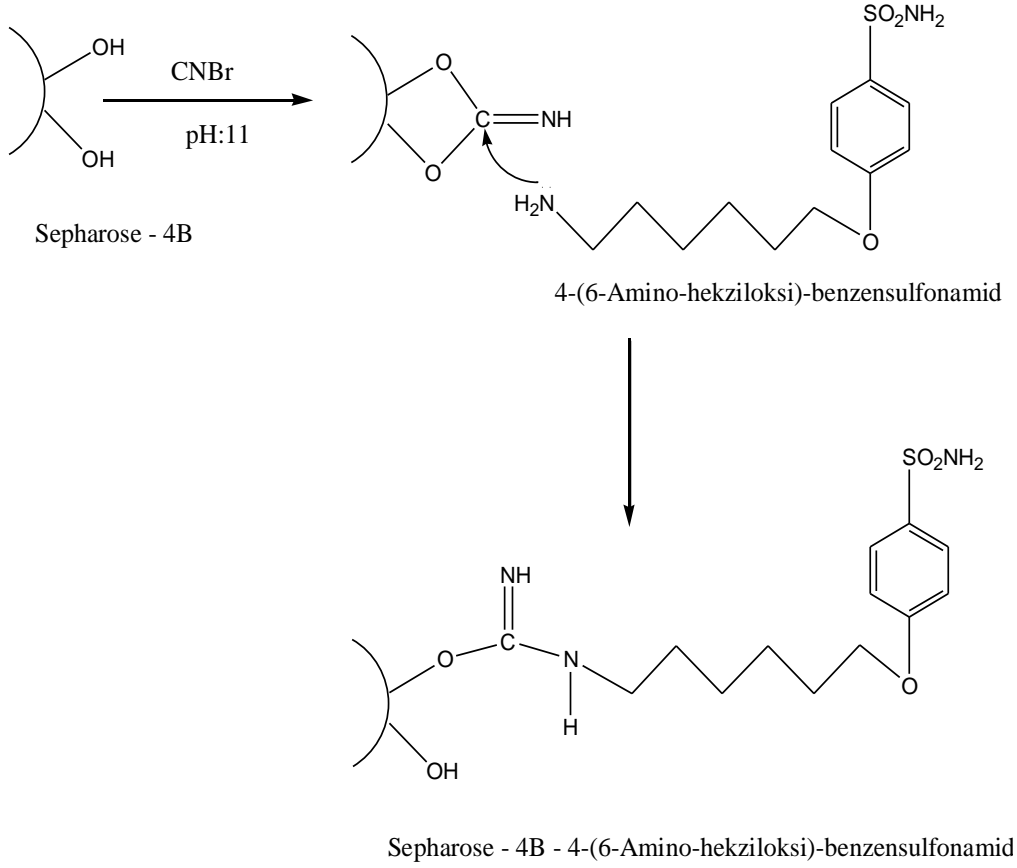
2.2.3 Afinitive Jelinin Hazırlanması

2.2.3.1 Sepharose-4B Afinitive Kolonunun Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan afinitive jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, hiçbir uzantı kolu kullanılmadan 4-(6-Amino-heksiloksi)-benzen-sülfonamid, Sepharose-4B'ye bağlanmıştır. Burada Sepharose-4B matriksi, 4-(6-Amino-heksiloksi)-benzen-sülfonamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmı oluşturmaktadır. Afinitive jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlanmıştır.

Sepharose-4B'nin Aktifleştirilmesi ve Sülfonamidin Bağlanması

20 mL Sepharose-4B alınıp, 20 mL saf su eklenerek iyice yıkanıp dekante edilir. Bu işlem birkaç defa yapılarak yapısı bozuk jellerin ortamdaki uzaklaştırılması sağlanır. Buz banyosu içerisinde olmak şartıyla karıştırılan jel süspansiyonuna, 4 g toz haline getirilmiş CNBr eklenerek magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmaya devam edilir. pH-metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile 11'e çıkarılır ve reaksiyon boyunca bu pH'ın üstünde tutulur ve pH değişmeyinceye kadar devam edilir. pH ayarlanırken süspansiyonun sıcaklığı yaklaşık 20°C'de tutulur (gerekirse süspansiyona buz ilave edilebilir). pH ayarlaması yapıldıktan sonra süspansiyon 24 saat buzdolabında bekletilir. Karışım buchner hunisine aktarılarak süzülür. Daha sonra pH'sı 10 olan 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO₃ tamponu ile iyice yıkanarak jel bir behere alınır. Yıkanan jel aynı tampon çözelti içerisinde muhafaza edilir. Aynı tampondan (0,1 M NaHCO₃) yaklaşık 20 mL alınarak içerisinde 100mg 4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensülfonamid çözülür ve tampon içerisindeki jel üzerine eklenerek yaklaşık 90 dk karıştırılır. Hazırlanan süspansiyon +4°C'de 16 saat bekletilir. 16 saat sonunda jel tekrar buchner hunisine alınır yeteri kadar saf su ile yıkanır. Daha sonra pH : 8.7 CA dengeleme tamponu ile yıkanarak dengeleme işlemi yapılır. Aynı tampon içerisinde muhafaza edilir. Bu işlemler sonunda matriks olarak kullanılan Sepharose-4B aktifleştirilip hiçbir uzantı kolu kullanılmadan aktif olan jele doğrudan ligand bağlanmıştır. Reaksiyonun açık formülleri aşağıda gösterilmiştir:



Şekil 2.1: Afinite jelinin hazırlanması.

2.2.4 İnsan Eritrosit İzoenzimlerinin Saflaştırılması

2.2.4.1 Kan Numunelerinin Alınması, Hemolizat Eldesi, Afinite Kolonuna Uygulanması ve CA Enziminin Elüsyonu

Deneyle için antikoagulanlı tüplere, sağlıklı insanlardan yaklaşık 20 mL kan alındı ve kanlar ile hemen çalışıldı. İlk olarak eritrositleri ayırmak amacıyla tüplere konan kan, 20 dakika boyunca 5.000 rpm ve +4°C sıcaklıkta santrifüj edildi. Üst kısımda kalan plazma ve lökosit tabakaları dikkatli bir şekilde ayrıldı. Bu işlemler sonucunda elde edilen eritrositler, kendi hacimlerinin 1.5 katı soğuk, destile su ile hemoliz edildi. Hemolizin tam olarak gerçekleşmesi için, 0°C’de hemolizat yarım saat süreyle karıştırıldı [52].

Elde edilen hemolizattan, hücre zarlarının ayrılması için 15.000 rpm ve +4°C sıcaklıkta santrifüj işlemi yapıldı. İşlem sonrasında tüplerdeki süpernatant alındı ve dibe çökmüş olan hücre zarları atıldı. Hemolizatın pH'sı katı Tris-baz ile 8.7 değerine ayarlanarak afinite kolonuna tatbik edilmek üzere hazır hale getirildi.

