



**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ II (hCA II)
ENZİMİNİN KLONLANMASI, *E. coli*'de EKSPRESYONU,
KARAKTERİZASYONU, YÖNLENDİRİLMİŞ
MUTAGENEZ İLE MUTANT hCA II GENLERİNİN
ELDESİ VE MUTANT PROTEİNLERİN
İNHİBİTÖRLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Deryanur KILIÇ

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

2017

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ II (hCA II) ENZİMİNİN
KLONLANMASI, *E. coli*'de EKSPRESYONU,
KARAKTERİZASYONU, YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ İLE
MUTANT hCA II GENLERİNİN ELDESİ VE MUTANT
PROTEİNLERİN İNHİBİTÖRLERE KARŞI İLGİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Deryanur KILIÇ

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ II (hCA II) ENZİMİNİN KLONLANMASI, *E. coli* 'de EKSPRESYONU, KARAKTERİZASYONU, YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ İLE MUTANT hCA II GENLERİNİN ELDESİ VE MUTANT PROTEİNLERİN İNHİBİTÖRLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU danışmanlığında, Deryanur KILIÇ tarafından hazırlanan bu çalışma, 26/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI

İmza :

Üye : Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 08.06.2017 tarih ve 23 / 26 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projesi ve ÖYP kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2012/155

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ II ENZİMİNİN (hCA II) KLONLANMASI, *E. coli*'de EKSPRESYONU, KARAKTERİZASYONU, YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ İLE MUTANT hCA II GENLERİNİN ELDESİ VE MUTANT PROTEİNLERİN İNHİBİTÖRLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Deryanur KILIÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

İnsan karbonik anhidraz II (hCA II) enzimi ilk kez pET SUMO ekspresyon vektörü kullanılarak *E. coli*'de eksprese edildi ve rekombinant enzim, nikel (Ni^{+2}) afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. hCA II'nin hidrofobik kısmındaki Trp 209 aminoasiti, bölge yönelimli mutagenез yöntemi ile dört farklı amino asit (Val, Leu, Ile ve Pro) ile yer değiştirdi. hCA II varyantlarının p-nitrofenilasetat esteraz aktivitesi, hidrofobiklik ve rezüdü hacmi ile ilişkilidir, bu bilgi Trp 209 rezidüsünün hidrofobikliğinin katalizleme için önem taşıdığını düşündürmektedir. Bu rezidü önemli bir rezidü olarak tahmin edildi ve bu rezidünün hesaplamalı mutagenезi gerçekleştirildi. Bu öngörü, hCAII mutantlarını (W209V, W209L, W209I, W209P) deneysel olarak üreterek ve bazı benzenesülfonamidlere karşı ilgilerini belirleyerek teyit edildi. Dört mutant enzim doğal tip enzimle kıyaslandığında, benzenesülfonamidlere karşı daha az ilgi gösterdi. W209V mutantı, doğal tip enzim ile benzer spesifik aktivite değerlerine sahipken; W209P, W209L ve W209I mutantları doğal tip enzime kıyasla p-nitrofenil esteraz aktivitesinde sırasıyla %60, %30 ve %20 oranında daha az aktif olduğu belirlendi. Enzimin aktif bölgesinin hidrofobik kısmındaki bu mutasyonlar, çözünmeyen protein agregatlarının oluşumuna neden olduğundan, *E. coli*'de hCA II'nin protein ekspresyonunu azalttı. Bu çalışmadaki bulgularımız hCA II'deki Trp 209'un katlanma sürecinde önemli rol oynadığını ve valin rezidüsünün bu izoenzimin aktif boşluğundaki hidrofobik bölge ile çok uyumlu olduğunu gösterdi. Bu mutant proteinler, gelecekte enzimin yapısal fonksiyonlarının ve ilaç temelli çalışmalarının anlaşılmasına yol açacaktır.

