

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARACA MERSİNİ (*Acipenser*
gueldenstaedtii) SOLUNGACINDAN**
KARBONİK ANHİDRAZİN KARAKTERİZASYONU

Gülay CANDAN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

RİZE 2013

T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

KARACA MERSİNİ (*Acipenser
gueldenstaedtii*) SOLUNGACINDAN

KARBONİK ANHİDRAZİN KARAKTERİZASYONU

GÜLAY CANDAN

YÜKSEK LİSANS

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24/12/2012

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 08/01/2013

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ

Enstitü Müdürü: Doç.Dr. Fatih YILMAZ

RİZE, 2013

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Karaca Mersinin (*Acipenser gueldenstaedtii*) bazı dokularındaki karbonik anhidraz enziminin kinetiğinin incelenmesi, solungaçlarından bu enzimin saflaştırılması ve saflaştırılan enzimin inhibisyonu üzerine çalışmaları içermektedir. Çalışmadaki deneysel kısımlar Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmamın tüm aşamalarında bana her türlü çalışma imkanı veren rektörümüz Sayın Prof. Dr. Arif YILMAZ'a ve dekanımız Sayın Prof. Dr. Oktay TORUL'a,

Bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, yüksek hoşgörü ve anlayış gösteren tüm varlığı ve desteğiyle yanımda olan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER'e ve ailesine,

Her zaman bilgisiyle tecrübesiyle sevgi, ilgi ve anlayışla yanımda olan sevgili hocalarım sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ ve sayın Dr. Nimet BALTAŞ'a, arkadaşlarım Arş. Gör. Arife Pınar EKİNCİ'ye, kimyager Adem Demir'e, kimyager Müge BOZ 'a, kimyager Murat DURMAZ'a,

Balıkların temininde her daim güler yüzünü ve yardımını esirgemeyen hocam sayın Yrd. Doç. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU'na,

Eğitim- öğretim hayatım boyunca bana güvenerek her zaman yanımda olan, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, canım annem Nezahat CANDAN' a, canım babam Tarık CANDAN'a ve mutluluk kaynağım sevgili kardeşlerime

Sonsuz teşekkürler...

Gülay CANDAN

Ocak, 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Çalışmanın Amacı.....	2
1.3. Karbonik Anhidraz (CA).....	2
1.3.1. Karbonik Anhidraz Ailesinin Sınıflandırılması	4
1.3.1.1. α Sınıfı Karbonik Anhidraz	4
1.3.1.2. β Sınıfı Karbonik Anhidraz	8
1.3.1.3. γ Sınıfı Karbonik Anhidraz	9
1.4. Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Fonksiyonları.....	9
1.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	11
1.5.1. Asetazolamid.....	13
1.5.2. Metazolamid.....	13
1.5.3. Etokszolamid.....	14
1.5.4. Benzolamid.....	14
1.5.5. Diklorfenamid	15
1.5.6. Dorzolamid	15
1.5.7. Brinzolamid.....	15
1.5.8. Sulthiam.....	16
1.5.9. İndisulam.....	16
1.5.10. Sakarin	17
1.5.11. Sulpirid.....	18
1.5.12. Zonisamid.....	18
1.5.13. Selekoksib.....	18
1.5.14. Valdekoksib.....	19

1.5.15.	Topiramate.....	20
1.6.	Mersin Balıklarının Genel Özellikleri.....	20
1.6.1.	Karaca Mersini (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>).....	21
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	22
2.1.	Materyal.....	22
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
2.1.2.	Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	22
2.1.3.	Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	23
2.1.4.	Çalışmada Kullanılan Karaca Mersini Balığının Temini.....	26
2.2.	Yöntemler	26
2.2.1.	Karaca Mersini Balığından Kalp, Solungaç,Kan ve Beyin Temini ve Homojenatlarının Hazırlanması.....	26
2.2.1.1.	Karaca Mersini Balığının Kanının Temini ve Hemolizatın Hazırlanması....	26
2.2.1.2.	Karaca Mersini Balığı Dokularının Temini ve Homojenatlarının Hazırlanması.....	26
2.2.2.	Karaca Mersini Solungacından CA Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları İle İlgili Yöntemler.....	27
2.2.2.1.	Sepharose-4B Afinite Kolonunun Hazırlanması.....	27
2.2.2.1.1.	CNBr ile Aktifleştirilmiş Sepharose 4B'ye Tirozin Takılması.....	27
2.2.2.1.2.	Sülfanilamid Kenetlendirilmesi.....	27
2.2.2.2.	Karaca Mersini Solungaç Homojenatının Afinite Kolonuna Tatbiki ve Elüsyonu.....	29
2.2.3.	Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	29
2.2.4.	Kantitatif Protein Tayini.....	30
2.2.5.	Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayini	30
2.2.5.1.	CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi	30
2.2.5.2.	Esteraz Aktivitesi.....	31
2.2.6.	Karaca Mersini Doku Homojenatları ve Hemolizatındaki Karbonik Anhidrazın Kinetik İncelenmesi.....	33
2.2.6.1.	pH ve Sıcaklığın Karbonik Anhidraz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi ...	33
2.2.6.2.	Karaca Mersini Solungaçlarından Saflaştırılan CA'ın Esteraz Aktivitesi İçin K_M , V_{max} , K_{cat} ve V_o Değerlerinin Bulunması	34

2.2.6.3.	Karaca Mersini Solungacından Safılaştırılan Karbonik Anhidrazın İnhibisyonu Çalışması	34
3.	BULGULAR.....	35
3.1.	Karaca Mersini Dokularında Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Çalışma Grafiği ve Hidrataz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	35
3.2.	Karaca Mersininin Solungaçlarından Safılaştırılmasına Ait Bulgular.....	36
3.3.	SDS-PAGE Elektforez bulguları	37
3.4.	Karaca Mersini Kalp, Beyin, Hemolizat, Solungaç Dokularındaki Karbonik Anhidrazın Optimum pH ve Sıcaklık Değerleri.....	38
3.5.	Karaca Mersini Solungaçlarından Safılaştırılan CA'ın Kinetik Verilerine Ait Bulgular	39
3.6.	Karaca Mersini Solungaçlarından Safılaştırılan CA İnhibisyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	41
4.	TARTIŞMA	46
5.	SONUÇLAR	50
6.	ÖNERİLER.....	52
7.	KAYNAKLAR.....	53
	ÖZGEÇMİŞ.....	58

ÖZET

Bu çalışmada Karaca Mersini'nin (*Acipenser gueldenstaedtii*) dokularında karbonik anhidraz (CA) enzimi karakterize edildi. Balığın kalp, beyin, solungaç homojenatlarında ve eritrosit hemolizatında karbonik anhidrazın hidrataz aktivitesi sırasıyla 2,5, 7,4, 5,2, 10,8 EU/mg protein olarak belirlendi. Balığın solungacından karbonik anhidraz enzimi Sepharose-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonunda 66 kat ve 20,7 verimle saflaştırılarak spesifik aktivitesi 222,2 EU/mg protein olarak tespit edildi.

Enzimin saflığına sodyum dodesilsülfat poliakrilamid (SDS-PAGE) jel elektroforezinde gözlenen tek protein bandı ile karar verildi. SDS-PAG Elektroforezi sonucunda Karaca Mersini solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidrazın altbirim molekül kütlesi yaklaşık olarak 20 kDa olarak bulundu. Enzimin p-nitrofenil asetat substratı varlığında esteraz aktivitesinin pH 6,0'da ve 40 °C sıcaklıkta en yüksek olduğu tespit edildi. Solungaç karbonik anhidrazının K_m ve V_{max} kinetik değerlerini p-nitrofenol asetat (p-NFA) substratı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplandı ve K_M 2,5 mM ve V_{maks} 5×10^6 $\mu\text{M}/\text{dak}$ olarak belirlenmiştir. Enzimin p-NFA'a karşı etkinliğini belirten k_{cat} değeri $134408,6 \text{ s}^{-1}$ ile k_{cat}/K_M değeri $53763,4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak bulundu. Solungaç CA'sının sülfanilamid ve asetazolamid inhibitörlerine karşı 13 ve 0,1 μM gibi oldukça düşük IC_{50} değerine sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca enzimin Zn^{+2} ile Ba^{+2} varlığında 1,1 mM, Fe^{+2} varlığında 0,2 mM, Co^{+2} varlığında 1,7 mM ve Ni^{+2} varlığında 1,2 mM IC_{50} değerleriyle inhibe olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Karbonik anhidraz, Karaca Mersini balığı, *Acipenser gueldenstaedtii*

SUMMARY

Characterization of Carbonic Anhydrase from Russian Sturgeon Fish (*Acipenser gueldenstaedtii*)

In this study, carbonic anhydrase enzymes (CA) from Russian Sturgeon Fish (*Acipenser gueldenstaedtii*) tissues have been characterized. The hydratase activity of carbonic anhydrase in extract from heart, brain, gill and erythrocyte hemolyzates of the fish was determined as 2.5, 7.4, 5.2, 10.8 EU / mg protein, respectively. Carbonic anhydrase from the fish gill was purified 66-fold, as yield 222.2, and specific activity 20.7 EU / mg protein using Sepharose-4B-L tyrosine-sulfanilamide affinity column.

The purity of the enzyme was decided to be observed a single protein band on sodium dodesilsulfat polyacrylamide gel (SDS-PAGE) electrophoresis. As a result of SDS-PAGE electrophoresis; the purified carbonic anhydrase in the gills of Russian Sturgeon Fish (*Acipenser gueldenstaedtii*) subunit molecular mass is about 20 kDa. Esterase activity of the enzyme in the presence of the substrate p-nitrophenyl acetate, was found to be the highest at pH 6.0 and a temperature of 40°C. K_M and V_{maks} kinetic values for gill carbonic anhydrase was calculated by a Lineweaver-Burk graph using p-nitrophenol acetate (p-NPA) as a substrate, and was defined as 2.5 mM and $5 \times 10^6 \mu\text{M}/\text{min}$, respectively. K_{cat} and K_{cat}/K_M values indicating that the enzyme the effectiveness of against p-NFA were found as 134408.6 s^{-1} and $53763.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. CA from its gill has very low IC_{50} values such as 13.0 and 0.1 μM in the presence of the sulfanilamide and acetazolamide as inhibitors, was found. In addition, the enzyme were determined to be inhibited with the IC_{50} values as 1.1 mM in the presence of Zn^{+2} and Ba^{+2} , 0.2 mM in the presence of Fe^{+2} , 1.7 mM in the presence of Co^{+2} and 1.2 mM in the presence of Ni^{+2} .

Key words: Carbonic Anhydrase, Russian Sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Karbonik anhidrazın katalizlediği temel reaksiyonlar	3
Şekil 2. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri.....	5
Şekil 3. A-CA II; aktif bölge yapısı B- CA II; üç boyutlu yapısı	5
Şekil 4. HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik gösterilişi.....	7
Şekil 5. Karbonik Anhidraz enzimin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi.....	8
Şekil 6. A-Methanosarcina thermophila CA'sı, B-γ CA'nın aktif bölgesinde metal ligasyonu	9
Şekil 7. Karbonik anhidrazın inhibisyonunun mekanizması. A- sülfonamid ile, B-anyonik inhibitörler ile	12
Şekil 8. Asetazolamid	13
Şekil 9. Metazolamid	14
Şekil 10. Etokszolamid	14
Şekil 11. Bezolamid	14
Şekil 12. Diklorfenamid	15
Şekil 13. Dorzolamid	15
Şekil 14. Brinzolamid	16
Şekil 15. Sultiham.....	16
Şekil 16. Indisilam.....	17
Şekil 17. Sakarin.....	17
Şekil 18. Sulpirid.....	18
Şekil 19. Zonisamid	18
Şekil 20: Selekoksib.....	19
Şekil 21. Valdekoksib.....	19
Şekil 22. Topiramate.....	20
Şekil 23: Karaca Mersini.....	21
Şekil 24. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların açık formülleri.....	28
Şekil 25. Esteraz aktivitesi reaksiyon mekanizması	31

Şekil 26.	Protein standart çalışma grafiği.....	35
Şekil 27.	A) SDS-poliakrilamid jel elektroforezi; B) Doğal elektroforez jeli.....	37
Şekil 28.	Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA için pH-Aktivite grafiği.....	38
Şekil 29.	Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA için sıcaklık-aktivite grafiği	39
Şekil 30.	Karbonik anhidrazın <i>p</i> -NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği	40
Şekil 31.	Karaca Mersininin solungacından saflaştırılan CA'nın <i>p</i> -NFA substratı varlığında elde edilen Hill grafiği	40
Şekil 32.	Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA'nın [asetazolamid]-% inhibisyon grafiği	42
Şekil 33.	Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA'nın [sülfonamid]-% inhibisyon grafiği	42
Şekil 34.	Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA'nın [Co ⁺²] -% inhibisyon grafiği	43
Şekil 35.	Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA ile [Zn ⁺²] -% inhibisyon grafiği	43
Şekil 36.	Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA'nın [Ni ⁺²] -% inhibisyon grafiği	44
Şekil 37.	Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA'nın [Ba ⁺²] -% inhibisyon grafiği	44
Şekil 38.	Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA ile [Fe ⁺²] -% inhibisyon grafiği	45

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	3
Tablo 2. Yüksek omurgalılarda α CA izoenzimleri, onların nispi CO ₂ hidrataz aktiviteleri, sülfonamid inhibitörlerine karşı afiniteleri ve hücre içindeki yerleşimleri.....	4
Tablo 3. Çalışmada kullanılan alet, cihazlar ve markaları.....	22
Tablo 4. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanıldığı yerler	23
Tablo 5. CO ₂ - hidrataz aktivitesi reaksiyon karışımı	31
Tablo 6. Esteraz aktivitesi için reaksiyon karışımı	32
Tablo 7. Karaca mersininden elde edilen kalp, beyin, solungaç dokuları ve kan hemolizati için protein miktarları ve kinetik veriler	36
Tablo 8. Karaca Mersininin solungacından saflaştırılan CA enziminin saflaştırma tablosu	36
Tablo 9. Karaca Mersin Balığının dokularından izole edilen karbonik anhidrazın optimal pH değerleri	38
Tablo 10. Karaca mersini solungacından saflaştırılan CA için kinetik veriler	41
Tablo 11. Karbonik anhidrazın inhibitörleri varlığında elde edilen IC ₅₀ değerleri ...	45

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CA	:	Karbonik Anhidraz
EU	:	Enzim Ünitesi
U	:	Ünite
p-NFA	:	Paranitro fenil asetat
hCA	:	Human karbonik anhidraz
IC ₅₀	:	% 50 İnhibisyon konsantrasyonu
PAGE	:	Poliakrilamid jel elektroforezi
SDS	:	Sodyum Dedosil Sülfat
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin
K _M	:	Michaelis-Menten sabiti
V _{maks}	:	Maksimum hız
EDTA	:	Etilendiamintetraasetat
EC	:	Enzim kodu
kDa	:	kilodalton
SF	:	Serum Fizyoloji
ABS	:	Absorbans
MWCO	:	Molecular weight cut off

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Canlı metabolizmasında anahtar bir metabolit olan CO₂'in çevresel konsantrasyonu nadiren yüksektir. Ayrıca CO₂, karbonik asit ve bikarbonat oluşumu ile dengededir. Bikarbonat negatif yüklüdür ve sulu çözeltilerde yüksek bir çözünürlüğe sahip olmasına rağmen, lipitlerde çözünürlüğü çok azdır. CO₂' in ise hem sulu çözeltilerde hem de lipitlerde çözünürlüğü yüksektir. Bu nedenle CO₂ çok kolay şekilde hücre içine ve dışına difüze olurken, bikarbonatın hücre membranından geçmesi için taşınması gerekmektedir. pH 6,3'ün üzerinde, CO₂ ve HCO₃⁻ arasındaki denge HCO₃⁻'a doğru kayar ve böylece hücre içinde ihtiyaç duyulan CO₂ ve HCO₃⁻ konsantrasyonlarının sürdürülebilmesinde problemler oluşur (Smith ve Ferry, 2000).

Fizyolojik pH'da CO₂'in HCO₃⁻' a dönüşümü çok yavaştır ve enzim tarafından katalizlenmesi gerekir. CO₂'in HCO₃⁻' a çevrimi CO₂' in hücre içinde tutulmasında önemli iken, HCO₃⁻'ın CO₂'e çevrimi ise bikarbonatın hücre içine girişini kolaylaştırır. Böylece, enzimatik olarak CO₂ ve HCO₃⁻'ın çevrilmesi yalnızca hücrel enzimlerin ihtiyaç duydukları seviyede hücrenin CO₂ miktarını artırmasında değil, ayrıca hücrel proseslerin başarılabilmesi için uygun hücre içi CO₂ ve HCO₃⁻ seviyelerinin devamında da hücreye yardım eder. İşte, CO₂ ve HCO₃⁻'ın birbirlerine çevrilmesi reaksiyonlarını katalizleyen 'karbonik anhidraz' (CA) enzimidir (Smith ve Ferry, 2000).

Aktif bölgesinde Zn⁺² iyonu bulunduran CA enzimi genel olarak metabolik CO₂ transportunu yanı sıra birçok dokuda H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarının birikiminde de önemli rol oynamaktadır. Böylece vücuttaki birçok dokuda H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarının birikimini sağlayarak, vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında da son derece önemlidir (Chegwidden vd., 2000; Wistrand, 1981). Bu dokular arasında böbrek, gastrit mukoza ve göz lensi sayılabilir. Bu dokuların dışında histokimyasal yöntemlerle tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularda da CA enzimine rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır (Supuran ve Scozzafava, 2001; Chegwidden vd., 2000).

1.2. Çalışmanın Amacı

Tüm canlı türlerinde mevcut olan ve üzerinde en çok çalışılan enzim karbonik anhidraz canlı sistemlerde pH düzenleyici, su elektrolit ve iyon transportunu düzenleyici olarak rol alan bir enzimdir. Fizyolojik olarak karbondioksitin hidrasyonunu ve bikarbonatın dehidratasyonunu dönüşümlü olarak katalizler. Enzim hemen hemen bütün dokularda mevcut olup hidrataz aktivitesinin yanında H^+ ve HCO_3^- birikiminde rol almaktadır.

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehytlerin hidratasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir. Bu nedenle, CA enziminin saflaştırılmasında daha etkili ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

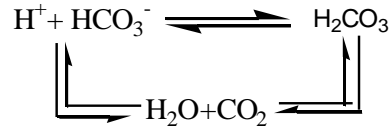
Bu çalışmada, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yetiştirilen Karaca Mersini dokularındaki karbonik anhidraz aktivitesinin incelenmesi ve solungacından enzimin saflaştırılması hedeflenmiştir. Bununla birlikte solungaç CA'nın detaylı olarak kinetiğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla solungaçtan Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonu kullanılarak karbonik anhidraz saflaştırılarak, enziminin farklı pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonları ve inhibitörlerdeki hidrataz ile esteraz aktiviteleri incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmanın, CA enziminin Karaca Mersini dokularında ilk kez çalışılmış olması orijinalliğini ortaya koymaktadır.

1.3. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında birbirlerinden habersiz olarak Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından keşfedilmiştir. Enzim ilk olarak, eritrositlerden akciğer kılcal damarlarına bikarbonatın hızlı transferini gerçekleştiren katalitik faktörün arandığı bir çalışma sonucunda karakterize edilmiştir. Keilin ve Mann (1940), CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu bildirmişlerdir. Böylece CA enzimi, tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir.

Karbonik anhidraz (CA : karbonat hidroliyaz, karbonat dehidrataz, EC 4.2.1.1) aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran bir metaloenzim ailesidir (Şekil 1) (Smith ve Ferry, 2000).

Canlılarda karbondioksitin hidratasyonunu tersinir olarak kataliz eder. CA biyolojik sistemler için önemlidir çünkü karbondioksitin bikarbonata katalizsiz dönüşümü nötral pH da oldukça yavaştır (Sharma vd., 2009).



Şekil 1. Karbonik anhidrazın katalizlediği temel reaksiyonlar (Supuran ve Scozzafava, 2007)

CA; pH düzenlenmesi, CO₂ taşınımı, yük değişimi, solunum, biyosentez ve fotosentez gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer almaktadır (Song vd., 2007). Karbonik anhidraz CO₂ 'in hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir (Tablo 1) (Supuran ve Scozzafava, 2007).