İnsan eritrositlerinden CA izoenzimlerinin saflaştırılmasında kullanılan afinite kolonu önce 25 mM Tris-Base / 0.1 M Na₂SO₄ (pH: 8.7) tampon çözeltisi ile dengelenir. Hazırlanan hemolizat dengelenen kolona tatbik edilir. Daha sonra 25 mM Tris-Base / 22 mM Na₂SO₄ (pH: 8.7) tampon çözeltisi ile yıkanır. Böylece, insan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin büyük kısmı jele tutunur ve diğer safsızlıklardan uzaklaştırılır.

Bu işlemlerden sonra ilk olarak hCA-I izoenziminin elüsyonu için 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl (pH: 6.3) tamponu kolona tatbik edilir ve 5 mL saf enzim fraksiyonları toplanır. Daha sonra kolona hCA-II izoenziminin elüsyonu için 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH: 5.6) tamponu eklenerek 5 mL saf enzim fraksiyonları toplanır. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek toplanan bütün fraksiyonların ayrı ayrı karbonik anhidraz aktiviteleri ve Bradford yöntemi ile kantitatif protein miktar tayini yapılır ve saflaştırma oranı bulunur.

2.2.4.2 İzoenzimleri Ayırma Deneyleri

Afinite kolonuna bağlanmış olan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerini ayırmak için kullanılan elüsyon çözeltilerinin, afinite kolonuna uygulama yöntemleri ve konsantrasyonları aşağıdaki gibidir:

(i) **50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl (pH: 6.3) çözeltisi ile hCA-I ve 50 mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN (pH: 6.3) çözeltisi ile hCA-II izoenziminin elüsyonu :** Burada ilk olarak hCA-I izoenzimini elue etmek için pH'sı 6.3 olan fosfat tamponu içerisinde 1 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. hCA-I elüsyonu tamamlandıktan sonra hCA-II izoenzimini elue etmek için, yine pH'sı 6.3 olan fosfat tamponu içerisinde 0.2 M KSCN çözeltisi kullanılarak elüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Kolonun akış hızı 20 ml/saat olarak ayarlanmış, her bir tüp fraksiyonu 5'er ml olarak toplanmıştır. Her bir tüp eluatında, 280 nm dalga boyunda protein tayini ve enzim aktivitesi için, CO₂-hidrataz aktivitesi tayini yapılmıştır.

(ii) 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl (pH:6.3) çözeltisi ile hCA-I ve 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH:5.6) çözeltisi ile hCA-II izoenziminin elüsyonu: Bu çalışmamızda ise hCA-I elüsyonu sabit tutulup hCA-II izoenziminin elüsyon çözeltisi değiştirilmiştir. pH'sı 5.6 olan 0,1 M asetat tamponu içerisinde çözülerek hazırlanan 0.5 M NaClO₄ çözeltisi hCA-II elüsyonu için kullanılmıştır. Kolonun akış hızı 20 mL/saat olarak ayarlanıp elüsyon hacimleri 5'er mL fraksiyonlar şeklinde toplanmıştır.

(iii) 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄ (pH: 7.0) çözeltisi ile hCA-I ve 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH: 5.6) çözeltisi ile hCA-II izoenziminin elüsyonu: Bu denememizde, hCA-I izoenziminin elüsyonu için Tris tamponu içerisinde çözülmüş 0.1 M KI (pH: 7.0) çözeltisi, hCA-II izoenzimi elüsyonu için ise asetat tamponu içerisinde çözülmüş 0.5 M NaClO₄ (pH: 5.6) çözeltisi kullanılmıştır. Kolonun akış hızı ve elüsyon hacimleri yapılan diğer denemelerle aynıdır.

(iv) 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄ (pH: 7.0) çözeltisi ile hCA-I ve 50 mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN (pH: 6.3) çözeltisi ile hCA-II izoenziminin elüsyonu : Bu denemede de, kolondan alınmak istenen hCA-I izoenziminin elüsyon çözeltisi sabit tutulmuştur. Sadece çalışma şartlarından hCA-II izoenziminin elüsyon çözeltisi, fosfat tamponu içerisinde çözünerek hazırlanmış 0.2 M KSCN (pH: 6.3) ile değiştirilmiştir.

2.2.4.3 Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Afinite kromatografisi ile insan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin, saflık derecesini kontrol etmek için % 3-10 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE), Laemmli tarafından belirtilen yöntemle göre uygulanmıştır [64].

Jelin hazırlanması ve çalışma şu şekilde yapılmıştır; ilk olarak elektrofrez plakaları önce su sonra alkol ile iyice yıkanır. İki cam plaka birbiri üstüne konularak ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirilir.

Ayrırma jeli hazırlanarak, plakalar arasına enjektörle dökülüp bu işlem yapılırken jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir. Jel yüzeyinin düzgün olması için, % 0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturulup, jel katılaşmaya kadar beklenir (30 dak.).

Ayrırma jelinin katılaşmasından sonra, jelin düzleştirilmesi için konan % 0,1'lik SDS dökülür ve yağma jeli, tarağın yerleştirilmesine izin verecek bir şekilde plakaların üst yüzeyine kadar doldurulur. Tarak, jelin üzerine dikkatli bir şekilde yerleştirilerek bir süre tarağın kuyucuklarının oluşması için beklenir. Bu işlemden sonra tarak dikkatlice çıkarılarak, oluşan kuyucuklar işaretlenir. Jelin üstü önce saf su, daha sonra yürütme tamponu ile yıkanır. Elektrofrez tankının alt ve üst kısmına ise yürütme tamponu konulur.

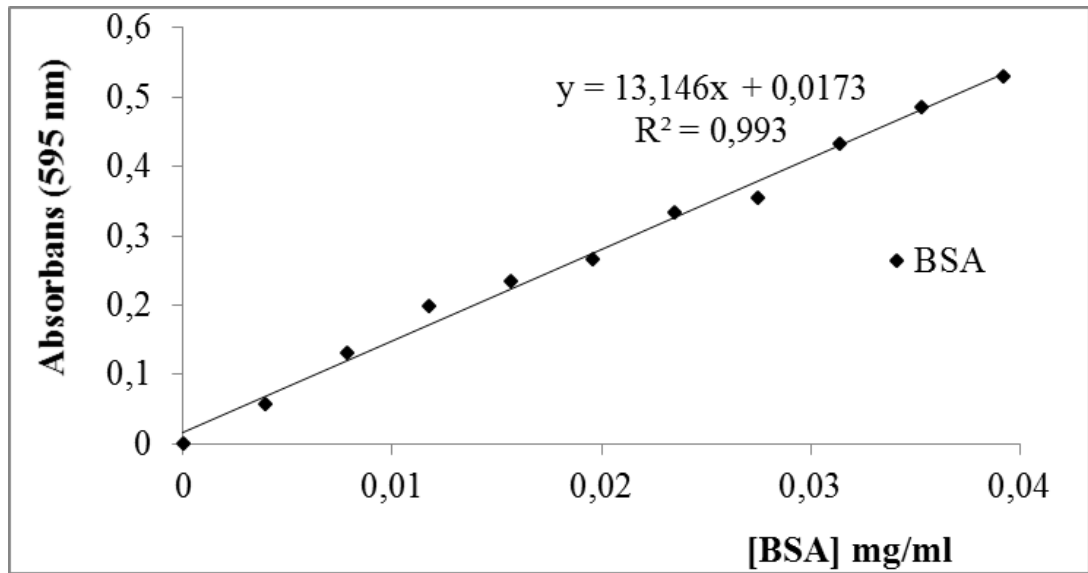
Elektrofrez kuyucuklarına uygulanacak numunelerin her biri 20 µg protein ihtiva edecek şekilde hazırlanır. Toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1/1 oranında hazırlanan numunelere numune tamponu katılarak bu numuneler, üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edilir. Daha sonra numuneler soğutularak elektrofrez kuyucuklarına çok ince bir enjektör yardımıyla dikkatlice uygulanır. Tank kapağı kapatılarak, alt taraftan (+) kablo (anod), üst taraftan (-) kablo (katot) yerleştirilir. Elektrofrez takılan güç kaynağı, önce 80 voltta, daha sonra 150 volta çıkarılıp oda sıcaklığında 45 dk (protein ve boya çözeltisinin yürütmesi için) beklenir.

Akım kesilerek cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılarak özel kabına konur. Jelin üstünü örtünceye kadar renklendirme çözeltisi dökülür. 20 dk kadar çalkalayıcı üzerinde bırakılır. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renk açma çözeltisine konulur. Belirli aralıklarla çözeltiyi değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalanır. Mavi renge boyanan renksizleştirme çözeltisi ise, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar kullanılır. Jel, renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekilir [65].

3. BULGULAR

3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

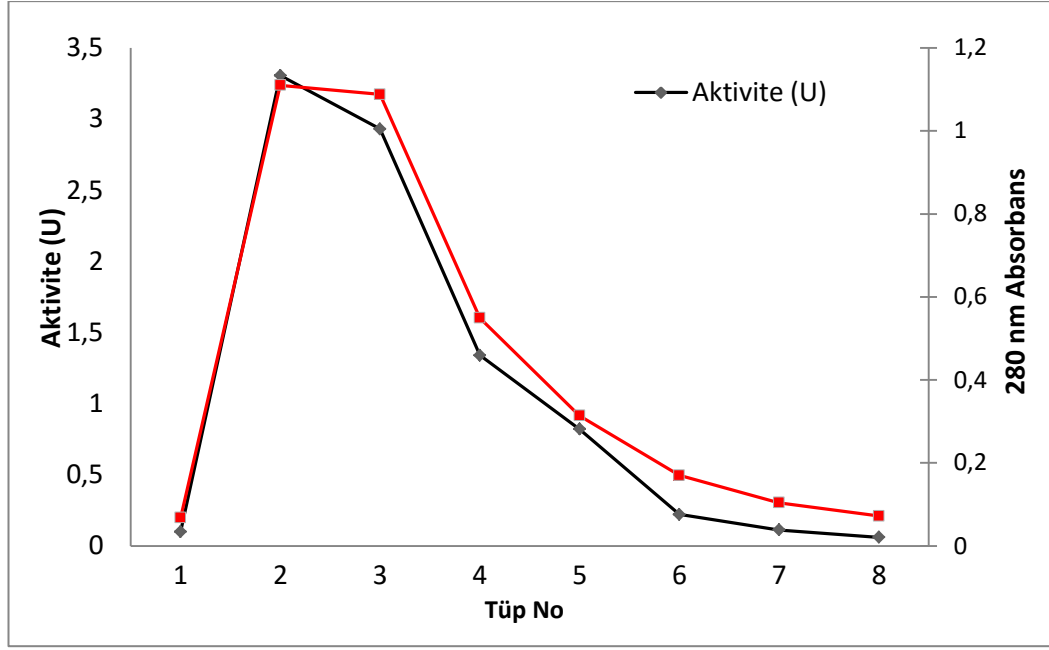
Elde ettiğimiz enzim çözeltisindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. İlk olarak standart bir eğri hazırlanmıştır. Hemolizat ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu standart grafikten faydalanılarak bulunmuştur. Standart çözeltilerin $\mu\text{g/ml}$ proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



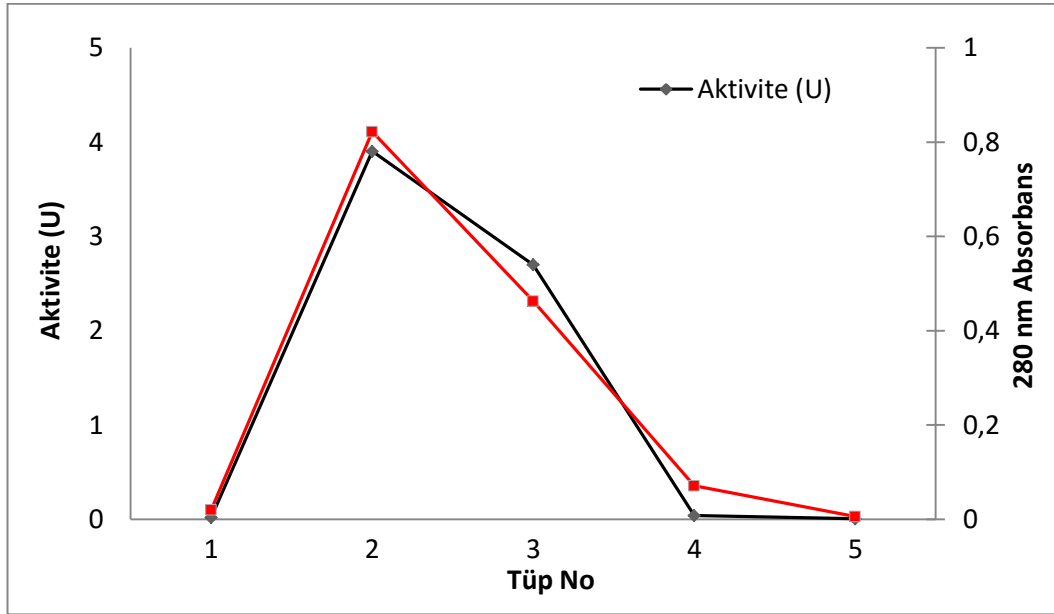
Şekil 3.1: Bradford yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik.

3.2 CA İzoenzimlerinin Afinitive Kromatografisi ile Saflaştırılması

Bölüm 2.2.4.1’de anlatılan şekilde hemolizat hazırlanıp kolona yüklendi ve izoenzimlerin ayrılması için farklı elüsyon tamponları kullanıldı. Elde edilen veriler ile saflaştırılan enzimlerin Protein(280nm)- Aktivite grafikleri çizildi.



Şekil 3.2: Kolona tutunmuş hCA-I izoenziminin 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl (pH: 6.3) tamponu ile elüsyonu sonucu Protein-Aktivite grafiği



Şekil 3.3: Kolona tutunmuş hCA-II izoenziminin 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH: 5.6) tamponu ile elüsyonu sonucu Protein-Aktivite grafiği

3.2.1 CA İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları Sonuçları

Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen saf enzimden ve hemolizattan alınan 1'er mL numune ile, hidrataz aktivitesi ve Bradford yöntemi kullanılarak protein tayini yapılmıştır.