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidratasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir. Bu nedenle, CA enziminin saflaştırılmasında daha etkili ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Falkbring vd., 1972).

Tablo 1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri (Supuran ve Scozzafava, 2007)

1	O=C=O	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	HCO ₃ ⁻ + H ⁺
2	HN=C=NH	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	H ₂ NCONH ₂
3	RCHO	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	RCH(OH) ₂
4	RCOOAr	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	RCOOH + ArOH
5	RSO ₃ Ar	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	RSO ₃ H + ArOH
6	ArOPO ₃	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	HPO ₃ ⁻² + ArOH
7	ArF	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	HF + ArOH
8	PhCH ₂ OCOC	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	PhCH ₂ OH + CO ₂ + HCl
9	RSO ₂ Cl	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	RSO ₃ H + HCl

(R= Me ; Ph) (Ar= 2,4-dinitrofenil)

1.3.1. Karbonik Anhidraz Ailesinin Sınıflandırılması

Karbonik Anhidraz enzimlerinin üç boyutlarına göre α , β , γ , δ , ζ CA' lar olarak 5 farklı familyada incelenmiştir.

1.3.1.1. α Sınıfı Karbonik Anhidraz

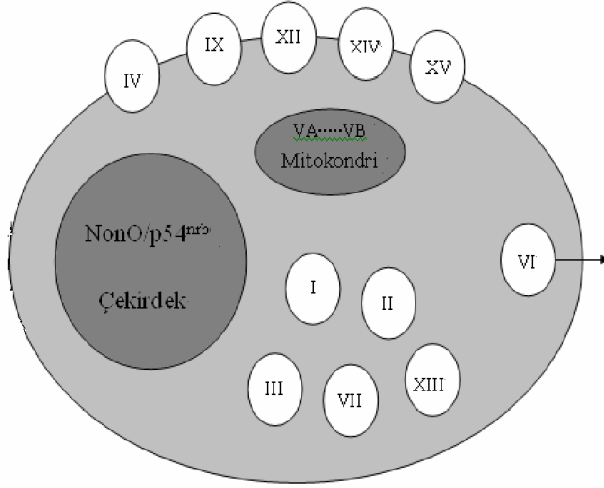
Günümüze kadar kataliz mekanizması olarak en iyi çalışılmış ve en yaygın dağılımı olan sınıftır. Yıllarca hayvanlarda bulunduğu bilinmesine rağmen son yıllarda bitkilerde de bulunmuştur. α CA'lar; hayvanlar, bitkiler, algler, eubakteriler ve virüslerde tespit edilmiştir. Memelilerde 16 farklı α CA izoenzimi ve bu izoenzimler arasındaki ilişkiler tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Yüksek omurgalılarda α -CA izoenzimleri, onların nispi CO₂ hidrataz aktiviteleri, sülfonamid inhibitörlerine karşı afiniteleri ve hücre içindeki yerleşimleri (Supuran 2008)

İzoenzim	Katalitik aktivite (CO ₂ hidrasyonu)	Sülfonamidlere karşı afinite	Hücre içi yerleşme
CA I	Düşük (CAII'nin %10'u)	Orta	Sitoplazma
CA II	Yüksek	Çok yüksek	Sitoplazma
CA III	Çok düşük	Çok düşük	Sitoplazma
CA IV	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CA VA	Orta derece- yüksek*	Yüksek	Mitokondri
CA VB	Yüksek	Yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta derece	Yüksek	Tükürük/süt'te salgı
CAVII	Yüksek	Çok yüksek	Sitoplazma
CARP VIII	Akatalitik	#	Sitoplazma
CA IX	Orta derece	Yüksek	Transmembran
CARP X	Akatalitik	#	Sitoplazma
CARP XI	Akatalitik	#	Sitoplazma
CA XII	Düşük	Yüksek	Transmembran
CA XIII	Orta derece	Orta-yüksek	Sitoplazma
CA XIV	Düşük	Yüksek	Transmembran
CA XV	Düşük	Bilinmiyor	Membrana bağlı

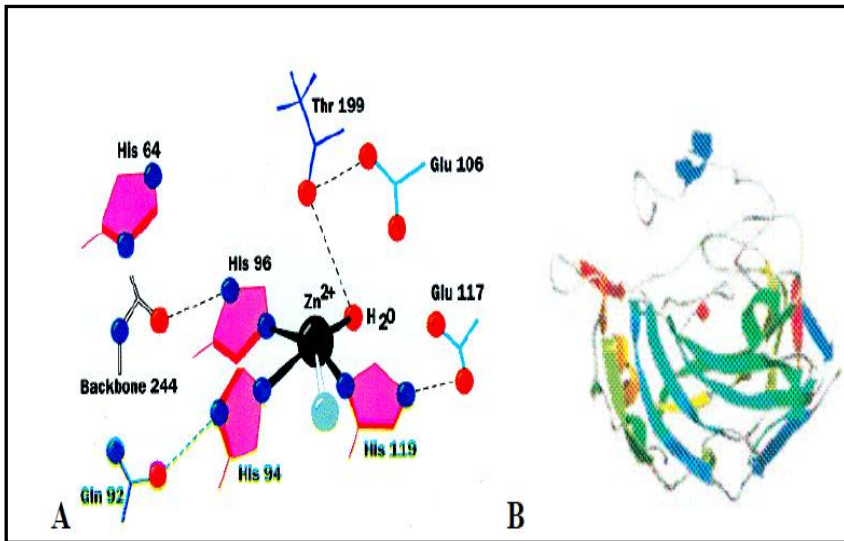
*pH 7,4'te orta derece, pH 8,2 veya daha yüksekte yüksek aktivite # doğal CARP proteinleri Zn(II) içermezler, bu sebepten onların sülfonamidlere karşı afiniteleri ölçülemezdir.

Beş tane sitozolik formu (CA I, II, III, VII ve XIII), beş tane membrana bağlı (CA IV, IX, XII, XIV ve XV), iki mitokondriyal form (CA VA ve VB) ve tükürük ve sütte bulunan bir salgı CA izoenzimi CA VI vardır. Ek olarak CA gen ailesine ait olan üç tane CA ilişkili protein (CARP) vardır (Şekil 2) (Supuran, 2008).



Şekil 2. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri (Supuran, 2008).

hCA II; 29,3 kDa büyüklüğünde olan bir proteindir. hCA II diğer izoenzimlere göre katalitik aktivitesi oldukça yüksektir, insan doku ve organlarında yaygın olarak rastlanmaktadır (Hilvo, 2005; Leppilampi, 2006).



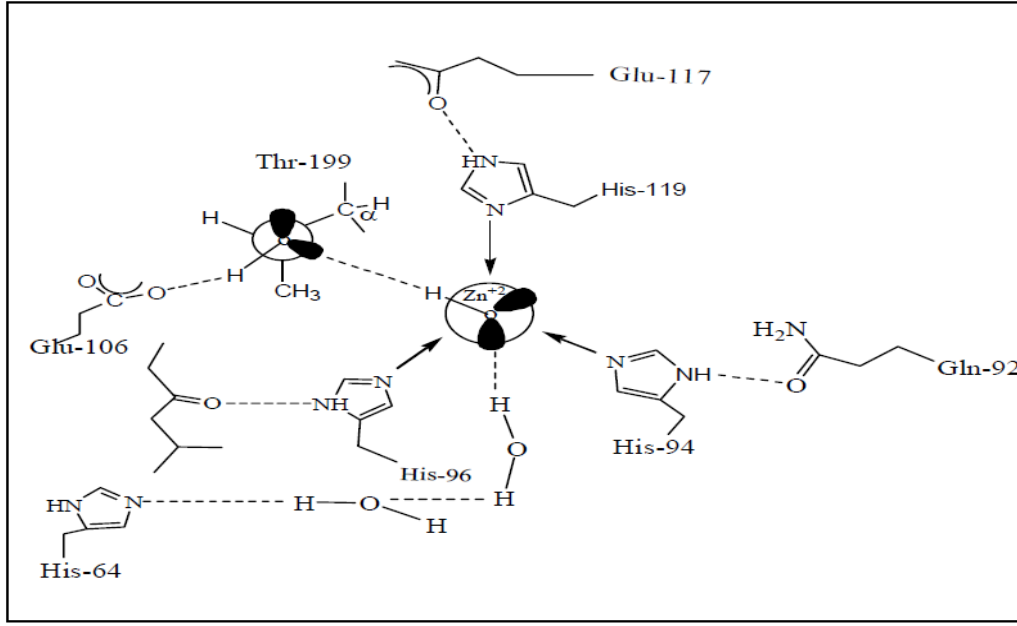
Şekil 3. A CA II; aktif bölge yapısı, B CA II; üç boyutlu yapısı

hCA I; 30 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Eritrositlerde, kolon epitelinde, göz lensi ve korneal epitelyumda bulunur. Hücre içinde sitozolde yer alan hCA I çözünebilir karakterdedir ve eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir. Eritrositlerde hCA II 'ye göre beş kat daha fazla bulunmasına rağmen katalitik aktivitesi hCA II 'nin sadece %15 'i kadardır (Lowe vd., 1991; Sowden vd., 1992).

Karbonik anhidraz izoenzimleri, şeker hastalığı, yağ, üre, tümör oluşumuna yol açan etkenler ve çok zehirli çeşitli patojenlerin gelişmesini içine alan fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilgili olan geniş bir enzim ailesidir. Diüretikler ve antiglokom ilaçlarının yanı sıra, CA inhibitörlerinin, yeni anti-obezite, anti-kanser ve antienfeksiyon ilaçları olarak kullanımındaki önemi son yıllarda yaygın bir biçimde vurgulanmaktadır. Bunlara ek olarak, yeni çalışmalar CA aktivasyonunun Alzheimer Hastalığı için yeni bir tedavi olanağı sağlayabileceği ileri sürmektedir. Bu durum, CA etkinliği kapsamındaki inhibitörler ve aktivatörlerin yaygın bir hastalık grubuna karşı yeni kullanımlara olanak sağlamasıyla bugün bazıları klinik denemelerde değerlendirilmekte olan CA izoformlarıyla ilgili özgül düzenleyicilerin gelişme sürecini ön plana çıkarmıştır (Supuran, 2008).

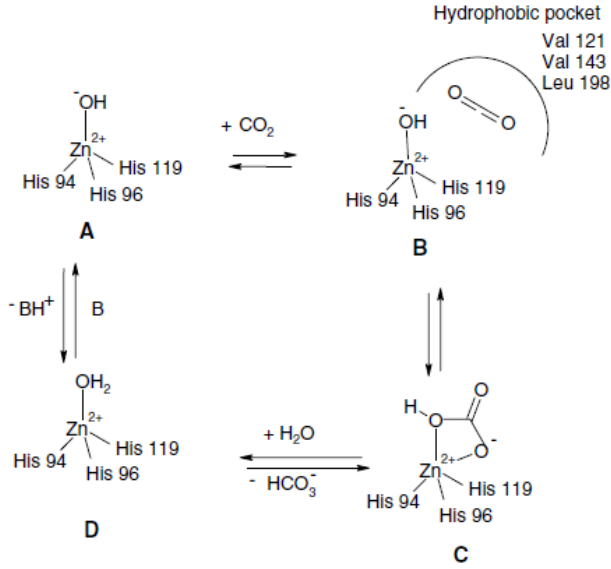
Kataliz yapabilmeleri için tüm α CA' ların Zn (II) metal iyonuna gerek duyduğu görülmüştür. Zn^{+2} iyonu aktif bölgeye 3 histidin (His 94, His 96, His 119) ve bir su molekülü/hidroksil iyonu ile bağlanır (Şekil 3) (Supuran ve Scozzafava, 2007).

Aktif bölgede bulunan Zn ile koordine olan su aynı anda Thr199 un hidroksil kısmı ile hidrojen bağı yapmıştır ayrıca Thr199 Glu 106 nın karboksilat kısmı ile de bağı halindedir. Bu durum Zn ile koordine olan su molekülünün nükleofilik karakterini arttırır ve substratı olan CO_2 için nükleofilik atak için uygun yönlendirme olmuş olur (Şekil 4). Çoğu alfa CA' lar yaklaşık 30 kDa molekül ağırlığına sahip monomerler olarak aktiftirler (Tripp vd., 2001).



Şekil 4. HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik gösterilişi (Tripp vd., 2001)

Enzim kinetiği hakkında insan HCA-II izoenzimi üzerinde yapılan spesifik bölgenin mutasyonu ve X-ray kristalografisi çalışmalarında da, katalitik mekanizma oldukça ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmıştır (Şekil 5). Diğer izoenzimlerin mekanizmaları genellikle bu mekanizma ile aynı olmasına rağmen, bazı spesifik detaylarda farklı olabilmektedir. Bu çalışmalar sonucunda, CA'nın yapısal olarak iki önemli özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan birincisi, aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. İkinci olarak da, aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmişlerdir (Supuran ve Scozzafava, 2001).



Şekil 5. Karbonik anhidraz enzimin CO₂-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi (Supuran ve Scozzafava, 2001).

Zn⁺² iyonuna OH⁻ iyonunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu meydana gelir. Enzimin aktif formu güçlü nükleofilik yapısıyla CO₂ molekülüne saldırır. Bu da Zn⁺² iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Daha sonra bikarbonat iyonu bir su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Bunun sonucunda Zn⁺² iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Stams vd., 1988). Tekrar bazik formu olan A formuna geçmek için aktif bölgeden çevresine bir proton transferi gerçekleşir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesine His-64 gibi proton yakalayan aktif bölgeler ve ortamdaki tampon bölgeler yardımcı olurlar (Lindskog ve Silverman, 2000; Supuran ve Scozzafava, 2001).

1.3.1.2. β Sınıfı Karbonik Anhidraz

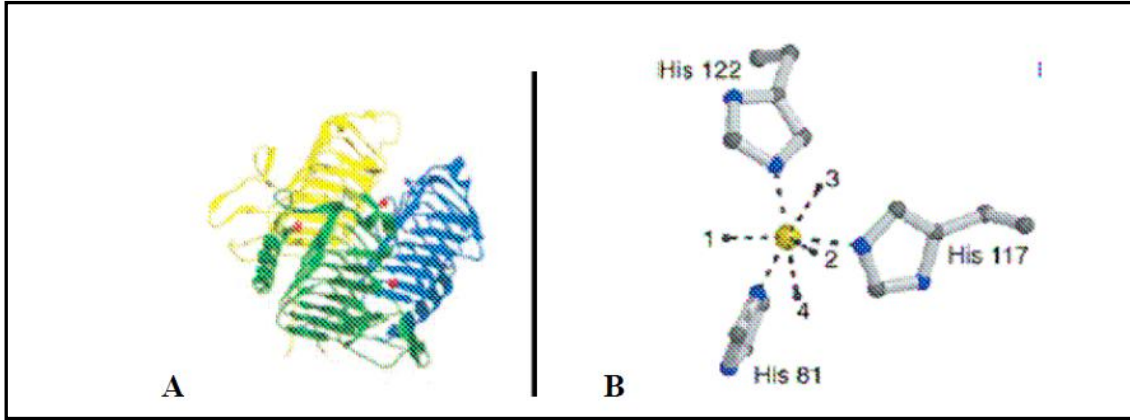
Canlı organizmalarda β CA'lar α CA'lar kadar yaygın değildir. Çoğu bakteriler, bazı archaealar, algler ve yüksek bitkilerin kloroplastları β sınıfına ait olan CA'ları ihtiva eder. Bu enzimler ile α CA'ların arasındaki en önemli fark, β CA'ları genellikle 25-30 kDa molekül ağırlığına sahip 2-6 kadar monomerlerden oluşan oligomerlerdir (Supuran ve Scozzafava, 2001).

1.3.1.3. γ Sınıfı Karbonik Anhidraz

İlk olarak archaeobakterilerde keşfedilmiştir. Bazı bakteri türlerinde de vardır. Zn^{+2} iyonu içeren γ CA'lar olduğu gibi Co^{+2} içerenler de saptanmıştır (Gilmour, 2010; Iverson vd., 2000).

γ sınıfını diğer sınıflardan ayıran birkaç farklı özellik vardır. γ monomeri, yaklaşık 70 kDa'luk molekül ağırlığına sahip homotrimer yapılar oluşturmak üzere etkileşirler.

γ -CA'ların aktif bölgelerinin koordinasyonu oldukça farklıdır. Koordinasyon geometrisi Zn içeren γ CA için üçgen bipiramid ve Co-substitüe enzim için oktahedraldir. (Şekil 6-A), diğer üçüncüsü ise (His117) bir başka monomere aittir (Şekil 6-B).



Şekil 6- A) *Methanosarcina thermophila* CA'sı, 69 kDa (homotrimer) B) γ -CA'nın aktif bölgesinde metal ligasyonu (Tripp vd., 2001)

Böylece, üç aktif bölge, monomerlerin yüzeylerinde yerleşmiştir. Aktif bölge yüzeyde bulunmasına rağmen γ CA'nın aktif bölge yapısı α CA'ninkine benzer. Katalitik mekanizması α sınıfı CA'ların mekanizmasına benzer olduğu belirlenmiştir (Moroney vd., 2001; Iverson vd., 2000; Kisker vd., 1996).

1.4. Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Fonksiyonları

Karbonik anhidraz enzimi birçok fizyolojik olayda rol almaktadır. Bu enzim temel olarak karbondioksitin ve bikarbonat iyonunun birbirine dönüşümünü katalizler böylece solunumda metabolizmada dokular ve akciğer arasında CO_2 / bikarbonat taşınımında, asit baz dengesinde, çeşitli doku ve organlarda elektrolit sekresyonunda, lipogenez, üregenez gibi biyosentetik reaksiyonlarda, kemik rezorpsiyonunda, kireçlenmede, tümör gelişiminde ve daha birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol alır (Supuran ve Scozzafa, 2007).

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 (Meltzer, 2003).

İzoenzim III ve VII daha özelleşmiş bir dağılıma sahiptir. CA III, bikarbonatı yağ asidi sentezinde kullanan adipozitlerde daha yüksek oranda bulunmaktadır. İzoenzim V ise mitokondriyal matrikste, adipozitlerde ve karaciğerde de bol bulunmaktadır. İzoenzim VI tükürükte salgılanırken izoenzim IV membrana bağlı olarak daha büyük bir formda bulunur (Meltzer, 2003).

CA I, II ve IV izoenzimler solunum ve asit-baz homeostasisinin düzenlenmesinde görev alır. Bu kompleks süreç $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ '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 (Supuran vd., 2004).

CA'lar gözde bikarbonatça zengin humor aköz üreterek görme olayında görev almaktadır. Bazı patolojik durumlarda yüksek göz içi basıncı glokoma neden olur (CA II ve CA IV). Bu olayın en önemli tedavi şekli CA II'nin inhibisyonudur (Maren, 1967; Supuran vd. 2003).

CA'lar, tükürük üretimi, gastrit asit üretimi, safra üretimi, pankreas özsuyu üretimi, bağırsakta iyon taşınması gibi diğer birçok doku ve organda elektrolit salgılanmasında görev alır. CA'lar tat ve koku almada da görev alırlar. Gastrointestinal bölgeyi ekstrem pH koşullarından korurlar. Seminal sıvıdaki pH ve bikarbonat konsantrasyonunu, kas fonksiyonlarını düzenlerler ve hücrel strese adaptasyonu sağlarlar (Supuran vd., 2003; Chegwiddden ve Carter, 2000).

CA V gibi bazı izoenzimler moleküler sinyal iletiminde görev alır (pankreasın β hücrelerinden insülin salgılanması) (Schwartz vd., 2001).

İzoenzim II ve V glukoneogeneze bikarbonat sağlamak, yağ asidi biyosentezi ve pirimidin sentezi gibi önemli metabolik süreçlerde yer alır (Chegwidden ve Carter, 2000).

CA IX, XII, CARP VIII gibi bazı izoenzimlerin tümörde bol olduğu onkogeneze ve tümör gelişiminde yer aldığı aydınlatılmıştır (Supuran vd., 2004).