Elde edilen değerlere bakılarak hemolizatin Sepharose-4B-4-(6-Aminohekziloksi)-benzensülfonamid afinite kolonuna uygulanması sonucunda saflaştırma işleminin kaç kat yapıldığı kaydedildi ve sonuçlar Tablo 3.1'de gösterildi.

Tablo 3.1: hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için saflaştırma tablosu.

	Fraksiyon (mL)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Hemolizat	38	4.07	154.66	1.2	45.6	3.391	100	
hCA-I	8	3.31	26.48	0.015	0.12	240.7	81.3	65.1
hCA-II	8	3.98	31.84	0.012	0.096	331.7	97.8	97.8

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

Sentezlenen yeni afinite jeli ile insan eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz (hCA-I ve hCA-II) izoenzimlerinin saflaştırılması deneylerinde, kolon şartları stabilize edilerek her bir izoenzimin kolondan elüsyonu için farklı pH değerleri (6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5); farklı sıcaklık değerleri (5°C, 15°C, 25°C, 35°C); farklı iyonik şiddet (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5) ve farklı elüsyon tamponları kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

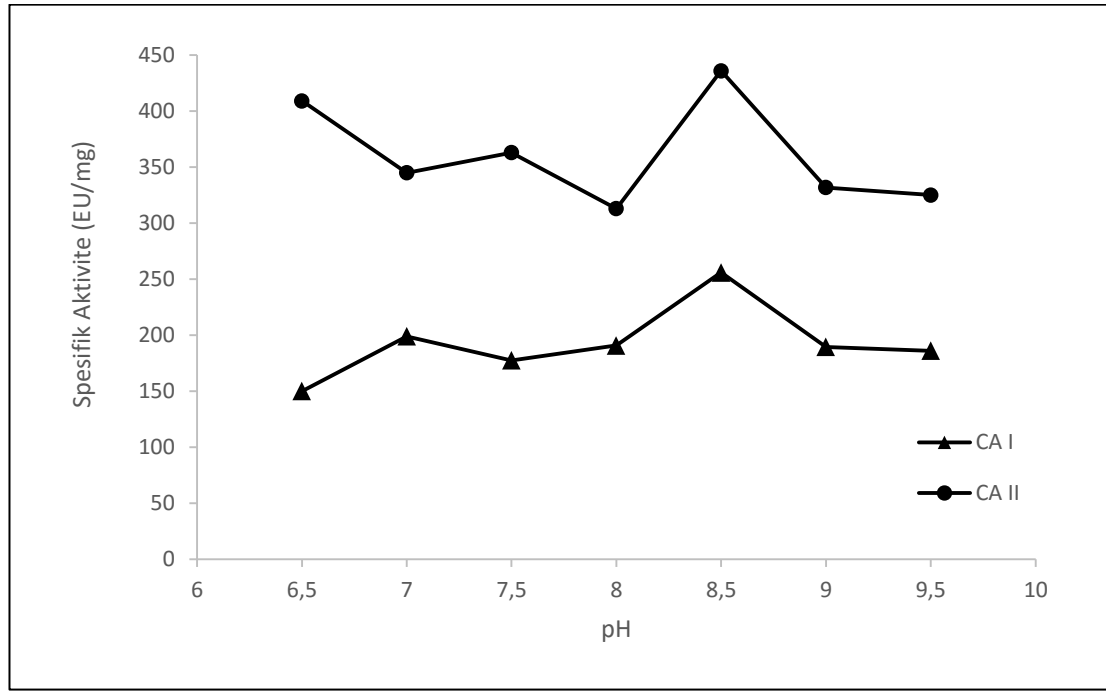
(A) : 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl (pH: 6.3) hCA-I ve 50 mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN (pH: 6.3)

(B) : 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄ (pH: 7.0) ve 0.1 M NaCH₃COO/ 0.5 M NaClO₄ (pH: 5.6)

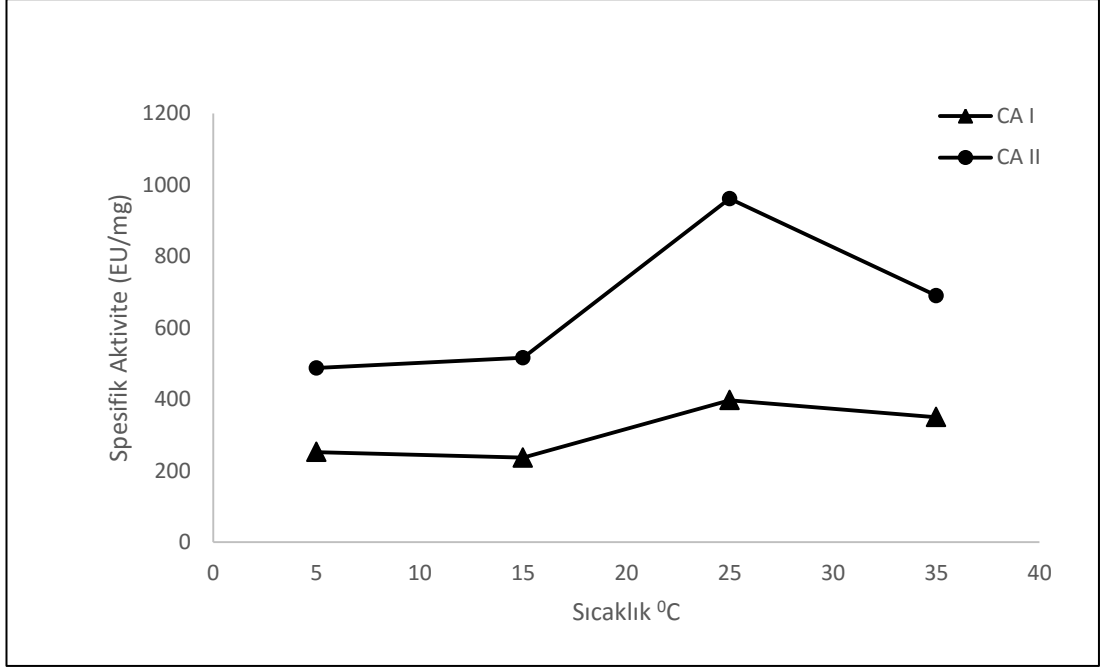
(C) : 0.1 M KI / 0.1 M Tris-SO₄ (pH: 7.0) ve 50 mM Na₂HPO₄ / 0.2 M KSCN (pH: 6.3)

(D) : 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl (pH: 6.3) hCA-I ve 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH: 5.6)