Prokaryotlarda CA'lar iki genel fonksiyona sahiptir; organizmada farklı dokular arasında $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ taşınması ve enzimatik reaksiyonlar için $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 'ün

sağlanmasıdır (Smith ve Ferry, 2000). Siyanobakterilerde ve C4 yüksek bitkilerinde CA aktivitesinin yokluğu fotosentez hızını yaklaşık 10^4 kat azalttığı hesaplanmıştır (Badger ve Price, 1994) Fotosentez yapmayan organizmalarda genel olarak CA aktivitesi kaybı, büyüme bozuklukları ve oksidatif strese karşı hassasiyet ile sonuçlanabilir (Götz vd., 1999).

1.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz enzimi aktivitesinin birçok kimyasal madde ve ilaçlar tarafından inhibisyon ve aktivasyon etkileri bilim adamları tarafından araştırılmış ve literatürde rapor edilmiştir (Beydemir vd., 2000; Beydemir ve Gülçin, 2004; Supuran vd., 2001). Bu enzim birçok dokuda ilaçlar için hedef molekül olarak kabul edilmektedir. Bu ilaçların birçoğu hayvanlarda ve insanlarda CA'nın kuvvetli inhibitörü olarak bilinen sülfonamid türevleridir. Glokom gibi bazı hastalıkların tedavisinde bu enzimin inhibisyonu ile hastalığın tedavisi amaçlanmış ve hala uygulanmaktadır (Bülbül vd., 2003).

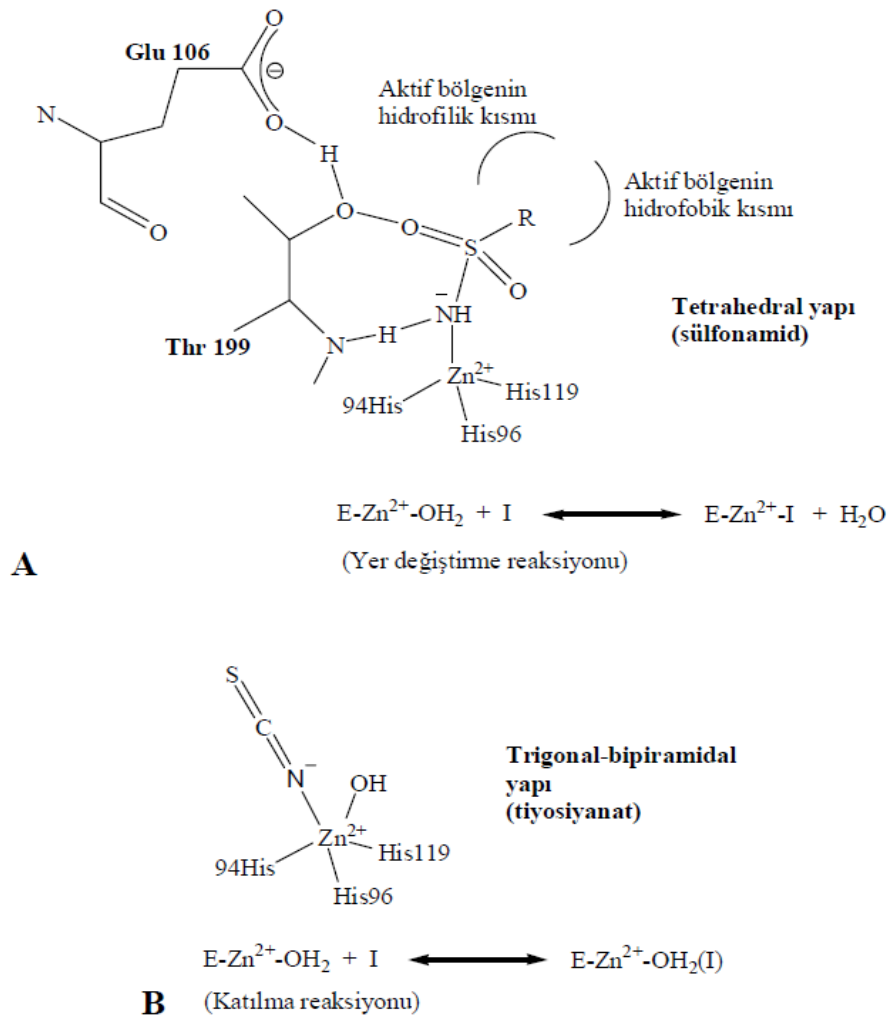
CA inhibitörleri iki grupta ele alınmaktadır. Birinci grup inhibitörler metallerle kompleks yapmış anyonlar ve ikinci grup inhibitörler ise enzimin Zn^{+2} iyonuna bağlanan moleküllerdir (Esposito vd., 2000). İnorganik anyon ve katyonların, CA enziminin inhibisyonu hakkında yapılan araştırmalarda, birçok tek değerlikli anyonların CA enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri bulunmuştur (Schcer ve Dietsch, 1984; Arslan vd., 1996; Lindskog, 1997).

Ayrıca insan eritrosit CA izoenzimlerinin CO_2 hidrataz aktivitesinin Pb^{+2} , Ag^+ , Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Cu^{+2} ağır metal iyonları tarafından inhibe edilirken, Se^{+4} ve Co^{+2} iyonları tarafından da aktive edildiği belirlenmiştir (Roughton ve Booth, 1946).

CA inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, CA enziminin katalizlediği mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları araştırılmıştır, daha sonra CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi için inhibitörler sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glokom, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik hastalıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans (MRI) belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların geliştirilmesinde yol gösterici olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple, CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi çok büyük önem

kazanmıştır. Farklı CA izoenzimlerinin aktif bölgelerinin aydınlatılması, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine fırsat vermektedir (Winum vd., 2004; Franchi vd., 2003)

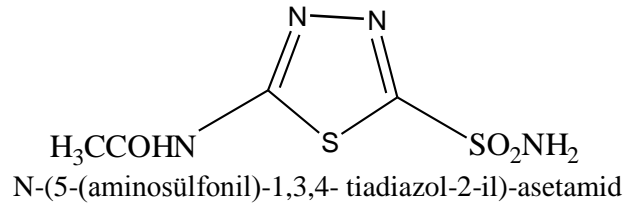
CA inhibitörlerinin iki ana sınıfı bilinmektedir: metal ile kompleks oluşturan anyonlar ve aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. En önemli CA inhibitörü olan sülfonamidler, çinko iyonuna tetrahedral geometride bağlanırlar. Sülfonamidin azot atomu Zn^{2+} iyonu ile koordine olur. Ayrıca Thr 199 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. Anyonlar metal iyonunun hem tetrahedral geometrisinde hem de trigonal-bipiramidal şekilde bağlanabilirler (Supuran vd., 2004).



Şekil 7. Karbonik anhidrazın inhibisyonunun mekanizması. A- sülfonamid ile, B-anyonik inhibitörler ile (Supuran vd., 2004)

1.5.1. Asetazolamid

Sekonder glokom tedavisinde kullanılan güçlü karbonik anhidraz inhibitörüdür. Akut konjestif glokomun pre-operatuar evresinde, konjestif kalp yetersizliği ve ilaçlarla oluşan sekonder ödemlerin tedavisinde diğer ajanlarla birlikte, epilepsi tedavisinde diğer ajanlarla birlikte yardımcı olarak ve akut yükseklik hastalığında semptomların önlenmesi ve iyileştirilmesinde endikedir. Aynı zamanda diüretik olarak da kullanılmaktadır (Şekil 8) (Işık 2008; URL-1, 2012).

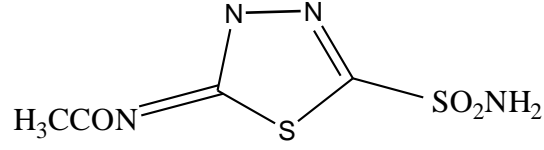


Şekil 8. Asetazolamid

En sık gözlenen yan etkiler: Alerjik reaksiyonlar (kaşıntı kızarıklık vb.), idrardan kan gelmesi, zor yada ağrılı idrar yapma, ateş, konfüzyon(bilinç bulanıklığı), kafa karışıklığı, deride koyulaşma yada sararma, görme bozuklukları, baş dönmesi, bulantı, vücudun geneline yayılan kırgınlık hissidir. Ayrıca uzun süreli tedavilerde asetazolamidler böbrek taşı oluşumunu tetiklemektedir. Diğer yandan asetazolamidler, ciddi potasyum eksikliklerine neden olmaktadır. Asetazolamid kullanımına bağlı potasyum eksiklikleri kendisini ağız kuruluğu, kalp çarpıntısı, yoğun susuzluk hissi, kas ağrıları gibi belirtilerle göstermektedir (Işık 2008; URL-2, 2012).

1.5.2. Metazolamid

Bir sülfonamid türevi ve muhtemel antineoplastik aktiviteye sahip karbonik anhidraz inhibitörüdür. Metazolamid tümör ilişkili CA IX'u inhibe ederek hipoksiya tümörlerinde artan hücre ölümü ile sonuçlanabilir. Hipoksiya indükleyici bir transmembran glikoprotein olarak CA IX CO₂ ve suyun bikarbonat ve protona hızlıca dönüşmesini katalizler ve bikarbonat iyonları, tümör mikro çevresinin asitleştirmesini sürdürmek için yardım eder ve bazı hipoksiya tümörlerinde sitotoksik tedavilere karşı direnç geliştirir (Şekil 9) (Işık 2008; URL-3, 2012).

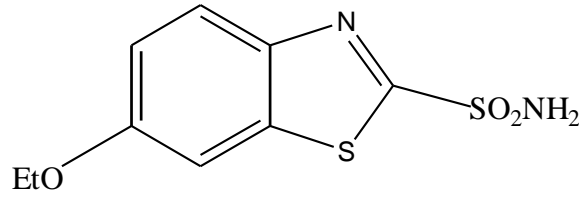


N-(3-Metil-5-sülfamoil-3h-1, 3, 4-tiadiazol-2-iliden) etanamid

Şekil 9. Metazolamid

1.5.3. Etokszolamid

Etokszolamid karbonik anhidraz inhibitörü gibi işlev gören bir sülfonamid ilacıdır. Glokom, düodenal ülser tedavilerinde ve diüretik olarak kullanılır. Epilepsinin bazı formlarının tedavisinde de kullanılabilir. Etokszolamid su, sodyum, potasyum ve bikarbonatın reabsorpsiyonunu azaltmak için proksimal renal tübüllerdeki CA aktivitesini inhibe eder (Şekil 10) (Işık, 2008; URL-4, 2012).

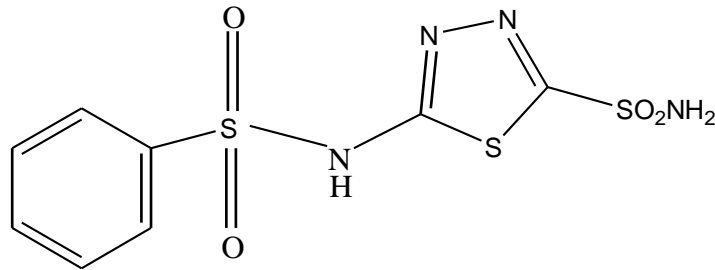


6-etoksibenzotiazol-2-sülfonamid

Şekil 10. Etokszolamid

1.5.4. Benzolamid

Seçici renal karbonik anhidraz inhibitörüdür. Solunum yetmezliği durumlarında da kullanılabilir (Şekil 11) (Işık 2008; URL-5, 2012).

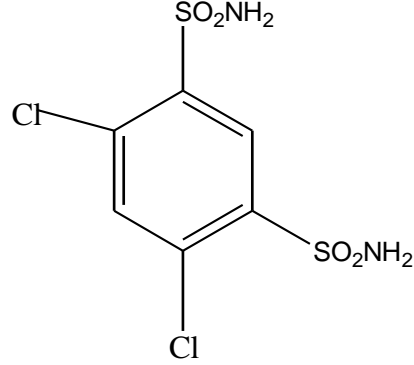


5-Benzensulfonilamino-[1,3,4]tiadiazol-2-sülfonik asit amid

Şekil 11. Bezolamid

1.5.5. Diklorfenamid

Sülfonamid türevi bir karbonik anhidraz inhibitörüdür (Şekil 12) (Işık, 2008; URL-6; 2012).

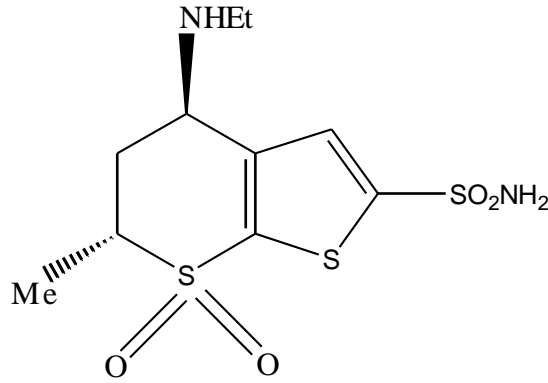


4,5-diklorobenzen-1,3-disülfonamid

Şekil 12. Diklorfenamid

1.5.6. Dorzolamid

Oküler hipertansiyon, açık açılı glokom, psödoeksfolyatif glokomu ya da diğer sekonder açık açılı glokomu olan hastalarda, kombine tedavinin uygun olduğu durumlarda, yükselmiş intraoküler basıncın tedavisinde endikedir (Şekil 13) (Işık, 2008; URL-7, 2012).

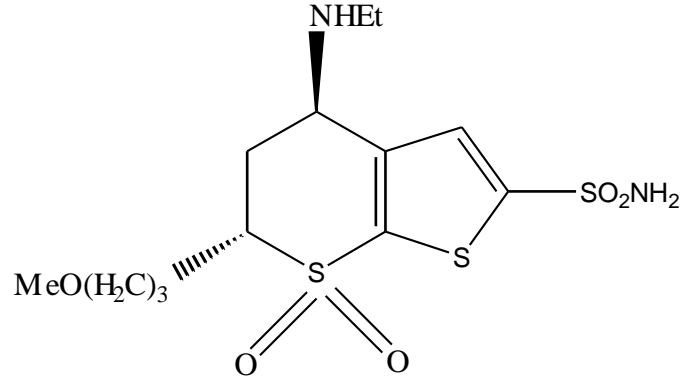


4-Etilamino-6metil-7,7-diokso-4,5,6,7-tetrahidro-7λ⁶-thieno[2,3-b]tiopiran-2- sülfonamid

Şekil 13. Dorzolamid

1.5.7. Brinzolamid

Karbonik anhidraz inhibitörü antiglokomdur. Oküler hipertansiyon ve açık açılı glokomda yüksek intraoküler basıncın tedavisinde endikedir (Şekil 14) (Işık, 2008; URL-8, 2012).

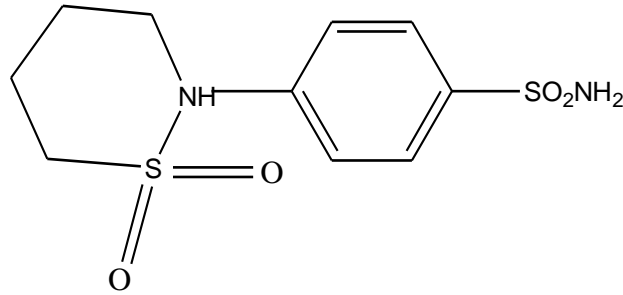


(5R)-5-etilamino-3-(3-metoksipropil)-2,2-diokso-2λ6,9-ditia-3-azabisiklo[4.3.0] nona-7,10 dien-8-sülfonamid

Şekil 14. Brinzolamid

1.5.8. Sulthiam

Sulthiam bir sülfonamiddir ve CA enziminin inhibitörüdür. Antikonvülzan olarak kullanılır. Önceleri sulthiam kısmi felç tedavisinde kullanılmıştır. Avustralya’da şu anda epilepsi, hiperkinetik davranış, geçici lob epilepsisi, miyoklonik felç, sara atakları ve Jacksonian felci ile ilişkili davranış bozukluklarında kullanılmaktadır. Diğer sülfonamid ilaçlarının tersine, sulthiam antibakteriyel aktiviteden yoksundur (Şekil 15) (Işık, 2008; URL-9, 2012).



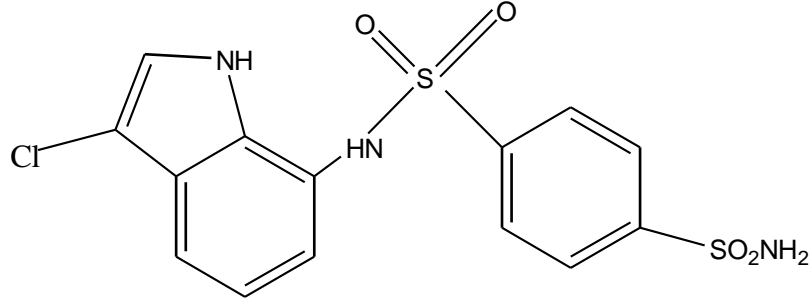
4-(1,1-dioksotiazinan-2-il) benzensülfonamid

Şekil 15. Sultiham

1.5.9. İndisulam

İndisulam katı tümörlerin tedavisi için klinik olarak geliştirilmekte olan yeni bir sülfonamid antikanser ajanıdır. Etki mekanizması multifaktoriyeldir. İndisulam hücre döngüsünü G1 fazında tutar, çoğu fizyolojik süreçte görev alan önemli bir enzimdir. Son zamanlarda kanserle ilişkisi ortaya çıkan CA’yı kuvvetlice inhibe eder ve belirgin bir

şekilde en az 60 tane transkriptin ekspresyon seviyesini değiştirir (Şekil 16) (Supuran, 2003).

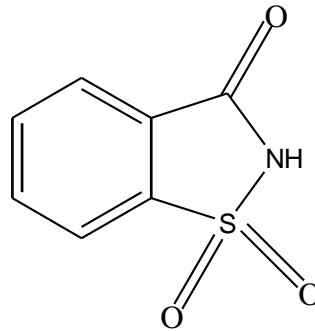


4-(1,1-dioksotiazinan-2-il) benzensulfonamid

Şekil 16. Indisilam

1.5.10. Sakarin

Sakarin en eski yapay tatlandırıcıdır. Temel madde olan benzoik sulfinidin etkili besin enerjisi yoktur ve sakarozdan 300 kat daha tatlıdır fakat yüksek konsantrasyonlarda ağızda istenmeyen acı veya metalik bir tat bırakır. Sakarinin izin verildiği ülkelerde; içecek, şekerlemeler, ilaç ve diş macunu gibi ürünlerde tatlandırıcı olarak kullanılır. Daha yeni bir yapay tatlandırıcı olan aspartamdan farklı olarak, sakarin asit varlığında bile ısıtıldığında daha karardır. Kimyasal olarak diğer gıda içerikleri ile etkileşmez ve kolay saklanabilir (Şekil 17) (Işık, 2008; URL-10, 2012).

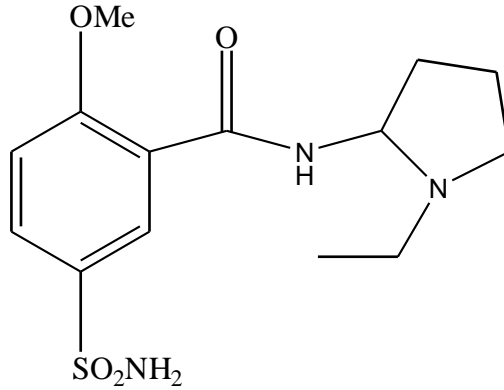


1,1-Diokso-1,2-benzotiazol-3-on

Şekil 17. Sakarin

1.5.11. Sulpirid

Sulpirid, nöroleptik etkilidir. Preparatın tablet ve ampul formu negatif ve/veya pozitif semptomlarda seyreden akut ve kronik şizofreni ve diğer psikozlarda endikedir. Solüsyon formu ise erişkinlerde şizofreni ile ülser ve hemorajik rektokolitlerde psikosomatik komponentin tedavisi ile çocuklarda psikoz ve davranış bozukluklarında endikedir (Şekil 18) (Işık, 2008; URL-11, 2012).

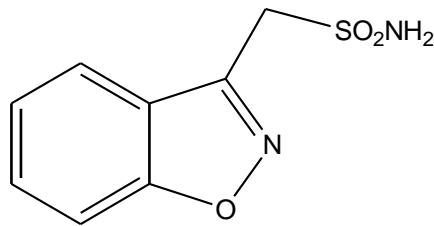


N-[(1-etilpirrolidin-2-il)metil]-2-metoksi-5-sülfamoil-benzamid

Şekil 18. Sulpirid

1.5.12. Zonisamid

Zonisamid, kısmi felç olan yetişkinlerde ek bir tedavi gibi kullanmak için geliştirilen bir sülfonamid antikonvülzandır. Parkinson hastalığı, obezite, epilepsi ve migrene karşı etkisi çalışılmıştır (Şekil 19) (URL-13, 2012).