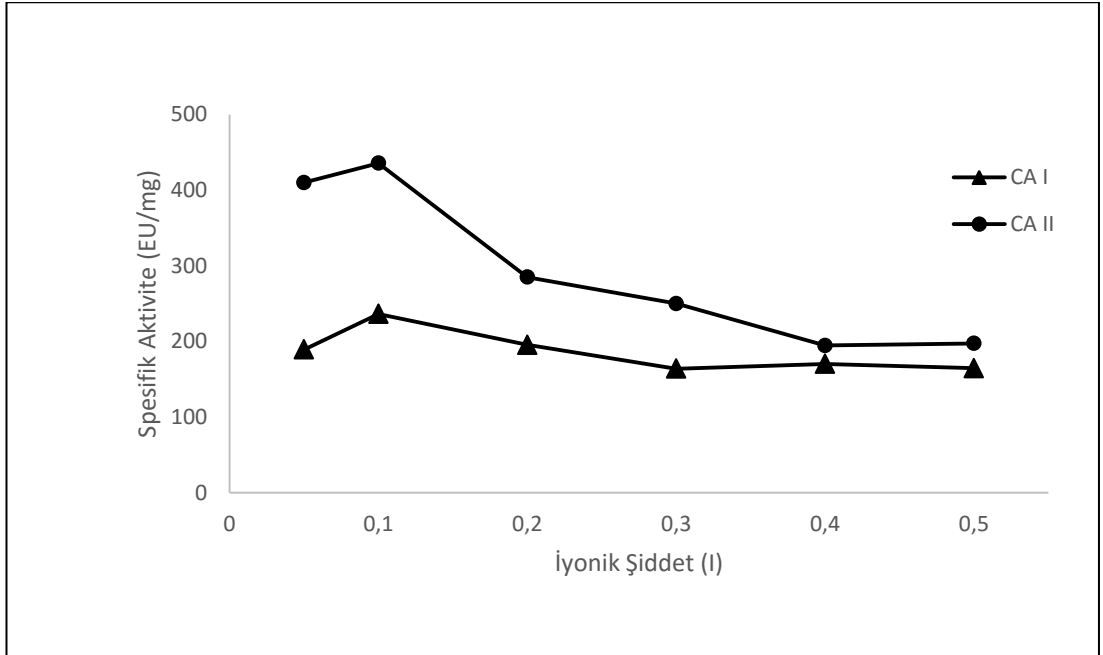
Tüm denemelerde her bir kolon fraksiyonu için, 280 nm dalga boyunda protein absorbans ve CO₂-hidrataz aktivite tayini yapılmıştır [63, 64]. Elde edilen sonuçlar, grafiğe aktarılarak optimum şartlar belirlenmiştir (Şekil 3.2, 3.3, 3.4, 3.5).



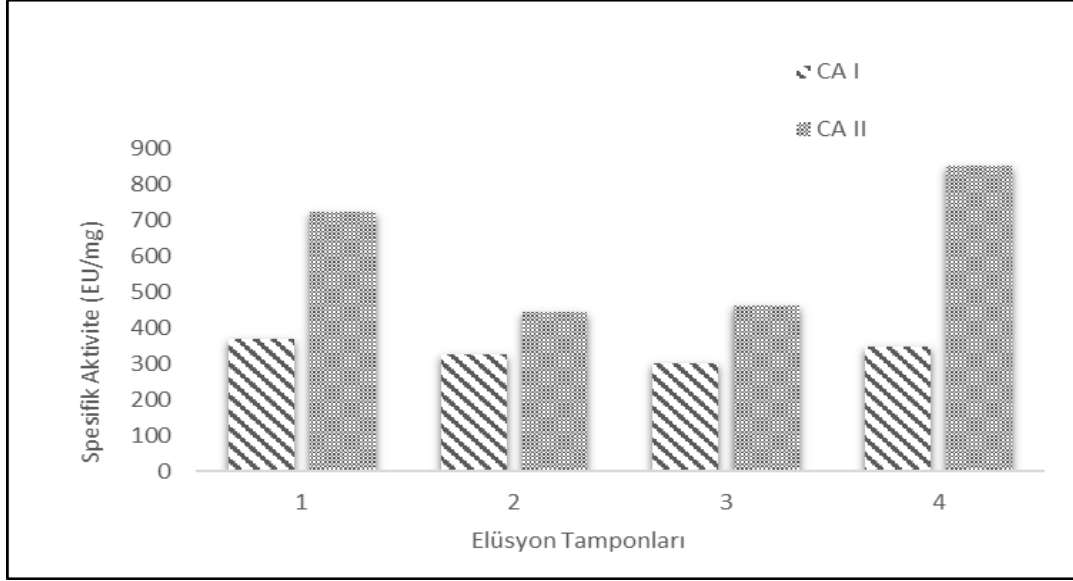
Şekil 3.4: Farklı pH değerlerinde kolona tutunan, insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO₂-hidrataz aktivite değerleri.



Şekil 3.5: Farklı sıcaklık değerlerinde kolona tutunan, insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO₂-hidrataz aktivite değerleri.



Şekil 3.6: Farklı iyonik şiddet değerlerinde kolona tutunan, insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO₂-hidrataz aktivite değerleri.

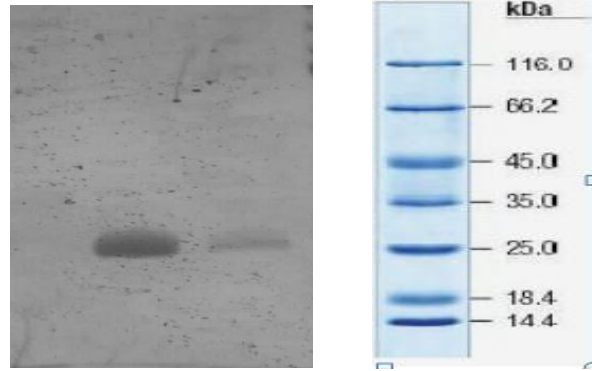


Şekil 3.7: Farklı elüsyon tamponlarıyla kolona tutunan, insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) için toplam CO₂-hidrataz aktivite değerleri.

1. 50 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl – 50 mM Na₂HPO₄/0.2 M KSCN; **2.** 50 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl – 0.1 M NaCH₃COO/0.5 M NaClO₄; **3.** 0.1 M KI/ 0.1 M Tris-SO₄ – 0.1 M NaCH₃COO/0.5 M NaClO₄; **4.** 0.1 M KI/ 0.1 M Tris-SO₄ – 50 mM Na₂HPO₄/0.2 M KSCN

3.2.3 İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Afinite kolonundan en iyi elüsyon tamponları ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin (hCA-I, hCA-II) saflığını kontrol etmek için, bölüm 2.2.5’de anlatıldığı gibi hazırlanan slab jel SDS-PAGE elektroforezi ile, insan eritrositlerinden saflaştırılan enzim numunelerinin protein bantları elde edilmiştir. Elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: Afinite kolonundan saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin SDS-PAGE elektroforezi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyolojik araştırmaların büyük bir kısmında enzimler yer almaktadır [10]. Canlı metabolizmalarında biyolojik katalizör olarak görev yapan enzimler, % 100 oranında verim sağlayarak kimyasal tepkimeleri hızlandırır [2].