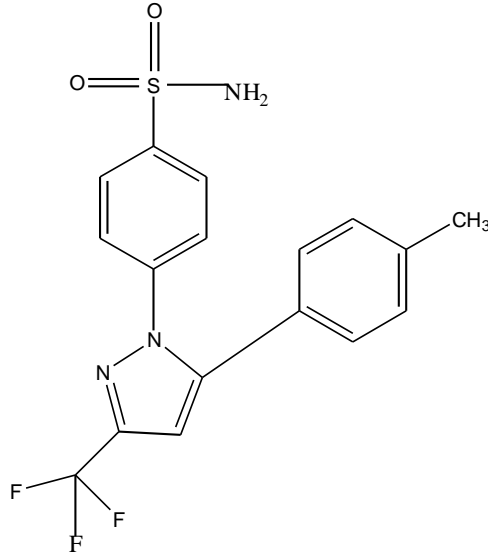
1,2-benzisokazol-3-metansülfonamid

Şekil 19. Zonisamid

1.5.13. Selekoksisib

Selekoksisib, Siklooksijenaz-2 inhibitörü antiienflamatuar, analjezik ve antipiretikdir. Osteoartrit belirti ve semptomlarının tedavisinde, yetişkinlerde romaoid artrit belirti ve

semptomlarının tedavisinde, yetişkinlerde akut ağrının giderilmesinde ve primer dismenorenin tedavisinde endikedir (Şekil 20) (Işık, 2008; URL-14, 2012).

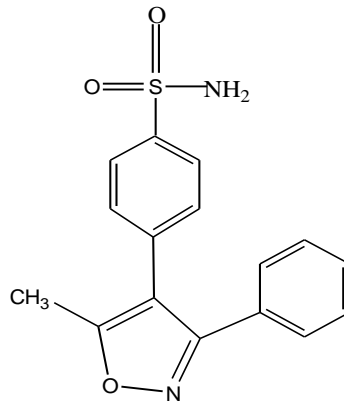


4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il]benzensülfonamid

Şekil 20. Selekoksib

1.5.14. Valdekoksib

Valdekoksib, osteoartrit, romatoid artrit ve sancılı menstruasyon ve menstrua semptomların tedavisinde kullanılan bir reçete ilacıdır. Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç olarak sınıflandırılır (Şekil 21) (Işık, 2008; URL-15, 2012).

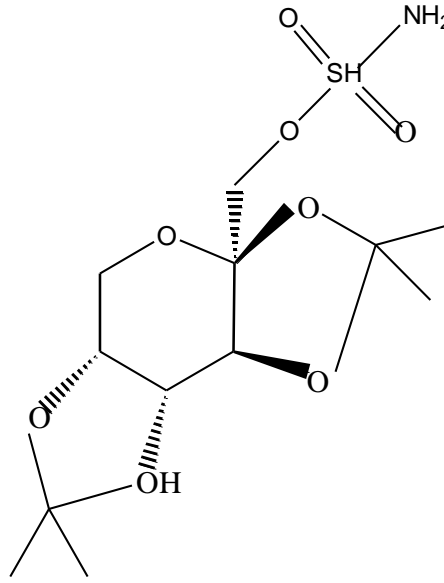


4-(5-metil-3-fenilisoksazol-4-il)benzensülfonamid

Şekil 21. Valdekoksib

1.5.15. Topiramate

Topiramate, antiepileptiktir. Yeni epilepsi teşhisi konmuş hastalarda monoterapi olarak ya da epilepsi hastalarında monoterapiye geçişte endikedir. Parsiyel başlangıçlı nöbetleri veya generalize tonik-klonik nöbetleri olan erişkinlerde 2 yaş üzeri çocuklarda ve Lenox Gastuat sendromuna bağlı nöbetlerin tedavisinde adjuvan olarak endikedir. Erişkinlerde migren profilaksisinde endikedir. Akut migren tedavisinde etkinliği değerlendirilmemiştir (Şekil 22) (Işık, 2008; URL-16, 2012).



2,3:4,5-Bis-O-(1-metiletiliden)-beta-D-fruktopiranoz sulfamat

Şekil 22. Topiramate

1.6. Mersin Balıklarının Genel Özellikleri

Mersin balıkları, Avrupa, Asya ve Amerika kıtalarının kuzey yarım küredeki sularında iki familya ve 27 türle temsil edilirler. Kıkırdak iskelete sahip olmalarına rağmen, vücut üzerindeki kemik plakalar ve zırh şeklindeki baş yapısı dolayısıyla kemikli balıklar sınıfına (Osteichthyes) dahil olan mersin balıkları, evrimsel, biyolojik, morfolojik ve fizyolojik açıdan diğer kemikli balıklardan farklıdır (Ustaoglu, 2005).

Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da yaşayan türleri anadrom, yarı anadrom ve tatlı su türleridir. Mersin balıkları Acipenceridae familyasına ait olup sistematikleri aşağıdaki gibidir.

- Takım : Acipenseriformes
Familya : Acipenseridae (Mersinbalıkları)
Familya : Polyodontidae (Kaşıkağızlılar)
Cins : *Huso* (2 Tür)
Cins : *Scaphirhynchus* (3 Tür)
Cins : *Pseudosaphirhynchus* (3 Tür)
Cins : *Acipenser* (22 Tür)

Vücutları boyunca dizili sıra şeklinde kemiksi plakalar bulunmaktadır. Ülkemizde bulunan mersin balıklarında bu kemiksi plakalar sırtta bir sıra, yanlarda ve karın bölgesinde ise iki sıralıdır. Sırt yüzgeci üçgen şeklinde, oldukça geride; göğüs yüzgeci dikenlidir. Ağzının önünde bulunan bıyıklar hayvanların besin bulmasına yardımcı olur. Bıyıklar bazı türlerde düz, yuvarlak ve bazı türlerinde üzerinde küçük ince kıllar taşırlar. Türler arasındaki farklılıklar; ağız yapılarından, bıyık boyu ve konumlarındaki farklılıklardan, solungaç kapaklarının şeklinden, dorsal, lateral ve ventralde bulunan kemiksi plaka sayılarından ve DNA dizilişlerinden ayrılmaktadır (Vecsei, 2001). Besinler öne doğru uzatılabilen hortumsu ağıza alınır. Hava keseleri çok büyüktür. Karnivor olup, doğal ortamlarında dip balıklarıyla, yumuşakçalarla ve diğer omurgasızlarla beslenirler (Çağiltay, 2011).

1.6.1. Karaca Mersini (*Acipenser gueldenstaedtii*)

Bu tür St. Petersburg Bilim Akademi'sinden Johan Anton Güldenstädt (1745-1781)'den sonra Brandt (1833) (Çelikkale vd., 2005) tarafından isimlendirilmiştir. Karadeniz'de bulunan bu tür, azami 80-100 kg ağırlığa ve 2 metrenin üzerinde boya ulaşmaktadır (Şekil 23). Sırtı grimsi siyah, kirli yeşil veya koyu yeşil, yanlar genellikle grimsi kahve ve karın limon sarısı rengindedir. Alt dudağı biraz oyuk olup, burun kısa ve yuvarlaktır. Bıyıklar kısa ve düz, ağızdan çok buruna yakındırlar. Sırtta 10-14, yanlarda 30-34 ve karında 15-16 adet arasında değişen plakalar bulunur (Şekil 23) (Çağiltay, 2011).



Şekil 23. Karaca Mersini

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar; p-nitrofenilasetat, sepharose 4B, akrilamid, bisakrilamid, sülfanilamid, asetazolamid, tris, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin), amonyum persülfat, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, Na₂SO₄, SDS, NaCH₃COO, aseton, NaCl, Coomassi Brilliant, folin reaktifi, bromofenol blue, Na- K tartarat, perklorik asit, asetik asit, NaOH, HCl, metanol, NiCl₂, CoCl₂, ZnSO₄. 7 H₂O, BaSO₄, FeCl₃, gliserol, Na- Barbitol, glisin, BSA, Na-K tartarat, CuSO₄ Sigma ve Merck firmalarından CO₂ tüpü ise piyasadan temin edildi.

2.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan alet, cihazlar ve markaları

Adı	Marka	Model
Soğutmalı Santrifüj	Thermo Fisher Scientific	Heraeus Multifuge 3SR+ Centrifuge
Fraksiyon kolektör	Tris	Teledyne ISCO
Elektroforez Tankı	Bio-RAD	Mini protean tetra cell
Güç kaynağı	Thermo Scientific	EC 300 XL
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601 UV-visible spektrophotometer
Manyetik karıştırıcı	IKA	RCT classic
pH metre	Thermo Scientific	Orion 3 star pH Benchtop
Buzdolabı	vestel	BZP-L3303 WCP
Derin Dondurucu	vestel	FT-290
Persitaltikpompa	Tris	Teledyne ISCO
Vorteks	Velp scientifica	Vortex Mixer
Hassas Terazı	Precisa	XB 220 A
Otomatik pipetler	Socorex	-----
Sonikatör	Bandelin	Sonopuls HD 3100

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan çözeltiler taze hazırlanmış olup pek çoğu buzdolabında +4 °C’de muhafaza edildi. Kullanılan çözeltilerin konsantrasyonları, hazırlanış şekilleri ve ne amaçla kullanıldıkları Tablo 4’ de verildi.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanıldığı yerler

Çözelti adı	Hazırlanışı	Kullanıldığı Yer
1 M Tris-SO ₄ , pH 7,2-9,1	30,02 g Tris 100 mL saf suda çözüldü ve pH’sı 1 M H ₂ SO ₄ ile istenen pH ya ayarlandı.	Esteraz aktivitesinde ve pH çalışmasında
0,2 M NaHCO ₃ , pH 8,8	8,2 g NaHCO ₃ 200 mL saf suda çözüldü ve 1 N NaOH ile pH’sı ayarlandı, 500 mL’ye tamamlandı.	Sepharoz-4B matriski üzerinde afinite jeli hazırlanırken
25 mM Tris-HCl/0,1 M Na ₂ SO ₄ , pH 8,7	1,51 g Tris ve 7,10 g Na ₂ SO ₄ , 250 mL saf suda çözüldü ve 1 M HCl ile pH’sı ayarlanıp 500 mL’ye tamamlandı.	Afinite jeli dengelenmesinde
25 mM Tris-HCl/ 22 mM Na ₂ SO ₄ , pH 8,7	1,5 g Tris ve 1,56 g Na ₂ SO ₄ saf suda çözüldü, 1 M HCl ile pH ayarlandı ve 500 mL’ye tamamlandı.	Hemolizati tatbikatından sonra afinite jelinin yıkanmasında
0,1 M NaCH ₃ COO/ 0,5 M NaClO ₄ , pH 5,6	3,40 g NaCH ₃ COO.3H ₂ O ve 15,25 g NaClO ₄ 150 mL saf suda çözüldü ve 1 M HCl ile pH’sı ayarlandı 250 mL’ye tamamlandı.	Afinite kolondan enzimin elüsyonu için
% 0,9 NaCl	4,5 g NaCl alınıp saf suyla 500 mL’de çözüldü.	Eritrosit homojenatının yıkanmasında
%30’luk Akrilamid Çözeltisi	29 g Akrilamid’in 25 mL’deki çözeltisiyle 1g N,N’-metilenbisakrilamid’in 25 mL’deki çözeltileri birbirine karıştırılarak karışımın hacmi deiyonize suyla 100 mL’ye tamamlandı. Çözelti koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklandı.	SDS PAGE
1,5 M Tris-HCl Tamponu (pH 8,8):	181,7100 g Trizma bazı 800 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH’ı 8,8 olacak şekilde ayarlandı ve hacmi 1000 mL’ye tamamlandı.	SDS PAGE
1,0 M Tris-HCl Tamponu (pH 6,8):	121,1400 g Trizma bazı 800 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH’ı 6,8 olacak şekilde ayarlandı ve hacmi 1000 mL’ye tamamlandı.	SDS PAGE

Tablo 4'ün devamı

%10 (w/v)'luk SDS Çözeltisi:	10,0 g SDS 100 mL deiyonize suda çözülerek hazırlandı.	SDS PAGE
%10 (w/v)'luk Amonyum Persülfat	10,0 g amonyum persülfat 100 mL deiyonize suda çözülerek hazırlandı. Bu çözelti jel karışımı hazırlanırken taze hazırlanmalıdır.	SDS PAGE
%0,1 (w/v)'lik Bromofenol Blue	0,1 g bromofenol blue 100 mL deiyonize suda çözülerek hazırlandı.	SDS PAGE
Coomassie Brilliant Blue	0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250 45 mL metanol, 45 mL saf su ve 10 mL glacial asetik asit karışımında çözülmesiyle elde edildi.	SDS PAGE
Jel Yıkama Çözeltisi	30 mL metanol, 60 mL saf su ve 10 mL asetik asitin karıştırılmasıyla elde edildi.	SDS PAGE
Yürütme Tamponu	14,4 g glisin ve 3,0 g trizma bazı 800 mL saf suda çözülerek 5 mL %10'luk SDS çözeltisi ilave edilerek hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.	SDS PAGE
Numune Muamele Tamponu	50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM β -merkaptotanol, %2'lik SDS, %0,1 bromofenol blue, %10 gliserol konsantrasyonlarında olacak şekilde hazırlandı.	SDS PAGE
Veronal tamponu 0,025 M Na- Barbitol pH 8,2	2,577 g Na-Barbitol 450 mL de çözülür pH 0,1 M HCl ile pH 8,2 ayarlanır ve 500 mL'ye tamamlandı.	Hidratiz Aktivitesinde
L-tirozin çözeltisi	80 mg tirozin 40 mL 0,1 M NaHCO ₃ (pH 10) saf suda çözüldü.	Afinite kolonu için uzatıcı kol
Coomassie B.B.G.Brillant	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL % 95 ve % 85 H ₃ PO ₄ saf suda çözündürülerek 1000 mL'ye tamamlandı.	Elektroforez jel boyama
Dengeleme tamponu 25 mM Tris/0,1 M Na ₂ SO ₄ (pH=8,7)	3,02 g tris(hidroksimetil)-aminometan ve 14,2 g Na ₂ SO ₄ 800 mL saf suda çözüldü pH sı 1 M HCl ile 8,7 ye ayarlandı ve 1L'ye tamamlandı.	Kolon matriskinin yükünün dengelemesinde
Yıkama çözeltisi 25 mM Tris / 22 mM Na ₂ SO ₄	3,2 g Tris ve 3,124 g Na ₂ SO ₄ 800 mL suda çözüldü 1M HCl ile pH 8,7 ye ayarlandı ve 1L'ye tamamlandı.	Elektroforez yıkama çözeltisi
CO ₂ çözeltisi	Buz banyosunda saf su içinden 45-50 dakika CO ₂ 'nin geçirilmesiyle elde edilir.	Hidratiz Aktivitesi

Tablo 4'ün devamı

Yığıma jeli	% 30'luk akrilamid ve % 0,8'lik bisakrilamid çözeltisi; 6 g akrilamid ve 0.16 g bisakrilamid alındı ve 13,84 mL saf suda çözüldü.	Elektroforez jeli
CA-II Elüsyonu çözeltisi 0,1 M CH ₃ COONa/0,5 M NaClO ₄ (pH=5.6)	3 g NaOH, 8,2 mL HClO ₄ ve 2,04 g CH ₃ COONa 125 mL saf suda çözüldü pH 5,6 ya ayarlandı ve 150 mL'ye tamamlandı.	Elüsyon için
Akrilamid-bisakrilamid (30-0,8)	30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid saf suda çözülerek 100 mL çözelti hazırlanır ve süzgeç kağıdından süzülerek 4 °C'de 1 ay içinde kullanılır.	Elektroforez
Lowry A	0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na ₂ CO ₃ olacak şekilde hazırlanır.	Protein tayini
Lowry B	%1 (w/v) bakırsülfat ve %2 (w/v) sodyum-potasyum tartarat (1:1) olacak şekilde hazırlanır.	Protein tayini
Lowry C	50 mL Lowry A + 1 mL Lowry B olacak şekilde hazırlandı.	Protein tayini
Lowry D	1 hacim Folin reaktifi: 1 hacim su olacak şekilde hazırlandı.	Protein tayini
% 1'lik BSA	0,1 g Bovine serum albumin alınıp 10 mL % 0,9 NaCl'de çözüldü.	Protein tayini
asetazolamid	0,1M için 0,022 g asetazolamid suda çözülerek hacmi 10 mL ye tamamlandı. Enzim çözeltisi içinde, 5, 10, 100, 200 µl hacimlerinde kullanıldı.	İnhibisyon çalışması
sülfonamid	0,1 M için 0,095 g sülfonamid suda çözülerek son hacmi 10 mL ye tamamlandı. Enzim çözeltisi içinde, 5, 10, 100, 200 µl hacimlerinde kullanıldı.	İnhibisyon çalışması
NiCl ₂	100 mM için; 12,8 mg alınıp suda çözüldü ve hacmi 10 mL ye tamamlandı. Enzim çözeltisi içinde, 40, 80, 100 µl hacimlerinde kullanıldı.	İnhibisyon çalışması
CoCl ₂	100 mM için; 12,9 mg alınıp suda çözülerek hacmi 10 mL ye tamamlandı. Enzim çözeltisi içinde, 40, 80, 200 µl hacimlerinde kullanıldı.	İnhibisyon çalışması
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	100 mM için; 2,87 mg alınıp suda çözülerek hacmi 10 mLye tamamlandı.Enzim çözeltisi içinde, 40, 80, 200 µl hacimlerinde kullanıldı.	İnhibisyon çalışması

Tablo 4'ün devamı

BaSO ₄	100 mM için 2,33 mg alınıp suda çözülüp hacmi 10 mL ye tamamlandı. Enzim çözeltisi içinde 10, 20, 40, 80 µl hacimlerinde kullanıldı.	İnhibisyon çalışması
FeCl ₃	100 mM için 1,6 mg alınıp suda çözülüp hacmi 10 mL ye tamamlandı. Enzim çözeltisi içinde 40, 80, 200 µl hacimlerinde kullanıldı.	İnhibisyon çalışması

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Karaca Mersini Balığının Temini

Bu çalışmada kullanılan karaca mersini balığı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden canlı olarak temin edildi.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Karaca Mersini Balığından Kalp, Solungaç, Kan ve Beyin Temini ve Homojenatlarının Hazırlanması

2.2.1.1. Karaca Mersini Balığının Kanının Temini ve Hemolizatın Hazırlanması

Deneylerde kullanılan balıklar Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden taze olarak temin edildi. Alınan balıklardan sırayla kuyruk altından enjektörle girilerek kan numuneleri elde edildi. Kan örnekleri pıhtılaşmayı önlemek amacıyla sitratlı şırıngalarla alınarak EDTA'lı kan numune tüplerinde toplandı. Yaklaşık 2 mL'lik 3 tüpte toplanan kan numuneleri, eritrositleri ayırmak amacıyla 2500 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında kalan lökositler ve plazma tabakaları pastör pipetiyle uzaklaştırıldı. Daha sonra eritrositler serum fizyolojik (SF: % 0,9 NaCl) ile üç kez yıkandı. Her bir yıkama sonrasında üst kısım atıldı. SF ile yıkanmış eritrositler üzerine hacimlerinin üç katı kadar +4°C'de bekletilmiş soğuk su eklenerek kan hemolizat çözeltisi hazırlanmış oldu.

2.2.1.2. Karaca Mersini Balığı Dokularının Temini ve Homojenatlarının Hazırlanması

Dokular neşter yardımıyla zedelenmeden dikkatlice alınarak kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için % 0,9'luk NaCl ile 3 defa yıkandı. Yalnızca, beyin dokusundan yağın

uzaklaştırılması için eter ile muamele edildikten sonra yıkama işlemine geçildi. Tüm dokular, 3 mL/g olacak şekilde 25 mM Tris HCl/0,1 M Na₂SO₄ (pH= 8,7) tampon çözeltisinin içinde blender ile parçalanarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar sıvı azot içinde 5 dakika bekletildikten sonra tekrar çözününceye kadar oda sıcaklığında bekletildi. Homojenatlar buz banyosu içinde 2 şer dakika olmak üzere sonikasyona tabi tutuldular. Elde edilen süspansiyonlar 60 dakika 13000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı (Wistrand, 2002; Pullan ve Noltmann, 1985).

2.2.2. Karaca Mersini Solungacından CA Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları İle İlgili Yöntemler

2.2.2.1. Sepharose-4B Afinite Kolonunun Hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Arslan vd., 1996).

2.2.2.1.1. CNBr ile Aktifleştirilmiş Sepharose 4B’ye Tirozin Takılması

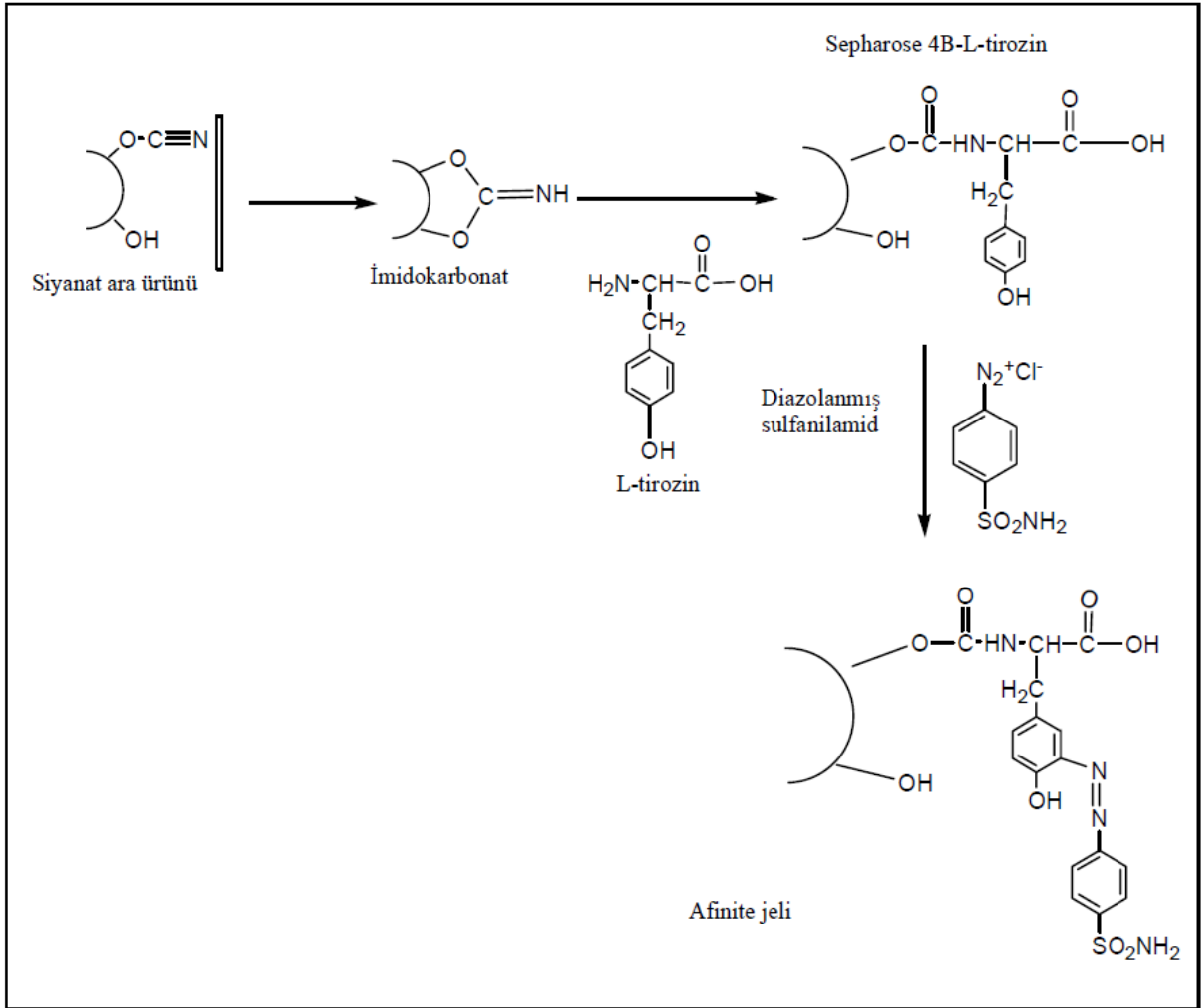
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B, 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL’sinde 80 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırma, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandı ve bundan sonra süspansiyon, 4C’de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 16 saat 4C’de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm’de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı ve böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH 8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL’si içine alındı.

2.2.2.1.2. Sülfanilamid Kenetlendirilmesi

25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C’deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı.

10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 litre saf su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO₄(pH 7,4) tamponuyla yıkandı. Daha sonra üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Arslan vd., 1996).

Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 24'de gösterilmiştir.



Şekil 24. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların açık formülleri (Arslan vd., 1996)

2.2.2.2. Karaca Mersini Solungaç Homojenatının Afinite Kolonuna Tatbiki ve Elüsyonu

Karaca mersininden elde edilen solungaç homojenatı pH 8,7 olan (25 mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄) dengeleme tamponu ile dengeye getirilmiş kolona tatbik edildi ve kolon 400 mL 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 0,1M NaCH₃COO.3H₂O/0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip CA enzimi kolondan elüe edildi. Elüatlar 5'er mL olacak şekilde toplandı. Elüatlarda tek tek hidrataz aktivitesi gözlenmediği için birleştirilerek amicon ultrafiltrasyon membranı (10.000 MWCO) kullanılarak 4.000xg'de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu ile yıkanarak tampon değiştirildi. Enzim çözeltisi aynı tamponun 5 mL'si ile çözülerek hazırlandı.

2.2.3. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Karaca Mersini solungaç homojenatının Sepharose 4B afinite kolonu ile CA enzimlerinin saflaştırılmasından sonra %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli (1970), tarafından açıklandığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi.

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırma derecesinin belirlenmesi ve yaklaşık moleküler ağırlığının belirlenmesi için % 12'lik SDS-poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) uygulandı (Laemmli, 1970).

Ayrırma Jeli (toplam hacim 10 mL) 3,3 mL deiyonize su, 4,0 mL %30'luk akrilamid çözeltisi, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8), 0,1 mL %10'luk SDS çözeltisi, 0,1 mL %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0,004 mL TEMED karışımının hazırlanmasıyla elde edildi. TEMED ilave edildikten sonra karışım hızlı bir şekilde karıştırılarak bir şırınga yardımıyla levhalar arasına aktarıldı. Jelin üst yüzeyi düzgün olması için üzerine dikkatlice su ilave edildi ve polimerizasyonun tamamlanması için 30 dakika beklendi.

Ayrırma jelinin donmasından sonra yükleme jeli hazırlanıp tatbik edildi. Yükleme jeli (toplam hacim 2 mL) 1,4 mL deiyonize su, 0,33 mL %30'luk akrilamid çözeltisi, 0,25 mL 1,0 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8), 0,02 mL %10'luk SDS çözeltisi, 0,02 mL %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0,002 mL TEMED karışımının hazırlanmasıyla elde edildi. TEMED ilave edildikten sonra karışım hızlı bir şekilde karıştırılarak bir şırınga yardımıyla levhalar arasına aktarıldı ve kuyucukları oluşturmak üzere tarak yerleştirildi. Jelin

donmasından sonra tarak yerinden çıkarılarak, birkaç kez jel dikkatlice saf suyla temizlendi. Hazırlanan jel elektroforez düzeneğine yerleştirilerek, yürütme tamponu ilave edildi. Protein standardı ve numunelere eşit hacimlerde 1 x muamele tamponu ilave edildikten sonra 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildikten sonra kuyucuklara bir Hamilton şırıngasıyla aktarıldı. Elektroforez düzeneği bir güç kaynağına bağlanarak, kuyucuk başına 2 mA akım uygulanacak şekilde güç kaynağı ayarlandı.

Jel, Coomassie Brilliant Blue R250 boyası ile 4 saat oda sıcaklığında boyandı. Jel yıkama çözeltisi ile birkaç kez muamele edilerek bantların belirlenmesi sağlandı. Jel % 20 gliserol içeren saf su içinde saklandı.

2.2.4. Kantitatif Protein Tayini

Protein miktarı Lowry yöntemiyle yapıldı (Lowry vd., 1951). 10 µl kültür ekstraktı 490 µl 0,1 N NaOH, %0,1 sodyum dodesil sülfat içeren çözelti ile 500 µl ye seyreltilerek bazikleştirildi. Bu karışıma, eşdeğer oranlarda karıştırılmış %2 Na₂CO₃'ün 0,1 N NaOH içerisindeki çözeltisi (12,5 mL) ve %2 sodyum-potasyum tartaratın %1 lik CuSO₄'daki çözeltisinden (0,25 mL) 1 mL ilave edildi. 5-10 dakika çözeltinin iyice karışması sağlandıktan sonra, 1:1 oranında saf su ile seyreltilmiş folin reaktifinden 100 µl ilave edildi ve 30 dakika olgunlaşmaya bırakılmasının ardından 650 nm deki absorbanları okundu. Aynı reaktiflerle hazırlanan sığır serum albumini, standart protein çözeltileri içinde elde edilen kalibrasyon grafiği yardımıyla doku homojenatlarının ve saf enzim çözeltisinin protein içerikleri tayin edildi.

2.2.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayini

CA enziminin aktivitesi iki şekilde ölçülebilmektedir; birincisi, CA'nın fizyolojik aktivitesi olan CO₂-hidrataz aktivitesidir, ikincisi ise *in vitro* şartlarda gerçekleştirdiği spektrofotometrik olarak takip edilebilen esteraz aktivitesidir.

2.2.5.1. CO₂-Hidrataz Aktivitesi

Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (Wilbur ve Anderson, 1948). CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom-timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite tayini işlemleri için reaksiyon

karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı (Tablo 5). Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH 6,3) için geçen süre (t₀) belirlendi. İndikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH 6,3) için geçen süre (t_c) bir kronometre vasıtasıyla belirlendi. Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Enzimin aktivitesi; enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın t_c' ye bölünmesi ile belirlendi (1) (Maren 1960).

$$EU = (t_0 - t_c) / t_c \quad (1)$$

Karaca Mersini dokularının homojenatları ve saf enzimin aktivite tayininde aynı işlemler (Tablo 5) uygulandı ve saflaştırma tablolarında sunulan aktivite değerleri bu metoda göre hesaplandı.

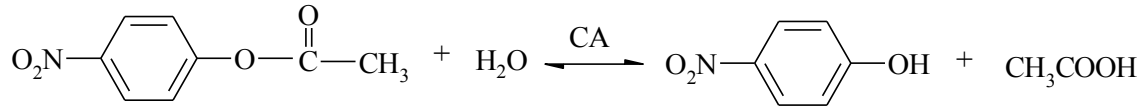
Tablo 5. CO₂- hidrataz aktivitesi reaksiyon karışımı

Kullanılan maddeler	Kontrol tüpü (kör) (µl)	Numune tüpü (µl)
0,025 M Veronal Tamponu(pH 8,2)	2000	2000
%0,04'lük brom timol mavisi	100	100
Saf su	900	800
Enzim çözeltisi	-	100
CO ₂ ile doyurulmuş su	1000	1000
Toplam hacim	3000	3000

2.2.5.2. Esteraz Aktivitesi

Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Metodun prensibi kısaca şöyledir; karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat'a hidroliz etmektedir.

Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir (Şekil 25):



Şekil 25. Esteraz aktivitesi reaksiyon mekanizması

348 nm’de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat’ın her ikisi aynı absorbanı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Verpoorte ve Mehta, 1967; Armstrong vd., 1966). Bu dalga boyunda p-nitrofenilasetatın çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır.

Fenol grupları asidik oldukları için ortamın pH’sına göre değişen oranda fenolat ve H⁺ iyonlarına ayrışır. 348 nm dalga boyunda p-nitro fenol ve p-nitro fenolat iyonunun absorbanları aynı anda okunabildiği için bu durum absorban ölçümünü etkilemez. p-nitro fenol bileşiğinin molar ekstiriksiyon katsayısı, $\epsilon_{348} = 5.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ ‘dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil asetatin çok az bir absorpsiyonu vardır ve $\epsilon_{348} = 0,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ molar ekstiriksiyon katsayısına sahiptir. 1 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre şu prosedür uygulandı (Tablo 6).

Tablo 6. Esteraz aktivitesi için reaksiyon karışımı

Kullanılan maddeler	Kontrol tüpü (kör) (µl)	Numune tüpü (µl)
1 M Tris-SO ₄ Tamponu (pH 9)	467	467
p-Nitrofenilasetat	333	333
Saf su	200	167
Enzim çözeltisi	-	33
Toplam hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra ilk absorban miktarı okundu ve 1 dakika sonundaki 25°C de 348 nm’de absorbanı okunarak absorban farkı alındı.

Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 1 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı.

Yapılan deneylerde kullanılan p-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte and Mehta 1967).

Bir ünite enzim, 25 °C'de 1 dakikada 1 µmol p-nitrofenil asetatın bozunması için gerekli olan enzim miktarı olarak belirlendi. Spesifik aktivite, mg protein başına aktivite olarak ifade edildi.

2.2.6. Karaca Mersini Doku Homojenatları ve Hemolizatındaki Karbonik Anhidrazın Kinetik İncelenmesi

2.2.6.1. pH ve Sıcaklığın Karbonik Anhidraz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

Tüm homojenatlar ve saf enzim ile yapılan pH çalışmalarında, pH 4,0 ve 5,0 için asetat tamponu, PH 6,0 ve 7,0 için fosfat tamponu pH 8,0 ve 9,0 için Tris-SO₄ tamponu ile pH 10,0 ve 11,0 için ise glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Tüm homojenatların değişik pH değerlerinde pNFA substratı varlığında 348 nm' de CA'larının esteraz aktivitesine bakıldı. Ölçülen aktivite değerleri gözlenen en yüksek aktiviteye göre oranlanarak bağıl olarak hesaplanarak, grafikleri çizildi. En yüksek aktivitenin gözlenmiş olduğu pH değeri CA'nın esteraz aktivitesi için optimal pH değeri olarak belirlendi.

Karaca Mersininden elde edilen kalp, beyin, solungaç homojenatları ve kan hemolizatında CA'nın esteraz aktivitesi 10 °C ile 80 °C arasında spektrometrik olarak ölçüldü. Aynı işlemler karaca mersini solungacından saflaştırılan CA için de yapıldı. Ölçülen aktivite değerleri gözlenen en yüksek aktiviteye göre oranlanarak bağıl olarak hesaplanarak, grafikleri çizildi. En yüksek aktivitenin gözlendiği sıcaklık değeri CA'nın esteraz aktivitesi için optimal sıcaklık değeri olarak belirlendi.

2.2.6.2. Karaca Mersini Solungaçlarından Saflaştırılan CA'nın Esteraz Aktivitesi İçin K_M , V_{max} , K_{cat} ve V_o Değerlerinin Bulunması

Karaca mersini solungaçlarından saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesinin ölçümünde kullanılan p-NFA substratının K_M ve V_{maks} değerlerinin tayininde en az 5 farklı substrat konsantrasyonunda ve paralel çalışılmak suretiyle esteraz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Değişen substrat konsantrasyonuna karşı hız Lineweaver–Burk grafiğine göre çizildi ve grafikten K_M ve V_{maks} değerleri bulundu.

K_{cat} birim zamanda 1 mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanır ve enzimin katalitik etkinliğini gösteren önemli bir sabittir. Enzimin turnover sayısı (K_{cat}) ise saflaştırılan enzim çözeltisinden protein tayini yapılarak toplam enzim miktarı bulundu ve $K_{cat} = V_{maks} / E_T$ den hesaplandı. V_o özgülük sabitinin bulunmasında ise $V_o = K_{cat} / K_M$ formülünden yararlanıldı. V_o değeri enzimin katalitik etkinliğini veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının kullanılan sabittir (Nelson ve Cox , 2005).

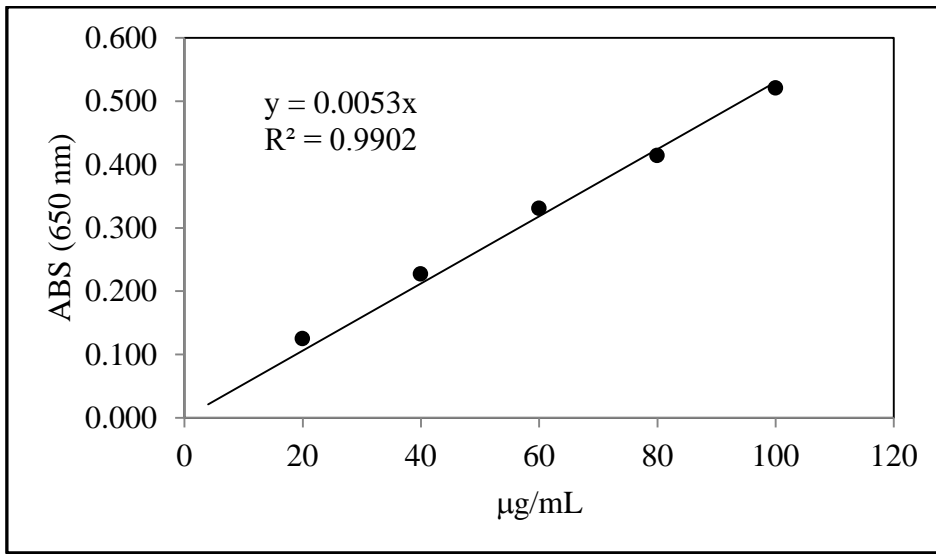
2.2.6.3. Karaca Mersini Solungacından Saflaştırılan Karbonik Anhidrazın İnhibisyonu Çalışması

Karaca mersini solungacından saflaştırılan karbonik anhidrazın inhibisyonu çalışmasında enzimin bilinen inhibitörlerinden asetazolamid ve sulfanilamid kullanıldı. En az 4 farklı inhibitör konsantrasyonda yapılan inhibisyon çalışmasında inhibitör konsantrasyonu ile % inhibisyon arasında bir grafik çizildi. Enzimin ilk aktivitesini % 50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu IC_{50} olarak belirlenmiştir. Ayrıca Co^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} gibi bazı metallerin CA aktivitesi üzerine etkisine de 3 farklı konsantrasyonda bakılmış ve IC_{50} değerleri hesaplandı. Ayrıca balık tesislerinde kullanılan yemlerin 1g/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi 3 gün bekletildikten sonra süzülerek çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu çözelti ile yem atıklarının CA hidrataz aktivitesi üzerine etkisi bakıldı.

3. BULGULAR

3.1. Karaca Mersini Dokularında Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Çalışma Grafiği ve Hidrataz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Karaca Mersininin dokularından elde edilen özütlerindeki protein miktarı Lowry protein tayin yöntemi kullanılarak belirlendi (Lowry vd., 1951). Standart grafik 1 mM stok BSA çözeltisinden seyreltmeler yapılmak suretiyle hazırlandı. Elde edilen grafiğin eğimi 0,0053 ve R^2 değeri 0,9902 olarak bulundu (Şekil 26).



Şekil 26. Protein standart çalışma grafiği

Karaca Mersininin dokularından elde edilen özütlerindeki protein miktarı kalpte 5,4 mg/mL, beyinde 3,4 mg/mL, kan hemolizatında 15,3 mg/mL ve solungaçta 6,5 mg/mL olarak tespit edildi (Tablo 7).

Karaca Mersini dokularından elde edilen homojenatlardaki CA'nın hidrataz aktivitesi kalpte 2,5 EU/mg protein, beyinde 7,4 EU/mg protein, kan hemolizatında 10,8 EU/mg protein ve solungaçta 5,2 EU/mg protein olarak belirlendi. (Tablo 7).

Bundan sonraki saflaştırma ve kinetik çalışmalarında, yeterli miktarda materyal ve literatürde az çalışmaları mevcut olduğu için solungaç dokusu kullanıldı.