Büyük bir kısmı protein yapısında olan enzimler değişen şartlara karşı yüksek hassasiyet gösterdikleri için enzim saflaştırması oldukça zor bir süreçtir. Substrat konsantrasyonu, pH, enzim konsantrasyonu, iyonik şiddet, sıcaklık, hormonlar, allosterik etkiler, inhibitör veya aktivatörler enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörlerdir [10]. Bu sebeple çalışmamızda tek basamakta yüzlerce kat saflaştırmayı mümkün kılan, biyoteknoloji, biyokimya ve tıp alanında saf enzim elde etmede tercih edilen afinite kromatografi tekniği kullanılmıştır. Ayrıca bu yöntemde kullanılan materyalin (sentezlenen jel) tekrar tekrar kullanılması mümkündür. Birkaç basamakta gerçekleşen saflaştırma işlemleri bu yöntemle tek basamakta gerçekleştirilebilmektedir.

Çalışmamızda, karbonik anhidraz izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması için farklı bir yöntem kullanarak, verimi yüksek olan orijinal bir afinite jeli sentezlenmiştir. Kullanılan afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, hiçbir uzantı kolu kullanılmadan 4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensülfonamid, doğrudan Sepharose-4B'ye bağlanmıştır. Burada Sepharose-4B matriksi, 4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensülfonamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmı oluşturmaktadır.

Sepharose-4B kolon materyali kullanılarak yapılan saflaştırma yöntemi basit, kullanışlı, yüksek verime sahip, hızlı ve net sonuçlar vermesi gibi özellikleri bakımından çok tercih edilmektedir.

Ayrıca, çalışmamızda Sepharose-4B'nin tercih edilmesinde uzun kullanım ömrünün olması, mekanik strese dayanıklılığı ve akış oranının iyi olması gibi özelliklerinden dolayı matriks olarak seçilmesinde önemli rol oynamıştır. Sentezlenen yeni afinite jelinin en büyük özelliği kısa sürede sentezleniyor olması ve matriks çok basamaklı reaksiyona mağruz kalmamasıdır. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesi sonrası yüksek pH'da 4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensülfonamid ile bağlanması sonucu jel sentezlenmektedir. Sentez basamak sayısı azaldıkça matriksin hasar görme olasılığı düşmektedir.

Ligand olarak kullanılan 4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensülfonamid bileşiği CA-I ve CA-II için oldukça etkili bir inhibitördür. K_i değerleri nanomolar düzeydedir. CA-I ve CA-II için sırasıyla 63.0 ve 3.9 nM'dır [66]. Özellikle CA-II için çok etkili bir inhibitör olması ve eritrositlerde CA-I'e göre daha az miktarda bulunan CA-II enzimini saflaştırmakta çok daha etkilidir.

Çalışmalarımız boyunca, orijinal afinite jeli için denenen tüm koşulların kolon elüatları eşit hacimde alınıp, bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metot, proteinlerin ihtiva ettikleri tirozin ile triptofan moleküllerinin 280 nm dalga boyundaki spesifik bir absorpsiyon göstermeleri prensibine dayanmaktadır [60]. Kullanılan bu metodun oldukça pratik olması ve numunenin tekrar geri kazanımına olanak sağlamasından dolayı protein tayini için bu metot kullanılmıştır.

Kantitatif protein tayini için ise uygulanabilirliğinin daha kolay oluşu, az reaktif gerektirmesi ve her çalışmada ayrı bir standart hazırlamaya ihtiyaç duyulmaması gibi avantajlarından dolayı çalışmamızda Bradford yöntemi kullanılmıştır.

Elde edilen elüatların enzim aktivitesinin belirlenmesinde Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson metodu kullanılmıştır [62].

Bu metot da, CO₂'nin H₂O ile reaksiyonu sonucu oluşan H₂CO₃ molekülünün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak, ortamın pH'sını değiştirme süresi ölçülmektedir.

Sepharose-4B-4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensülfonamid yapısına sahip olan afinite jeli ile saflaştırılan enzimlerin saflık kontrolü Laemmler tarafından belirtilen yöntemle göre uygulanmıştır [64]. Yapılan çalışmanın sonucuna göre hem hCA-I hem de hCA-II izoenzimleri için SDS-PAGE'de tek bant elde edilmiştir (Şekil 3.6). hCA-I izoenziminin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 30 kDa, hCA-II izoenziminin ise 29.3 kDa molekül ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Bulunan değerlerinde literatürle uyumlu olduğu görülmektedir [15, 29, 59, 67].

Sentezlediğimiz yeni afinite jelinin farklı pH'larda enzim tutma kapasitesini belirlemek için her bir izoenzim için 7 farklı pH'da (pH= 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5) denemeler yapılmıştır. Her iki izoenzim için maksimum bağlanma pH: 8.5'te gerçekleştiği belirlenmiştir. Literatürde yapılan diğer çalışmalara baktığımızda Bozdağ ve arkadaşları sentezledikleri Sepharose-4B-etilendiamin-4-izotiyosiyanat afinite jeli ile pH çalışmalarında CA-I için optimum bağlanma pH:8.5 iken CA-II için optimum bağlanmayı pH:9.5 olarak bulmuşlar [67]. Şahin ve arkadaşlarının sentezledikleri afinite jeli ile yaptıkları çalışmada hem CA-I hem de CA-II için optimum bağlanma pH'sını 8.5 olarak bulmuşlar [68]. Özen Özensoy'un yaptığı çalışmada sentezlemiş olduğu afinite jeli CA-I için optimum bağlanmayı pH:8'de ve CA-II için de optimum bağlanmanın pH:7'de gerçekleştirmiştir[29].

Sıcaklık, enzim saflaştırmada kolon kapasitesine etki eden diğer bir parametredir. Bu amaçla 4 farklı sıcaklık (5°C, 15°C, 25°C, 35°C) değerinde her bir izoenzim için denemeler yapılmıştır. Her iki izoenzim için en uygun sıcaklık değeri 25°C bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara bakıldığında enzimlerin kolona bağlanma dereceleri sıcaklık yükseldikçe azalmaktadır. Bunun sebebi artan sıcaklığın enzimin konformasyonunda değişmelere neden olmasıdır. Ayrıca bağlanmayı gerçekleştiren grupların iyonlaşmalarının da sıcaklık artışından etkilenmesi diğer bir etkidir. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için hazırlanan afinite jellerinde de

benzer sonuçlar görülmektedir fakat Özensoyun yaptığı çalışmada optimum bağlanma her iki izoenzim için de 5°C olarak belirlemiştir [29, 67, 68].

Afinite jelinin enzim tutma kapasitesini etkileyen diğer bir parametre iyonik şiddettir. Ortamda iyon konsantrasyonu arttıkça, bağlanmada rol alan iyon halindeki gruplar, zıt yüklü gruplar tarafından sarılmakta ve adsorpsiyon engellenmektedir. Bu sebeple iyonik şiddetteki artış, enzimin kolona adsorpsiyonunu bir dereceye kadar arttırdığını göstermektedir. Her iki izoenzim içinde en uygun iyonik şiddet değeri $I=0.1$ dir. Daha fazla arttırılan iyonik şiddeti bağlanmayı azaltmaktadır. Bozdağ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sentezledikleri afinite jelinin enzimi tutma kapasitesi iyonik şiddet arttıkça arttığı görülmektedir ve her iki izoenzim için de optimum bağlanma 0.4 iyonik şiddet değerindedir [67]. Diğer bir çalışmada her iki izoenzim için optimum bağlanma iyonik şiddet değeri 0.6 iken gerçekleşmiş [29]. Şahin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada optimum bağlanma CA-I için iyonik şiddet 0.15, CA-II için ise iyonik şiddet 0.3 olarak bulunmuş [68].