Tablo 7. Karaca mersininden elde edilen kalp, beyin, solungaç dokuları ve kan hemolizati için protein miktarları ve kinetik veriler

	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Hacim (mL)	Toplam aktivite (EU)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EU/mg protein)
Kalp	13,3	5,4	13	173	70	2,5
Beyin	25,0	3,4	10	250	34	7,4
Kan	165,0	15,3	20	3300	306	10,8
Solungaç	33,8	6,5	62	2093	403	5,2

3.2. Karaca Mersininin Solungaçlarından Saflaştırılmasına Ait Bulgular

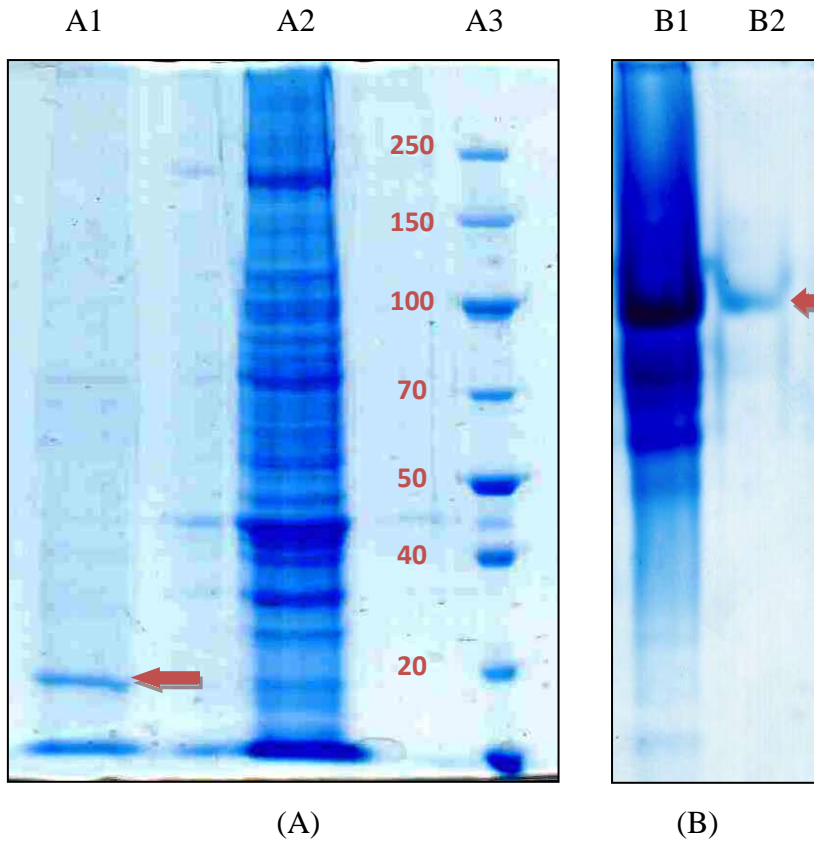
Karaca mersininden elde edilen solungaç homojenatı pH 8,7 olan 25 mM Tris-HCl/0.1 M Na₂SO₄ tamponuyla dengeye getirilen Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kolonuna (1,0x10 cm'lik ve dolgu yüksekliği 15 cm) tatbik edildi ve kolon 400 mL 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra 0,1M NaCH₃COO.3H₂O/0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) tampon çözeltisi ile CA kolondan elüe edildi. Elüatlarda CA aktivitesi gözlenemediği için elüatlar birleştirilerek (toplam hacim 80 mL) 10.000 Cutoff Amicon filtrede 4.000xg de santrifüj edildi ve 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu ile yıkanarak diyaliz yapıldı. Enzim çözeltisinin son hacim 5 mL olacak şekilde deriştirildi. Elde edilen CA enzim çözeltisinde hidrataz aktivitesine bakıldı. Saflaştırılan CA'nın 222,2 EU/mg protein spesifik aktivite gösterdiği ve 66 kat saflaştığı belirlendi (Tablo 8).

Tablo 8. Karaca Mersininin solungacından saflaştırılan CA enziminin saflaştırma tablosu

	Toplam hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam aktivite (EU)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EU/mg protein)	Verim	Saf-laştırma katsayı-sı
Homojenat Afinite kolonundan elde edilen enzim çözeltisi	44	22	968	6,5	286,0	3,4	100	1
	5	40	200	0,18	0,9	222,2	20,7	66

3.3. SDS-PAGE Elektroforez bulguları

Karaca Mersini solungacından elde edilen CA enzimi SDS-poliakrilamid jel ve doğal elektroforeze tatbik edildi. Daha sonra elde edilen elektroforez jelleri taranarak elektronik ortama aktarıldı (Şekil 27). SDS-PAGE ve doğal elektroforez sonucunda tek protein bandı gözlemlendi (Şekil 27). Standart proteinlerin Rf değerlerine göre yapılan tayinde karaca mersini solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin alt birim molekül kütlesi yaklaşık olarak 20 kDa olarak bulundu (Şekil 27A).



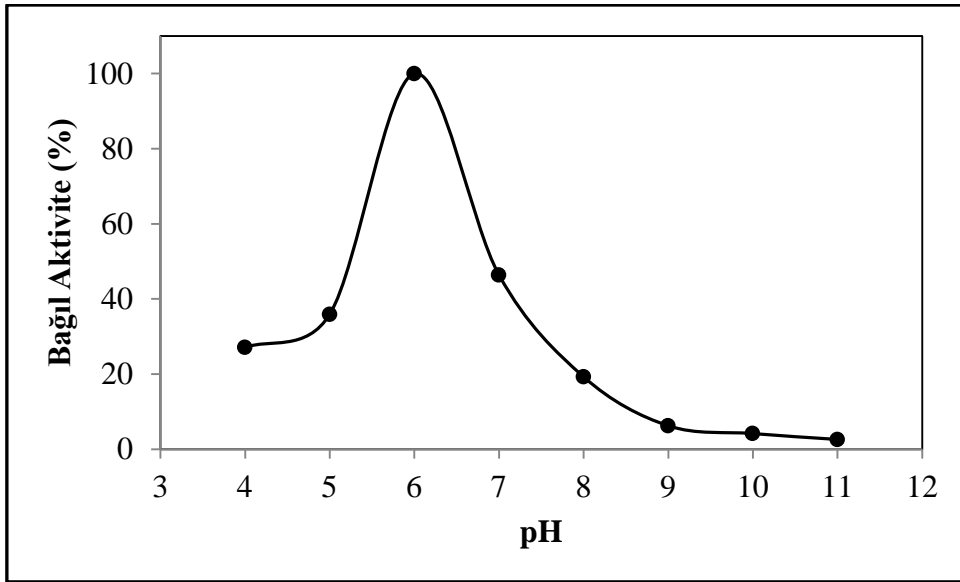
Şekil 27. A) SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (A1:Saflaştırılan CA, A2:Solungaç homojenatı, A3:Protein standartı,); B) Doğal elektroforez jeli (B1: Solungaç homojenatı, B2: Saflaştırılan CA)

3.4. Karaca Mersini Kalp, Beyin, Hemolizat, Solungaç Dokularındaki Karbonik Anhidrazın Optimum pH ve Sıcaklık Değerleri

Karaca mersini kalp, beyin, hemolizat, solungaç dokuları karbonik anhidraz enziminin hangi pH da maksimum aktivite verdiğini belirlemek için pH 4.0 den 11.0 aralığında esteraz aktivitesi ölçüldü. Karaca Merisini dokularında izole edilen karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi p-nitrofenil asetat substratı varlığında en yüksek aktiviteyi kalp ve beyin için pH 5,0, kan hemolizati için pH 7,0 ve saflaştırılmış solungaç CA için pH 6,0 olarak belirlenmiştir (Tablo 9, Şekil 28).

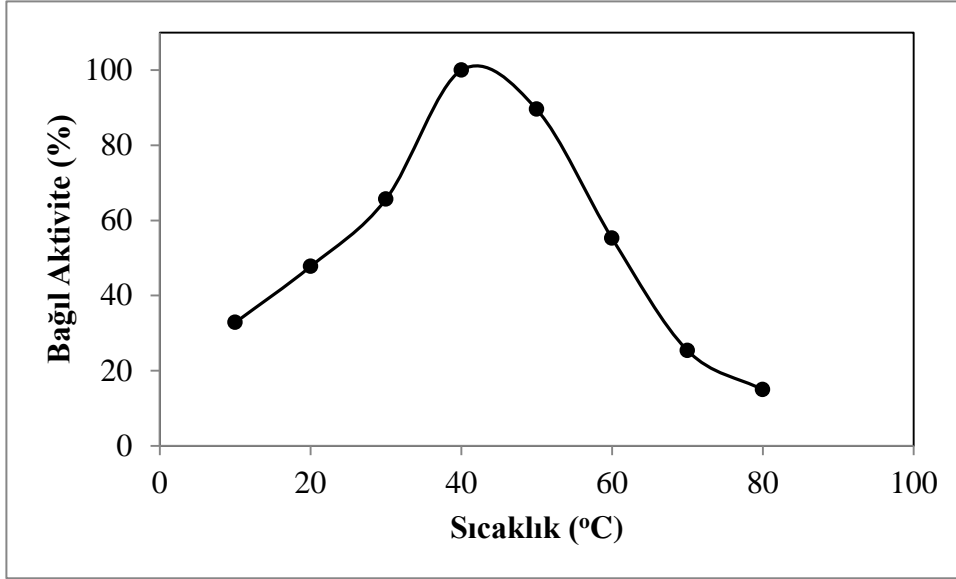
Tablo 9. Karaca Mersin Balığının dokularından izole edilen karbonik anhidrazın optimal pH değerleri

Doku	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
Kalp	5,0	40
Beyin	5,0	40
Solungaç	6,0	40
Hemolizat	7,0	40



Şekil 28. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA için pH-Aktivite grafiği

Karaca mersini kalp, beyin, hemolizat, solungaç dokuları karbonik anhidraz enziminin hangi sıcaklıkta maksimum aktivite verdiğini belirlemek için sıcaklık 10-80°C aralığında esterez aktivitesi ölçüldü. Karaca Merisini Balığının dokularında izole edilen karbonik anhidraz aktivitesi p-nitrofenil asetat substratı varlığında en yüksek aktiviteyi tüm dokularda 40 °C’ de gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 9, Şekil 29).



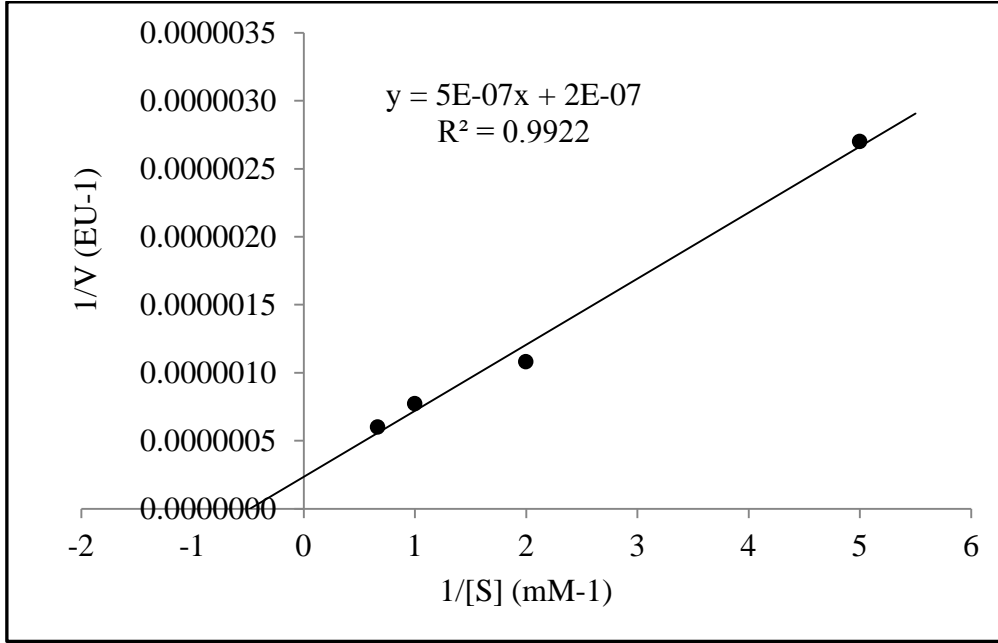
Şekil 29. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA için sıcaklık-aktivite grafiği

3.5. Karaca Mersini Solungaçlarından Saflaştırılan CA'nın Kinetik Verilerine Ait Bulgular

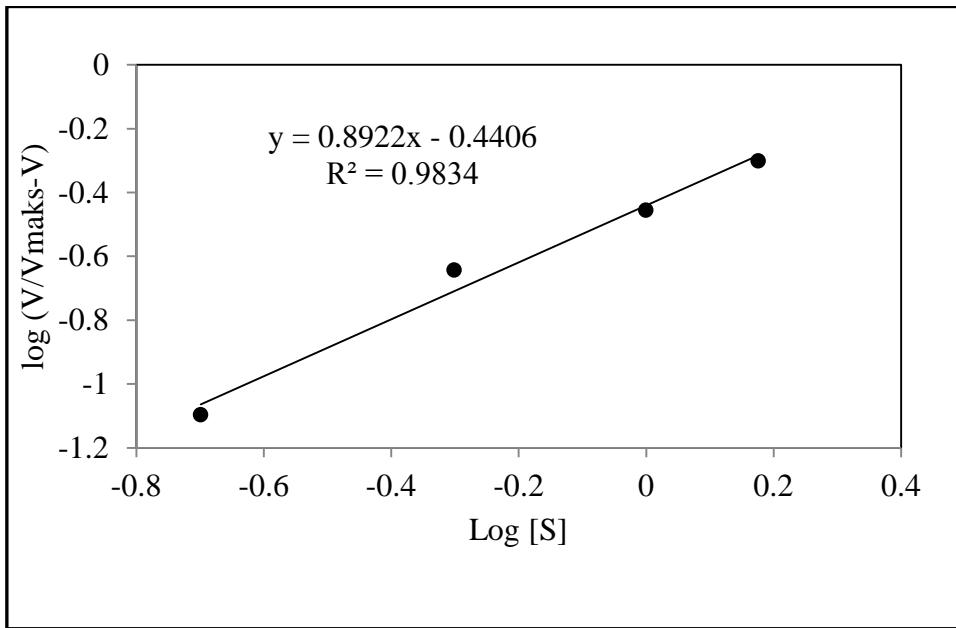
0,2-1,5 mM konsantrasyon aralığında değişen p-NFA substratı varlığında esterez aktivitesi spektrofometrik olarak 348 nm'de ölçüldü. 1/S ye karşı 1/V olacak şekilde çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden enzimin Km ve Vmaks değerleri hesaplandı (Şekil 30). Ayrıca değişen substrat konsantrasyonlarına karşılık okunan hız (V) ve buna karşılık gelen Vmaks değerleri kullanılarak elde edilen V/(Vmaks-V) oranları Hill eşitliği gereğince grafiğe geçirilerek, substratının CA üzerindeki substrat-bağlanma bölgesinde kooperativitenin olup olmadığı da belirlenmiştir.

Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA enziminin p-NFA substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda Vmaks değeri $5,0 \times 10^6$ $\mu\text{M}/\text{dak}$ ve Km değeri 2,5 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 30, Tablo 10). Ayrıca Hill eğrisinden elde

edilen Hill sabitinin (h) değerinin 1'den küçük çıkması, CA enziminin negatif kooperative gösterdiğini ifade etmektedir (Şekil 31).



Şekil 30. Karbonik anhidrazın *p*-NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 31. Karaca Mersininin solungacından saflaştırılan CA'ın *p*-NFA substratı varlığında elde edilen Hill grafiği

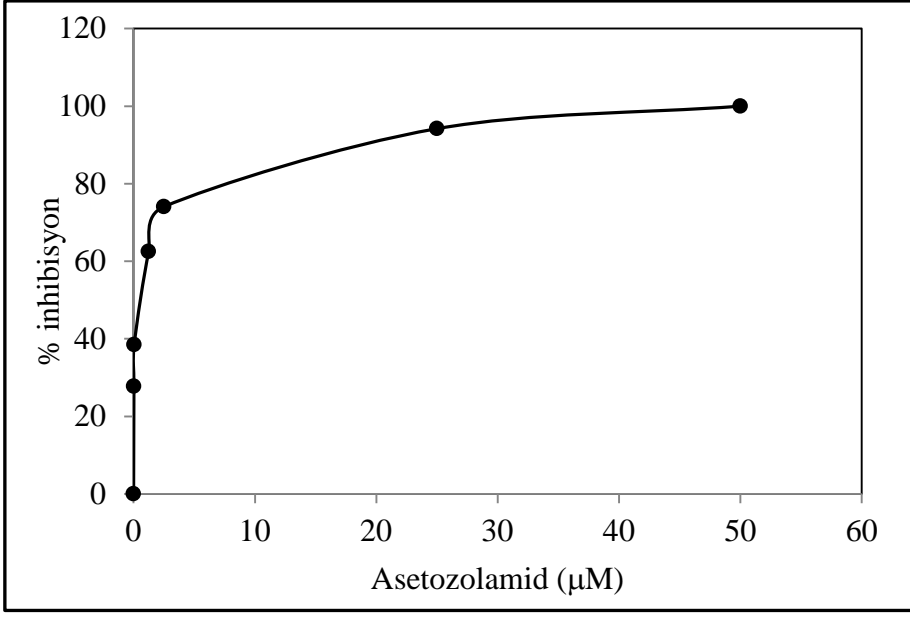
Enzimin katalitik gücünün göstergesi olan k_{cat} değeri $k_{cat} = V_{maks} / E_T$ formülüne göre belirlendi. Enzimlerin katalitik etkinliğini veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının bir yolu da reaksiyonlar için özgülük sabitinin (V_o) bulunmasıdır. Özgülük sabiti $V_o = k_{cat} / K_M$ den hesaplandı (Tablo 10).

Tablo 10. Karaca mersini solungaçından saflaştırılan CA için kinetik veriler

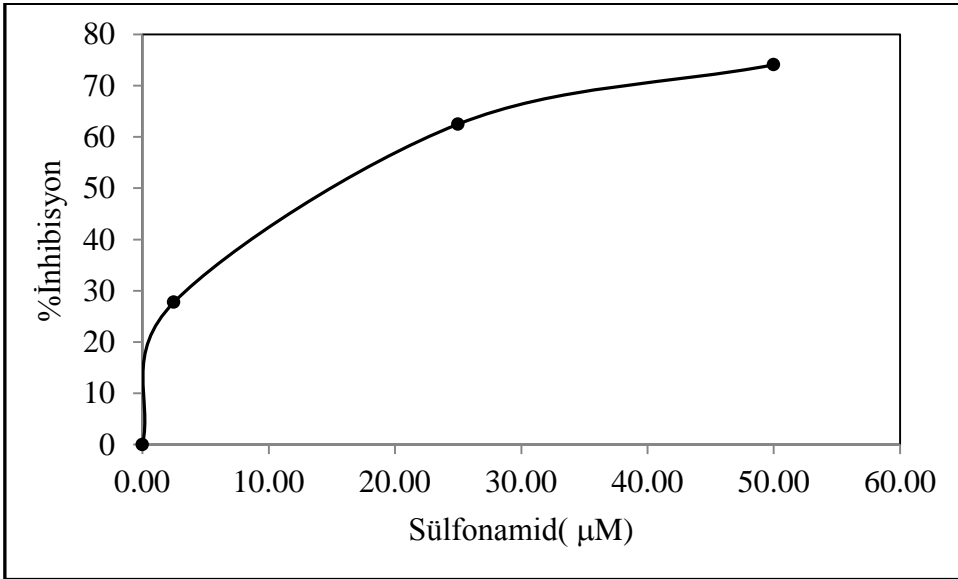
Substrat	V_{maks} ($\mu\text{M}/\text{dak}$)	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_M ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
p-nitrofenil asetat	5×10^6	2,5	134408,6	53763,4

3.6. Karaca Mersini Solungaçlarından Saflaştırılan CA İnhibisyon Çalışmalarına Ait Bulgular

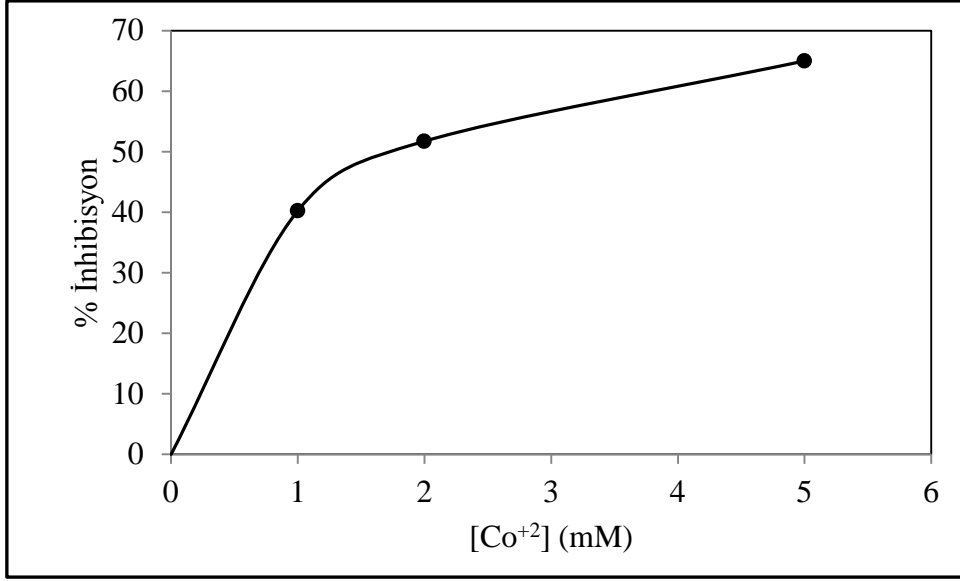
CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine CA'nın bilinen inhibitörlerinden asetazolamid, sülfanilamid ve bazı metal tuzlarının farklı konsantrasyonlarının etkisi incelendi. Elde edilen inhibisyon grafiklerine göre asetazolamid için IC_{50} değeri $0,1 \mu\text{M}$ (Şekil 32), sülfonamid için $13 \mu\text{M}$ (Şekil 33) olarak bulundu. İnhibitör etkisi incelenen metallere Co^{+2} için IC_{50} $1,7 \text{ mM}$ (Şekil 34), Zn^{+2} için IC_{50} $1,1 \text{ mM}$ (Şekil 35), Ni^{+2} için IC_{50} $1,2 \text{ mM}$ (Şekil 36), Fe^{+2} için IC_{50} $0,2 \text{ mM}$ (Şekil 37), Ba^{+2} için IC_{50} $1,1 \text{ mM}$ (Şekil 38) bulundu (Tablo 11). Ayrıca tesislerde kullanılan yem atıklarının CA hidrataz aktivitesine etki etmediği belirlendi.



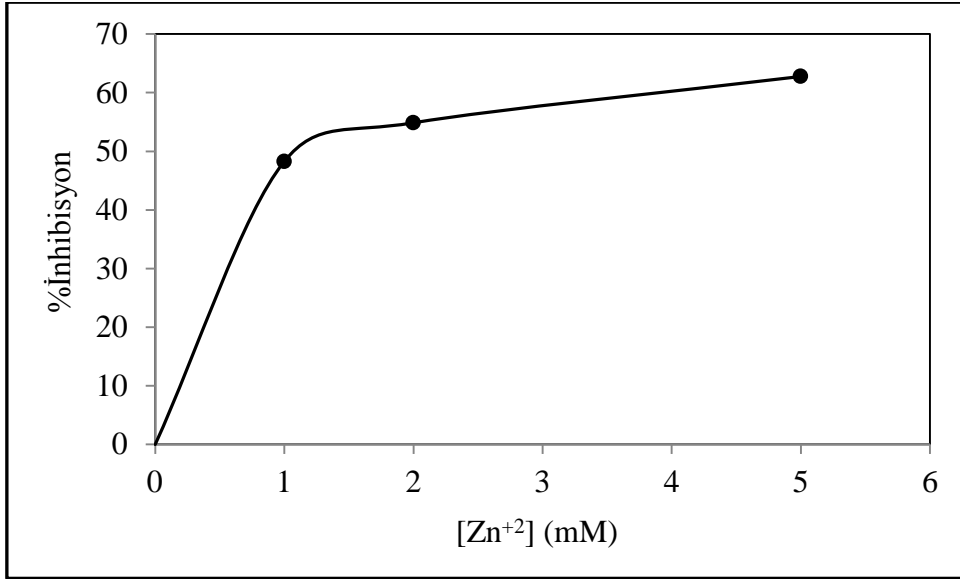
Şekil 32. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA'nın [asetazolamid]-% inhibisyon grafiği



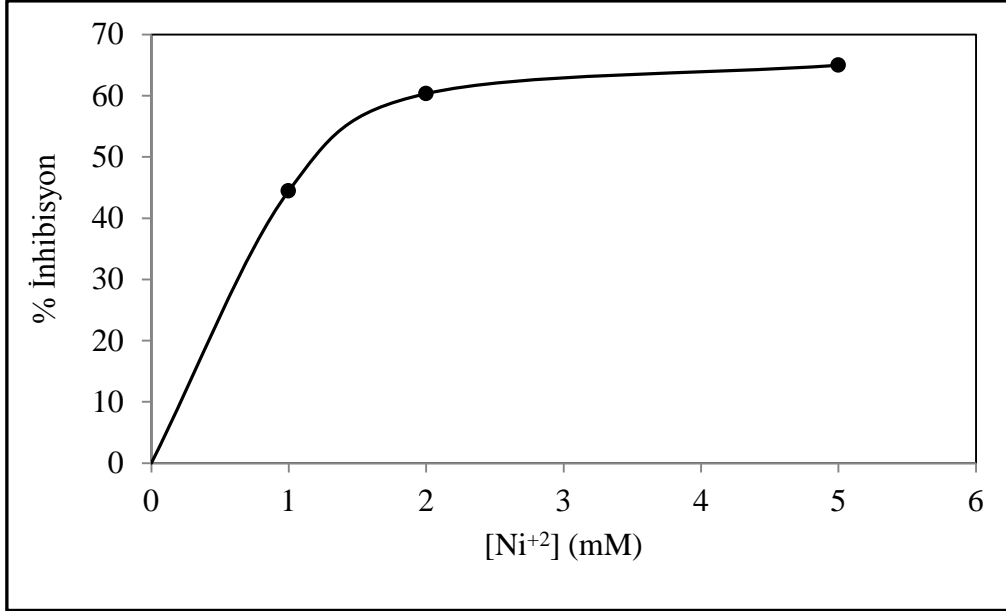
Şekil 33. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA'nın [sulfonamid]-% inhibisyon grafiği



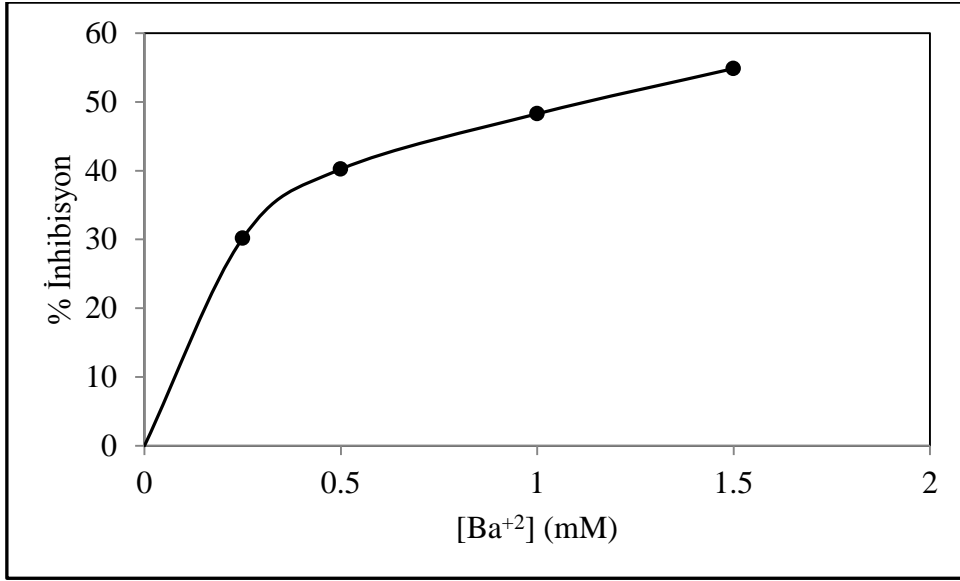
Şekil 34. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA'nın $[Co^{+2}]$ -% inhibisyon grafiği



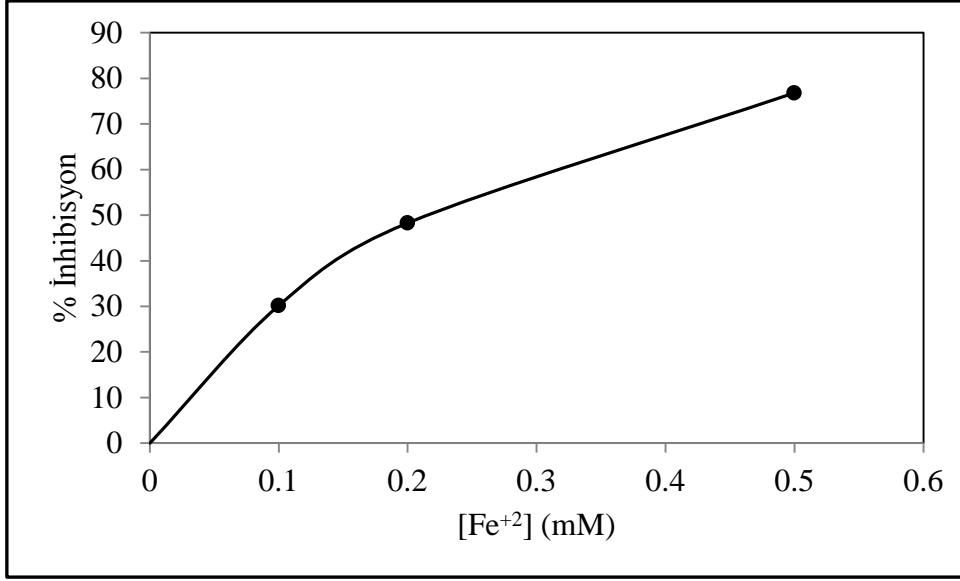
Şekil 35. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA ile $[Zn^{+2}]$ -% inhibisyon grafiği



Şekil 36. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA'nın [Ni²⁺] -% inhibisyon grafiği



Şekil 37. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA'nın [Ba²⁺] -% inhibisyon grafiği



Şekil 38. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA ile [Fe²⁺] -% inhibisyon grafiği

Tablo 11. Karbonik anhidrazın inhibitörleri varlığında elde edilen IC₅₀ değerleri

İnhibitör madde adı	IC ₅₀
Asetazolamid	0,1 µM
Sulfanilamid	13 µM
Co ⁺²	1,7 mM
Zn ⁺²	1,1 mM
Ni ⁺²	1,2 mM
Fe ⁺²	0,2 mM
Ba ⁺²	1,1 mM

4. TARTIŞMA

Tüm canlı türlerinde mevcut olan ve üzerinde en çok çalışılan enzim karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) canlı sistemlerde pH düzenleyici, su elektrolit ve iyon transportunu düzenleyici olarak rol alan bir enzimdir. Fizyolojik olarak karbondioksidin hidrasyonunu ve bikarbonatın dehidratasyonunu dönüşümlü olarak katalizler. Enzim hemen hemen bütün dokularda mevcut olup hidrataz aktivitesinin yanında H^+ ve HCO_3^- birikiminde rol almaktadır (Beydemir vd. 2004). Enzim bitkilerde pH regülasyonu yanında Calvin çevriminde önemli rol aldığı bilinmektedir (Jebanathirajah ve Coleman, 1998).

Karbonik anhidraz I ve II enzimleri insan eritrositlerden izole edilen ilk enzimler olup izolasyonlarında en çok kullanılan yöntem afinite kromatografisidir. İlk defa 1970 lerde uygulanmaya başlamış olan bu yöntemle sonraları karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir. Bu güne kadar enziminin yaklaşık 16 tane izoenzimi ortaya çıkarılmış ve her geçen gün yenisi keşfedilmektedir (Supuran, 2008).

Karbonik anhidraz canlılar için hayati öneme sahip bir enzimdir. Enzim her canlı ve dokuda farklı izoenzime ve farklı kinetik özelliklere sahip bulunmaktadır. Enzimin canlı organizmada nerelerde ve hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl fonksiyon gösterdiğini belirlemek için her canlı türünde ve dokularında ayrı ayrı CA'nın saflaştırılıp karakterizasyonu üzerine yüzlerce çalışma bulunmaktadır. Ancak Karaca Mersin balığı eritrosit ve diğer dokularında bugüne kadar CA enziminin saflaştırılması ve karakterize edilmesi üzerine çalışmaya rastlanılmadı. Literatürde CA aktivitesi en çok çalışılan balık gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) olup değişik dokularından CA izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Soyut ve Beydemir 2012). Gökkuşağı alabalığı bir tatlı su balığı olup, kültür balıkçılığı en çok yapılan balık olmasından dolayı, enzim çalışmaları için çok tercih edilmektedir. Yapılan bu çalışmada Karaca Mersinin beyin, kalp, solungaç homojenatlarında ve eritrosit hemolizatında CA çalışıldı. Ayrıca solungaçtan Sepharose-4B afinite kolon matriksi kullanılarak saflaştırıldı.

Karaca Mersininin dokularından elde edilen homojenatlardaki protein miktarı kalpte 5,4 mg/ml, beyinde 3,4 mg/ml, kan hemolizatında 15,3 mg/ml ve solungaçta 6,5 mg/ml olarak tespit edildi. Bununla birlikte doku homojenatlarındaki CA'nın hidrataz aktivitesi kalpte 2,5 EU/mg protein, beyinde 7,4 EU/mg protein, kan hemolizatında

10,8 EU/mg protein ve solungaçta 5,2 EU/mg protein olarak belirlendi. Karaca Mersin solungacından ilk kez saflaştırılan CA'nın 222,2 EU/mg protein spesifik aktivite gösterdiği ve % 20,7 verimle 66 kat saflaştığı tespit edildi. Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimi Sefaroz-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonuyla, balık kanına göre 539 kat ve %29 verimle saflaştırılmıştır. Mersin balığı eritrositlerinde tek izoenzimin olduğu ve spesifik aktivitesinin 26943 EU/mg protein olduğu tespit edilmiştir (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011). Keçi eritrositlerinde yapılan bir çalışmada eritrosit CA'sı afiniteye göre 262 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir (Sinan vd. 2007). Çipura balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokuları karbonik anhidraz enzimleri Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak sırasıyla %9,1, %32,84 ve %83,6 verimlerle saflaştırıldı. Çipura balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokuları için tüm saflaştırma işlemleri boyunca saflaştırma kat sayıları sırasıyla yaklaşık 354, 841 ve 455 olarak bulunduğu ifade edilmektedir (Kaya vd., 2011). Gökkuşluğu alabalığı karaciğer dokusundan, spesifik aktivitesi 4318 (EÜ/mg protein) olan, %38 verimle ve yaklaşık 2260 kat; böbrek dokusundan, spesifik aktivitesi 17285 (EÜ/mg protein) olan, %31,7 verimle ve yaklaşık 1800 kat; kas dokusundan, spesifik aktivitesi 2300 (EÜ/mg protein) olan, %19 verimle ve yaklaşık 1080 kat; beyin dokusundan spesifik aktivitesi 2275 (EÜ/mg protein) olan %22,5 verimle ve yaklaşık 1283 kat saflaştırılmıştır (Söyüt, 2006). Bir başka çalışmada gökkuşluğu alabalık eritrositlerinden CA enzimini Sepharose-4B afinite kolonunun kullanılmasıyla 422,5 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %20,9 verimle 222,4 kat saflaştırılmışlardır (Hisar vd., 2003). Hall ve Schaer (1983), kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Biogel iyon değişim kolonu kullanarak gökkuşluğu alabalıkları eritrositlerinden CA enzimi 3,7 kat saflaştırmışlardır. Karbonik anhidraz enziminin aktivitesi ile saflaştırma katsayısı organizma veya doku değişikçe farklılık göstermektedir. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA genelde literatürlerde yer alan CA'lara göre düşük aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Karaca Mersini solungacı CA'ı SDS-PAGE jelinde yaklaşık 20 kDa altbirim molekül kütesine sahip tek protein bandı olarak gözlemlendi. Gökkuşluğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından izole edilen CA enzimlerinin sırasıyla alt birim molekül kütlelerinin yaklaşık olarak 29,4 kDa, 28,7 kDa, 30,3 kDa ve 29 kDa olduğu belirtilmiştir (Söyüt, 2006). Mersin Balığı eritrositi CA'nın molekül ağırlığının yaklaşık 29 kDa olduğu tespit edilmiştir (Karahalil, 2009; Kolaylı, 2011). Farklı organizmalardan

elde edilen CA'ların 18,9-29,3 kDA arasında değişen altbirim molekül kütleleriyle mono, trimer, tetramer ve oktamer yapılara sahip oldukları belirtilmektedir (Smith ve Ferry, 1999).

Karaca Merisini dokularında izole edilen karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi p-nitrofenil asetat substratı varlığında en yüksek aktiviteyi kalp ve beyin için pH 5,0, kan hemolizati için pH 7,0 ve saflaştırılmış solungaç CA için pH 6,0 olarak belirlendi. Ayrıca karbonik anhidraz aktivitesi p-nitrofenil asetat substratı varlığında en yüksek aktiviteyi tüm dokularda 40 °C' de gösterdiği tespit edildi. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA enziminin p-NFA substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri $5,0 \times 10^6$ $\mu\text{M}/\text{dak}$, K_M değeri 2,5 mM, k_{cat} 134408,6 s^{-1} , k_{cat}/K_M 53763,4 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak belirlendi.

Mersin Balığı eritrositinde saflaştırılan CA esteraz aktivitesine göre pH 9,0' da 30 °C sıcaklıkta ve 0,05 M Tris-SO4 tamponunda optimum aktivite gösterdiği bulunmuştur. Enzimin K_M ve V_{maks} kinetik değerleri p-nitrofenil asetat (p-NFA) substratı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğine göre hesaplanmış ve sırasıyla K_M 4 mM ve V_{maks} 20.000 mM/dak, k_{cat} değeri 20,8 s^{-1} olarak tespit edilmiştir (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011). Gökkuşığı alabalık CA esteraz aktivitesi optimal pH karaciğer dokusu için pH 8,5 olarak belirlenirken, böbrek, kas ve beyin için pH 9,0 olarak bulunduğu ve tüm dokularda 40 °C'de en yüksek aktivitenin olduğu belirtilmiştir. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesinde substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetat için K_M , V_{maks} , k_{cat} ve özgülük sabiti (V_0) değerleri belirlenmiştir. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin K_M değerleri sırasıyla 0,66, 0,40, 1,29 ve 0,92 mM olarak, V_{maks} değerleri sırasıyla 0,126, 0,097, 0,173, 0,207 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein dak, k_{cat} değerleri sırasıyla 32,8, 15,2, 28,8, 43,6 s^{-1} ve özgülük sabitleri sırasıyla 5×10^4 , 4×10^4 , $2,2 \times 10^4$ ve $4,7 \times 10^4$ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak belirtilmiştir (Söyüt, 2006). Çipura balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokuları karbonik anhidraz (CA) enzimleri Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak sırasıyla %9,1, %32,84 ve %83,6 verimlerle saflaştırılmış ve saflaşma kat sayıları sırasıyla yaklaşık 354, 841 ve 455 olarak bulunmuştur (Kaya vd., 2011). Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Bölümü Alabalık Üretim Çiftliği Gökkuşığı Alabalıklarının solungaçlarından CA %52,8 verimle, 413,53 EU/mg protein spesifik aktivite ile 214,26 saflaştırdıkları görülmektedir (Ceyhun vd., 2010). Karaca Mersin Balığı solungacından saflaştırılan CA'nın esteraz aktivitesi p-nitrofenil

asetat substratı varlığında elde edilen kinetik veriler literatürde yer alan CA'ların esterez aktivitesi ile uyumlu olduğu tespit edildi.

Karaca Mersini solungacından izole edilen CA enziminin hidrataz aktivitesinin inhibisyon çalışmasında, asetazolamid ile IC₅₀ değeri 0,1µM, sülfonamid ile IC₅₀ değeri 13 µM olarak bulundu. İnhibitör etkisi incelenen metallere Co⁺² için IC₅₀ 1,7 mM, Zn⁺² için IC₅₀ 1,1 mM, Ni⁺² için IC₅₀ 1,2 mM, Fe⁺² için IC₅₀ 0,2 mM, Ba⁺² için IC₅₀ 1,1 mM bulundu.