Çalıştığımız son parametre ise, farklı elüsyon tampon çiftleri kullanarak karbonik anhidraz izoenzimlerini ayırabilmektir. Bunun için dört farklı elüsyon çifti kullanılmıştır. Bu tamponlardan hCA-I için en uygun elüsyon tamponu 50 mM $Na_2HPO_4/1$ M NaCl (pH: 6.3) iken, hCA-II için 50 mM $Na_2HPO_4/0.2$ M KSCN (pH: 6.3) elüsyon tamponudur. Bozdağ ve arkadaşları CA-I için en uygun elüsyon tamponunu . 0.1 M KI/ 0.1 M Tris- SO_4 ve CA-II için – 0.1 M $NaCH_3COO/0.5$ M $NaClO_4$ elüsyon tamponunu bulmuşlar [67]. Özensoyun yaptığı çalışmada en uygun elüsyon tamponu çiftleri olarak 50 mM $Na_2HPO_4 / 1$ M NaCl, pH:6.3 CA-I için ve 0.1 M $NaCH_3COO / 0.5$ M $NaClO_4$, pH:5.6 CA-II için belirlemiştir [29].

Çalışmamızda farklı bir yöntem kullanarak, verimi yüksek olan orijinal bir afinite jeli sentezlenip insan eritrositlerinden karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri saflaştırılmıştır. Sentezlenen afinite jelinin reaksiyon süresinin kısa sürmesi ve uzantı kolunun kullanılmaması büyük bir avantaj oluşturmaktadır. Ayrıca Sepharose-4B'nin uzun kullanım ömrünün olması, mekanik strese dayanıklılığı ve

akış oranından dolayı matriks olarak seçilmesinde önemli rol oynamıştır. Bu özellikler geniş aralıkta proteinlerin saflaştırılmasında rutin saflaştırma işlemi için oldukça önemlidir.

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

- ❖ Matriks olarak kullanılan Sepharose-4B CNBr ile aktifleştirildi ve uzantı kolu kullanmadan doğrudan ligand olarak 4-(6-amino-hekziloksi)-benzensülfonamid kullanıldı ve Sepharose-4B-4-(6-amino-hekziloksi)-benzensülfonamid afinite jeli sentezlendi.
- ❖ Yapılan denemeler sonunda, CA-I izoenzimi için % 81.3 kolon veriminin yanında 65.1 kat saflaştırma derecesi ile CA-II izoenzimi için ise, % 97.8 kolon veriminin yanında 97.8 kat saflaştırma derecesi elde edilmiştir.
- ❖ CA-I ve hCA-II izoenzimlerinin, tarafımızdan sentezlenen afinite jeline optimum tutunma bazik pH derecesinde (pH:8.5) gerçekleştiği sonucunu ortaya koymuştur.
- ❖ CA-I ve CA-II izoenzimlerinin afinite kolonuna maksimum tutunma sıcaklıklarının 25°C ve I = 0.1 iyonik şiddette gerçekleştiği saptanmıştır.
- ❖ CA-I izoenziminin sentezlenen afinite jelinden elüsyonu için, en uygun tampon çözeltilerin 50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, (pH:6.3), CA-II izoenzimi için ise, 50 mM Na₂HPO₄/0.2 M KSCN (pH: 6.3), olarak tespit edilmiştir.
- ❖ Optimum şartlarda afinite kolonundan elüe edilen CA-I ve CA-II izoenzimlerinin saflığının kontrolü, SDS-PAGE elektroforeziyle kontrol edilmiş ve her iki izoenzim tek bant olarak tespit edilmiştir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Voet, Donald., Voet, Judith G., Pratt, Charlotte W., ‘‘Fundamentals of Biochemistry’’, *JohnWiley & Sons, Inc.*, USA, (1999).
- [2] Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., ‘‘Biyokimya’’, ISBN: 975-6755-20-02, Bölüm 6 Erzurum, (2000).
- [3] Onat, T., Emerk, K., ‘‘Temel Biyokimya’’, İzmir: Saray Medikal Yayıncılık, s:269-284, (1997).
- [4] Alver, A., ‘‘Belirli yaş gruplarındaki sağlıklı bireylerde serum total karbonik anhidraz ve karbonik anhidraz aktivitelerinin belirlenmesi’’, Y. Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon, (1997).
- [5] Maren, T. H. and Janskowska, L., ‘‘Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot’’. *Cur.Eye. Res.*, 4, 399. (1985)
- [6] Fresht A., *Structure and mechanism in protein science*, New York: W.H. Freeman Company, (1999).
- [7] Nelson, D. ve Cox, M., ‘‘Lehninger Biyokimyanın İlkeleri’’, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, 1152 s. (2005).
- [8] Keha E., Küfrevioğlu Ö. İ., *Biyokimya*, Erzurum: Aktif yayınları, (2004).
- [9] Devlin, T.M., *Biochemistry with clinical correlations*, 5th Ed., Newyork: Wiley-Liss inc., (2002).
- [10] Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., *Principles of Biochemistry*, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık, (2005).
- [11] Supuran, C.T., and Scozzafava, A., ‘‘Carbonic Anhydrase Inhibitors’’, *Curr. Med. Chem.*, 1: 61-97, (2001).

- [12] Puskas, L.G., Inuni M., Zahn, K., Yukawa, H., “A periplasmic, alpha-type carbonic anhydrase from *Rhodospseudomonas palustris* is essential for bicarbonate uptake”, *Microbiology*, 146, 2957-66, (2000).
- [13] Gilmour, K.M., Perry, S.F., “Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish”, *J. Exp. Biol.*, 212; 1647-1661, (2009).
- [14] Nuti, E., Orlandini, E., Nencetti, S., Rossello, A., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase and Matrix Metalloproteinase Inhibitors. Inhibition of Human Tumor-Associated Isozymes IX and Cytosolic Isozyme I and II with Sulfonylated Hydroxamates", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 2298, (2007).
- [15] Şahin, A. “Bazı Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, (2008).
- [16] 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 anhydrase in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum* the eta-carbonic anhydrases”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 4389-96, (2014).
- [17] McDevitt, M.E., Lambert. L.A., “Molecular evolution and selection pressure in alpha-class carbonic anhydrase family members”, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 61, 1814-1854, (2011).
- [18] Claudiu T. Supuran , “Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators” *Nature Reviews Drug Discovery*.7, 1-14, February, (2008).
- [19] Alterio, V., Di Fiore, A., Ambrosio. K., Supuran, C.T., De Simone, G., “Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrase: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms”, *Chemical reviews*, 112, 4421, 68, (2012).
- [20] Claudiu T. Supuran, Jean-Yves Winum “Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications”, *John Wiley & Sons, Inc.*, USA, (2009).