Mersin Balığı eritrositinden saflaştırılan CA enziminin sülfanilamid ve asetazolamid inhibitörlerine karşı 4,0 µM ve 0,1 µM gibi oldukça düşük IC₅₀ değerine, Zn⁺², Cu⁺², Co⁺² ve Ag⁺ kanyonlar ile ise sırasıyla 2,8, 5,2, 3,4, 1,7 mM IC₅₀ değerlerine sahip oldukları belirtilmektedir (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011). Gökkuşığı Alabalığının karaciğerinden izole edilen CA'nın çeşitli metallere inhibisyonundan IC₅₀ değerleri, Co⁺² ile 0,03 mM, Cu⁺² ile 30 mM, Zn⁺² ile 47,1 mM, Ag⁺² ile 0,01 mM, Cd⁺² ile 15 mM, böbrek için Co⁺² ile 0,075 mM, Cu⁺² ile 34,2 mM, Zn⁺² ile 0,85 mM, Ag⁺² ile 98,9 mM, Cd⁺² ile 128,8 mM, kas için Co⁺² ile 0,099 mM, Cu⁺² ile 29,9 mM, Zn⁺² ile 5,3 mM, Ag⁺² ile 157,5 mM, Cd⁺² ile 146,4 mM, beyin için Co⁺² ile 0,05 mM, Cu⁺² ile 30,0 mM, Zn⁺² ile 0,31 mM, Ag⁺² ile 159 mM, Cd⁺² ile 82,5 mM olarak verilmiştir (Söyüt, 2006; Söyüt ve Beydemir, 2008). Karaca mersini solungaç CA'nın CA'nın bilinen inhibitörlerine oldukça duyarlı olduğu ve metallere literatürlerde yer alan verilerle tutarlılık gösterdiği belirlendi.

Sonuç olarak yapılan çalışmada Karaca Mersini dokularında CA enzimlerinin kinetik özellikleri ve solungacından saflaştırılması ilk kez çalışıldı. Solungaçtan CA'nın sülfanilamid inhibitörü bağlı sepharose 4B afinite kolonundan 66 kat saflaştırılarak izole edildi. CA'nın, fizyolojik substratı CO₂ olduğu ve p-NFA karşı ilgisinin oldukça fazla olduğu ve enzimin bilinen inhibitörleri olan sülfanilamid ile asetazolamid ve bunun yanında bazı metal iyonları ile inhibisyona uğradığı belirlendi.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada Karaca Mersini (*Acipenser gueldenstaedtii*) dokularında Karbonik anhidraz (CA) enzimi karakterize edildi. Balığın kalp, beyin, solungaç homojenatlarında ve eritrosit hemolizatında CA'nın kinetik çalışmaları yapıldı. Balığın solungacından karbonik anhidraz enzimi Sepharose-4B-L tirosin-sülfanilamid kolonuyla saflaştırıldı. Saflaştırılan CA'nın bazı inhibitörler varlığında inhibisyonu çalışılarak, IC₅₀ değerleri belirlendi.

Bu çalışmalara göre; Karaca mersini balığının kalp, beyin, solungaç homojenatlarında ve kan hemolizatındaki protein miktarları Lowry protein tayin yöntemi kullanılarak, kalpte 5,4 mg/mL, beyinde 3,4 mg/mL, kan hemolizatında 15,3 mg/mL ve solungaçta 6,5 mg/mL olarak tespit edildi.

Karaca Mersini balığının dokularından elde edilen homojenatlardaki CA'nın hidrataz aktivitesi kalpte 2,5 EU/mg protein, beyinde 7,4 EU/mg protein, kan hemolizatında 10,8 EU/mg protein ve solungaçta 5,2 EU/mg protein olarak belirlendi. Hidrataz aktivitesi en yüksek kan hemolizatında ve bunu takiben beyin, solungaç ve kalp homojenatlarında gözlemlendiği tespit edildi.

Karaca Mersini Balığının dokularında izole edilen karbonik anhidrazın esterez aktivitesi p-nitrofenil asetat substratı varlığında en yüksek aktiviteyi kalp ve beyin için pH 5,0, kan hemolizati için pH 7,0 ve saflaştırılmış solungaç CA için pH 6,0 olarak belirlendi. Karaca Mersini Balığının dokularında izole edilen karbonik anhidraz aktivitesi p-nitrofenil asetat substratı varlığında en yüksek aktiviteyi tüm dokularda 40 °C' de gösterdiği tespit edildi.

Karaca mersini solungaçlarından CA enzimi hazırlanan Sepharose-4B afinite kolonu ile saflaştırıldı. Saflaştırılan CA'nın 222,2 EU/mg protein spesifik aktivite gösterdiği ve % 20,7 verimle 66 kat saflaştığı tespit edildi. Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA enziminin p-NFA substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri 5,0x10⁶ µM/dak ve K_m değeri 2,5 mM olarak belirlendi. CA'nın katalitik sabiti olan k_{cat} 134408,6 s⁻¹ ve özgülük sabiti k_{cat}/ K_M 53763,4 mM⁻¹s⁻¹ olarak belirlendi. Ayrıca Hill eğrisinden elde edilen Hill sabitinin (*h*) değerinin 1'den küçük çıkması, CA enziminin negatif kooperativiteye sahip olduğunu gösterir.

SDS-PAG Elektrofrezisi sonucunda Karaca Mersini solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidrazın altbirim molekül kütlesi yaklaşık olarak 20 kDa olarak bulundu.

CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine CA'nın bilinen inhibitörlerinden asetazolamid, sülfanilamid ve bazı metal tuzlarının farklı konsantrasyonlarının etkisi incelendi. Elde edilen inhibisyon grafiklerine göre asetazolamid için IC_{50} değeri; $0,1\mu M$; sülfonamid için; $13\mu M$ olarak bulundu. Bu değerlerden Karaca mersini solungacından saflaştırılan CA 'ın asetazolamide ilgisinin sülfonamide göre daha fazla olduğu söylenebilir. İnhibitör etkisi incelenen metallere Co^{+2} için IC_{50} $1,7\text{ mM}$, Zn^{+2} için IC_{50} $1,1\text{ mM}$, Ni^{+2} için IC_{50} $1,2\text{ mM}$, Fe^{+2} için IC_{50} $0,2\text{ mM}$, Ba^{+2} için IC_{50} $1,1\text{ mM}$ olarak bulundu. Bu değerlere göre Karaca Mersini solungacından saflaştırılan CA 'ın bu metallere ilgisi büyükten küçüğe $Fe^{+2} > Ba^{+2} = Zn^{+2} > Ni^{+2} > Co^{+2}$ şeklinde sıralanabilir.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada Karaca Mersini Balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) dokularında karbonik anhidraz (CA) enzimi karakterize edilmiştir. Balığın kalp, beyin, solungaç homojenatlarında ve eritrosit hemolizatında karbonik anhidrazın kinetiği incelenmiştir. Balık solungacından karbonik anhidraz enzimi Sepharose-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonuyla saflaştırılmıştır.

Balığın çalışılan dokularındaki CA Sepharose-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonuyla saflaştırılarak, saf CA enzimlerin kinetikleri ayrıntılı çalışılabilir ve dokulardaki CA aktiviteleri kıyaslanabilirdi.

Bu çalışmada CA'nın molekül kütlesi elektroforetik olarak belirlemiştir. Molekül kütlesi jel filtrasyonu kullanılarak tayin edilebilirdi.

Saflaştırılan CA'ların hangi CA izoenzimi olduğunu belirlemek için farklı tamponlar kullanılarak elüatlar toplanabilir ve böylece Karaca Mersini balığının dokularından saflaştırılan CA'nın izoenzimi sayısı ve türleri belirlenebilirdi.

Karaca Mersininden izole edilecek CA'lar sülfonamid, asetazolamid ve imidazol türevleri veya farklı inhibitörler varlığında aktiviteleri incelenebilir. Böylece Karaca mersini CA'nın farklı inhibitörlere olan ilgileri kıyaslanabilirdi.

7. KAYNAKLAR

- Akbulut B, Ustaoglu S, Zengin M ve Aksungur M. 2007. Türkiye’de Mersin Balığı Avcılığı ve Balıkçılığının Tarihi Gelişimi. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü. Yunus Araştırma Bülteni, 7(3): 6-9.
- Altınmeşe N. 2011. Porsuk barajında bulunan ‘*Carassius gibelio*’ türü balıktan karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve izolasyonu. Yüksek Lisans tezi. Dumlupınar Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kütahya.
- Armstrong J McD, Myers Dirck V, Verpoorte JA and Edsall JT. 1966. Purification and Properties of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases. Braz. J. Plant Physiol., 17. 1.
- Arslan O, Nalbantoğlu B, Demir N, Özdemir H, Küfreliloğlu İ. 1996. New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography. Turk J Medical Science., 26(2): 163-166.
- Badger MR and Price GD. 1994. The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis. Annual Reviews in Plant Physiology and Molecular Biology, 45: 369-392.
- Beydemir Ş, Çiftçi M, Özmen İ, Okuroğlu ME, Özdemir H, Küfrevioğlu Öİ. 2000. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. Pharmacol. Res., 42, 187-19.
- Bülbül M, Hisar O, Beydemir Ş, Çiftçi M and Küfrevioğlu Öİ. 2003. The in vitro and in vivo inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity, J. Enzym Inhib. Med. Ch., 18(4), 371-375.
- Chegwidden WR, Carter NND. 2000. The Carbonic Anhydrases: New Horizons. Eric, PA 16509 USA. 622.
- Chegwidden WR, Dodgson SJ, Spencer IM. 2000. In the Carbonic Anhydrase New Horizons, Birkhauser Verlag, Basel, 14-28.
- Chegwidden WR, Dodgson SJ, Spencer IM. 2000. In the Carbonic Anhydrase New Horizons, Birkhauser Verlag, Basel, 343-363.
- Çağiltay F. 2011. İç Su Balıkları Yetiştiriciliği. Nobel Akademik Yayıncılık. İstanbul, 290.
- Çebi A, Kaya Y, Demir H. 2011. Determination of erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in patients with coronary artery disease. Gulhane Med J., 53(4): 254-257.
- Çelikkale M, Memiş D, Ercan E, Çağiltay F. 2005. Growth performance of juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzenburg, 1833) at two stocking densities in net cages. J. Appl. Ichthyol., 21, 14–18.
- Esposito S, Mangano G, Melchiorri A, Miele G, Pisanti O. 2001. Testing standard and degenerate big bang nucleosynthesis with Boomerang and Maxima-1. Physical Review D., 63, 4.
- Falkbring SO, Göthe PO, Nyman L ve Parath J. 1972. Affinity Chromatography of carbonic anhydrase. FEBS Lett., 24(2):229-235.

- Ford T, Goodman R, Meltzer H. 2003. The British Child and Adolescent Mental Health Survey 1999: The prevalence of DSM-IV disorders. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 42, 1203-1211.
- Franchi M, Vullo D, Lallori E, Pastorek J, Russo A, Scozzafava A, Pastorekova S, Supuran CT. 2003. Carbonic Anhydrase Inhibitors, Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane Cancer-associated Isozyme IX with Lipophilic Sulfonamides. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, 18(4):333-8.
- Gilmour KM. 2010. Perspectives on carbonic anhydrase, *Comparative Biochemistry and Physiology. Molecular & Integrative Physiology.*, 157,193–197.
- Götz R, Gnann A, and Zimmerman FK. 1999. Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast* 15: 855–864.
- Gulcin I, Beydemir S and Buyukokuroglu M. 2004. In vitro and in vivo effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities. *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 613-616.
- Hall GE and Schraer R. 1983. Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81-92.
- Hilvo M, Tolvanen M, Clark A, Shen B, Shah GN, Waheed A, Halmi P, Hanninen M, Hamalainen JM, Vihinen M, Sly WS, Parkkila S. 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem J.*, 15;392.
- Hisar O, Hisar Ş, Yanık T, Aras M. 2003. Balık Kan Karbondioksitinin Taşınması ve Atılmasında Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Fonksiyonları. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 34 (4), 387-393.
- Hochleithner M. 1996. *Störe. Verbreitung, Lebensweise, Aquakultur. Österreichischer Agrarverlag, Klosterneuburg*, 202.
- Işık S. 2008. Maya Karbonik Anhidrazının Ekspresyonu, Saflaştırılması, Elektroforetik ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Balıkesir Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Balıkesir.
- Iverson TM, Alber BE, Kisker C, Ferry JG, and Rees DC. 2000. 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.
- Jebanathirajah J. and Coleman J.R. 1998. Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*. *Planta.*, 204, 177-182.
- Karahalil F. 2009. Mersin Balığı Eritrositlerinden Elde Edilen Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Doktora tezi. KTÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon.
- Kaya Y, Çebi A, Demir H. 2011. Determination of erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in patients with coronary artery disease. *Gulhane Med J.*, 254-257.
- Keilin D and Mann T. 1940. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.*, 34:1163.

- Kisker C, Schindelin H, Alber BE, Ferry JG and Rees DC. 1996. A left-hand beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *EMBO J.*, 15(10): 2323–2330.
- Kolaylı S, Karahalil F, Sahin H, Dincer B and Supuran C. 2011. Characterization and inhibition studies of an α carbonic anhydrase from the endangered sturgeon species *Acipenser gueldenstaedti*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 26(6): 895-900.
- Leppilampi M. 2006. Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX. *Acta Univ. Oul.*, D 868.
- Lindskog S, Silverman DW. 2000. In the carbonic anhydrase. *New Horizons*, Basel, 175-196.
- Lindskog S. 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther.*, 74, 1-20.
- Lowe N, Edwards YH, Edwards M, Butterworth PH. 1991. Physical Mapping of the Human Carbonic Anhydrase Gene Cluster on Chromosome. 882.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265
- Maren TH. 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibition. *J Phar Exp Ther.*, 130: 26-29.
- Maren TH. 1967. Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 47: 595.
- Meldrum N and Roughton F. 1933. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J Physiol.*, 80(2): 113–142.
- Meltzer DE. 2003. *The Chemical Reactions of Living Cells*. Elsevier Academic Press, USA, 678.
- Moroney JV, Bartlett SG, Samuelsson G. 2001. Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ.*, 24: 141–153.
- Nelson D, Cox M. 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Palme Yayıncılık. Ankara.
- Parkkila S. 2000. An overview of the distribution and function of carbonic anhydrase in mammals. *EXS*, (90):79-93.
- Polska E, Kircher K, Ehrlich P, Vecsei PV, Schmetterer L. 2001. RI in central retinal artery as assessed by CDI does not correspond to retinal vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 280(4): H1442-7.
- Pullan LM, Noltmann EA. 1985. Purification and properties of pig muscle carbonic anhydrase III. *Biochim Biophys Acta.*, 17;839(2):147-54.
- Pushkas M, Inui K, Zahan H, Yukawa A. 2000. Periplasmic α -type carbonic anhydrase from *Rhodospseudomonas palustris* is essential for bicarbonate uptake. *Microbiology*, 146:2957–2966.
- Roughton FJW, Booth VH. 1946. The manometric determination of the activity of carbonic anhydrase under varied conditions USA. *Biochem J.*, 40(2): 309–319.

- Schcer A, Dietsch P. 1984. A 54.000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes in *Biology and Chemistry of the Carbonic anhydrase*. Annals, New York Acad. Sci., 429, 241.
- Schwartz G, Kittelberger A, Watkins R, O'Reilly M. 2002. Carbonic anhydrase XII mRNA encodes a hydratase that is differentially expressed along the rabbit nephron. *American journal of physiology. Renal physiology*. 284(2):F 399-410.
- Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. 2006. Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert Opin. Ther. Patents*, 16:12 ,1627-1664.
- Sharma A, Bhattacharya A, Singh S. 2009. Purification and characterization of an extracellular carbonicanhydrase from *Pseudomonas fragi*. Elsevier Academic Press, 44:1.
- Sinan S, Yuan X, Russell R. 2011. The Azoarcus Group I Intron Ribozyme Misfolds and Is Accelerated for Refolding by ATP-dependent RNA Chaperone Proteins. *J Biol Chem.*, 286:37304–37312.
- Smith KS and Ferry JG. 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases, Reviews, *FEMS Microbiology*, 24:335-366.
- Smith KS and Ferry JG. 1999. A Plant-Type (β -Class) Carbonic Anhydrase in the Thermophilic Methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of Bacteriology*, 181. 20: 6247-6253.
- Song B, Park H, François M. 2007. Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environmental Microbiology.*, 9(2), 403–413.
- Sowden J, Edwards M, Morrison K, Butterworth PHW, Edwards YH.1992. Erythroid Expression and DNAase-Hypersensitive Sites of the Carbonic Anhydrase 1 Gene. Elsevier Academic Press., 67–74.
- Söyüt H, Beydemir Ş, Ceyhun B. 2012. Changes in carbonic anhydrase activity and gene expression of Hsp70 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle after exposure to some metals. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36(5): 499-508.
- Söyüt H. 2006. Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum.
- Söyüt H. 2006. Gökkuşığı Alabalık Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum.
- Stams T, Chen Y, Boriack-Sjodin PA, Hurt JD, Liao J, May JA, Dean T, Laipis P, Silverman DN. and Christianson DW. 1988. Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide. Molecular basis o isozyme-drug discrimination. *Protein science*, 7: 556-563.
- Steffens W.1994. Internationales Symposium über Störe. Fischer und Teichwirt, 129-131.
- Supuran CT and Scozzafava A. 2007. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Medicinal Research Reviews*, 23: 146-189.

- Supuran CT, Scozzafava A and Casini A. 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. *Medical Research Reviews*, 23: 146-189.
- Supuran CT, Scozzafava A, Conway J. 2004. Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2-20.
- Supuran CT, Scozzafava A, Conway J. 2004. Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators. CRS Press LLC Florida, USA. 2-20.
- Supuran CT, Scozzafava A. 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 1: 61-97.
- Supuran CT. 2003. Indisulam: an anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 12 (2): 283-287.
- Supuran CT. 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews*, 7: 1-14.
- Supuran CT. 2008. Carbonic Anhydrases; novel therapeutic applications for inhibitors
- Tripp B, Smith K and Ferry J. 2001. Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme. *The Journal of Biol. Chem.*, 10:1074.
- URL-1. 2012. www.wikipedia.org (10 Aralık 2012, 13:00).
- URL-2. 2012. www.sagliksiz.net (10 Aralık 2012, 14:00).
- URL-3. 2012. <http://www.cancer.gov/Templates/drugdictionary> (15 Aralık 2012, 14:30).
- URL-4. 2012. <http://www.wrongdiagnosis.com/medical/benzolamide.htm> (16 Aralık 2012, 09:30).
- URL-5. 2012. www.wikipedia.org (16 Aralık 2012, 10:30).
- URL-6. 2012. www.wikipedia.org (16 Aralık 2012, 11:30).
- Ustaoğlu S. 2005. Untersuchungen zur Haltung- und Ernährungsoptimierung von Sterlets (*Acipenser ruthenus*)–unter besonderer Berücksichtigung der Haltungstemperatur und Nutzung alternativer Proteinquellen. 155.
- Verpoorte J, Mehta S and Edsall J. 1967. Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. *The Journal of Biol. Chem.*, 242:18, 4221-4229.
- Vullo D, Franchib M, Gallorib E, Pastorekc J. 2003. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1005–100.
- Wilbur K. and Anderson N. 1948. Elektrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 176: 147-154.
- Winum JY, Vullo D, Casini A, Montero JL, Scozzafava A, Supuran CT. 2003. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of transmembrane, tumor-associated isozyme IX, and cytosolic isozymes I and II with aliphatic sulfamates. *J Med Chem.*, 4;46(25):5471-7.
- Wistrand PJ. 1981. The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte. 343.
- Wistrand PJ. 2002. Carbonic anhydrase III in liver and muscle of male rats purification and properties. *Medical Science*. 107(2): 77-88.

ÖZGEÇMİŞ

08.06.1985 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğrenimini İstanbul'da tamamladı. Ortaöğretimini Trabzon' da Akçaabat Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümünü kazandı. 2009 yılında bu bölümden mezun oldu. 2010 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda tezli yüksek lisans programına başlamıştır. Kendisi halen Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.