- [21] Wistrand, P.J., "The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte", *Acta Physiol. Scand.*, 343, (1981).
- [22] Chegwiddden, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M., "In the Carbonic Anhydrase New Horizons", *Basel: Birkhauser Verlag*, 343, (2000).
- [23] Maren, T. H., "Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition", *Physiol. Rev.*, 47, 595, (1967).
- [24] Hilvo, M., "Expression studies on carbonic anhydrase IX", Master's thesis, *Institute of Medical Technology*, University of Tampere, (2005).
- [25] Leppilampi, M., "*Functional and immunohistological studies on cancer associated carbonic anhydrase IX*", Master's thesis, *Faculty of Medicine*, University of Oulu, (2006).
- [26] Lowe, N., Edwards, Y.H., Edwards, M., Butterworth, P.H., "Physical Mapping of the Human Carbonic Anhydrase Gene Cluster on Chromosome 8", *Genomics*, 10, (4), 882, (1991).
- [27] Sowden, J., Edwards, M., Morrison, K., Butterworth, P.H.W., Edwards, Y.H., "Erythroid Expression and DNAase-Hypersensitive Sites of the Carbonic Anhydrase 1 Gene", *Biochem. J.*, , 288, (2), 545, (1992).
- [28] Kim, G., Selengut, J., and Levine, R.L., "Carbonic anhydrase III: The Phosphatase activity is extrinsic", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 377, 334–340, (2000).
- [29] Özensoy, Ö., "Eritrositlerden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması için Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması" Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilimdalı, (2002).
- [30] Falkbring, S. O., Göthe, P. O., Nyman, L., and Parath, J., "Affinity Chromatography of carbonic anhydrase", *FEBBS. Letter*, 24, 229, (1972).
- [31] Whitney, P. I., "Affinity Chromatography of Carbonic anhydrase", *Anal. Biochem.*, 64, 267, (1974).

- [32] Kerry, S., "Prokaryotic carbonic anhydrase", *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 335, 66, (2000).
- [33] Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., "Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators" (*Taylor & Francis Medicinal Chemistry Series*), *CRC Press LLC* Florida, USA, (2004).
- [34] J. V. Moroney, "'Carbonic Anhydrases in Plants and Algae Plant'", *Cell and Environment*, 24, 141, 53, (2001).
- [35] Hiroaki Takeuchi, Claudiu T. Supuran, Saburo Onishi and Isao Nishimori, "The α and β Classes Carbonic Anhydrases from *Helicobacter pylori* as Novel Drug Targets", *Curr Pharm Des*;14(7):622-30. (2008).
- [36] 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).
- [37] 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).
- [38] Tripp, B.C., Smith, K., Ferry, J.G. "Carbonic anhydrase: New insights for an ancient enzyme" *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 48615-48618, (2001).
- [39] Hewitson, K.S., Vullo, D., Scozzafa, 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).
- [40] Iverson, T.M., Alber, B.E., Kisker, C., Ferry, J.G., and Rees, D.C., "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, 9222-9231. (2000).

- [41] Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B.E., Ferry, J.G., and Rees, D.C., “A left-handed beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*”. *EMBO J.* 15: 2323–2330. (1996).
- [42] Del Prete, S., Vullo, D., Scozzafa, 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).
- [43] Supuran, C.T., Scozzafava, A., “Carbonic anhydrase as targets for medicinal chemistry”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 4336-4350, (2007).
- [44] 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).
- [45] Sawaya, M.R., Cannon, G., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E.B., Yeates, T.O., Kerfeld, C.A., “The structure of β -carbonicanhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two”, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 7546-7555, (2006).
- [46] 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).
- [47] Supuran, C.T., Ilies, M. and Scozzafava, A., “Carbonic Anhydrase Inhibitors – Part 291 : Interaction of isoenzymes I, II and IV with benzolamide-like derivatives”, *Eur .J. Med. Chem.*, 33, 739-751, (1998).
- [48] Chegwiddden, W.R., Edwards, Y., Carter, N., “The carbonic anhydrases-new horizons. molecular bases of inherited disease”, 8th Ed., NewYork: McGraw-Hill Inc., 2165–2204, (2000).

- [49] Renzi, G., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., “Carbonic anhydrase Inhibitors: Topical Sulfonamide Antiglaucoma Agents Incorporating Secondary Amine Moieties”, *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 673-676, (2000).
- [50] Parkkila, A.K., Scarim, A.L., Parkkila, S., Waheed, A., Corbett, J.A. and Sly, W.S., “Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion”, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 24620-24623, (1998).
- [51] Sly, W.S. and Hu, P.Y., “Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies”, *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 375-401, (1995).
- [52] Arslan, O., “Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidrazm İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- [53] 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 Medicinal Chemistry*, 50, 381, 8, (2007).
- [54] 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).
- [55] Supuran, C.T., “Carbonic anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators”, *Nature reviews Drug Discovery*, 7, 168, 81, (2008).
- [56] Pocker, Y. and Janjic, N., “Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II”, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 731, (1989).

- [57] Briganti, F., Pierattelli, A., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., “Carbonic anhydrase inhibitors. Part 37. Novel classes of isozyme I and II inhibitors and their mechanism of action. Kinetic and spectroscopic investigations on native and cobalt-substituted enzymes. *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 1001, (1996).
- [58] Cuatrecasas, P., “Protein Purification by Affinity Chromatography, derivatizations of agarose and polyacrylamide beads”, *J. Biol. Chem.*, 245, 3059, (1970).
- [59] Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ., “A new Method for the purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography” *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163-166, (1996).
- [60] Warburg, O., and Christian, W., “Isolierung und Kristallization des Gärungsferments Enolase”, *Biochem.*, 310, 384, (1941).
- [61] Bradford, M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, 72, 248, (1976).
- [62] Wilbur K. M., Anderson N.G., “Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase”, *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154, (1948).
- [63] Maren, C. H., “A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors”. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 130, 26 p., (1960).
- [64] Laemmli, D. K., “Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, 227-680, (1970).
- [65] Kılınç N., “Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin koyun midesinden saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, (2011).

- [66] Bozdag, M., Pinard, M., Carta, F., Masini, E., Scozzafava, A., McKenna, R., and Supuran, C.T., "A Class of 4-Sulfamoylphenyl- ω -aminoalkyl Ethers with Effective Carbonic Anhydrase Inhibitory Action and Antiglaucoma Effects" *J. Med. Chem.*, 57 (22), 9673–9686, (2014).
- [67] Bozdag, M., Isik, S., Beyaztas, S., Arslan, O., and Supuran C.T.. "Synthesis of a novel affinity gel for the purification of carbonic anhydrases." *Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, 30 (2), 240-244 (2015).
- [68] Sahin, A., Isik, S., Arslan, O., Supuran, C.T., and Ozensoy Guler, O. "A new affinity gel for the purification of alpha-carbonic anhydrases." *Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, 30 (2), 224-228 (2015).