2017, 129 sayfa

Anahtar Kelimeler: Hesaplamalı Mutagenез, Enzim İnhibisyonu, İnsan Karbonik Anhidraz II, Bölge Yönelimli Mutagenез, Sülfonamid

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

CLONING, EXPRESSION IN *E. coli*, CHARACTERIZATION OF HUMAN CARBONIC ANHYDRASE II (hCA II) ENZYME, PRODUCTION OF MUTANT hCA II GENES BY SITE DIRECTED MUTAGENESIS AND INVESTIGATION OF AFFINITY OF MUTANT PROTEINS TO INHIBITORS

Deryanur KILIÇ

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Discipline of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU

Human carbonic anhydrase II (hCA II) enzyme was firstly expressed using pET SUMO expression vector in *E. coli* and the recombinant enzyme was purified using nickel (Ni^{2+}) affinity chromatography. The substitutions of Trp 209 with four amino acid (Val, Leu, Ile, and Pro) in the hydrophobic pocket of hCA II were made using site-directed mutagenesis. The p-nitrophenyl esterase activity of hCA II variants correlate with the hydrophobicity and size of residue, suggesting that the hydrophobic character of this residue is important for catalysis. The Trp 209 was forecast as an important residue and was exposed to computational mutagenesis. This forecast was confirmed experimentally by producing hCA II mutants (W209V, W209L, W209I, W209P) and determining the resulting affinities towards some benzenesulfonamides. Affinity for benzenesulfonamides was reduced in the four mutants compared to wild type (wt). The W209V mutant showed similar specific activity values with the wt enzyme, whereas the W209P, W209L and W209I mutants were less active around 60%, 30%, 20% in p-nitrophenyl esterase activity compared to the wt, respectively. These mutations in the hydrophobic pocket of the enzyme active site decreased the protein expression of hCA II in *E. coli*, causing the formation of insoluble protein aggregates in many cases. Our findings demonstrated that the Trp 209 in hCA II plays important role the folding process and the valine residues are very compatible for hydrophobic region in active cavity of this isoenzyme. These mutant proteins will lead to the understanding of structural functions of enzyme and drug-based studies in the future.

2017, 129 pages

Keywords: Computational Mutagenesis, Enzyme Inhibitor, Human Carbonic Anhydrase II, Site Directed Mutagenesis, Sulfonamide

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapılmıştır.

Çalışmalarım süresince görüş ve bilgi birikimlerinden yararlandığım değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a ve Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen, görüş ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam, Sayın Dr. Marcos SOTOMAYOR'a ve sürekli yanımda olan, her konuda yardımlarını gördüğüm ve manevi desteklerini hissettiğim çok kıymetli dostlarım, Sayın Yrd. Doç. Dr. Yağmur ÜNVER'e ve Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ'a ve Sayın Avinash JAIGANESH, derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca Biyokimya, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ohio State University Biochemistry Department Araştırma Laboratuvarlarında çalışan arkadaşlarıma her türlü yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi, manevi desteklerini, ilgilerini ve sabırlarını esirgemeyen çok kıymetli anneme, babama, kardeşlerime, eşime ve oğluma teşekkür ederim.

Ayrıca doktora eğitimim boyunca beni destekleyen Öğretim Üyesi Yetiştirme Programına (ÖYP) ve bu çalışmayı 2012/155 no'lu proje ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne teşekkür ederim.

Deryanur KILIÇ

Mayıs, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi	1
1.2. Karbonik Anhidraz II İzoenzimi (Yapısı, Katalitik Mekanizması, İnhibitörleri ve İnsan Pankreasındaki Fizyolojik Rolü).....	6
1.3. Rekombinant DNA Teknolojisi.....	9
1.4. Protein Mühendisliği	16
1.5. Mutageniz Çalışmalar	18
1.5.1. Oransal dizayn	18
1.5.1.a. Bölge yönelimli mutageniz	18
1.5.2. Yarı oransal dizayn.....	19
1.5.2.a. Bölge doygun mutageniz	19
1.5.3. Yönelimli yenilik.....	20
1.6. Hesaplamalı Mutageniz	22
2. KAYNAK ÖZETLERİ	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	40
3.1. Primerlerin Hazırlanması	40
3.2. hCA II Genine Ait cDNA Sekansının Çoğaltılması.....	40
3.3. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi.....	41
3.3.1. Ligasyon reaksiyonu.....	41
3.4. Rekombinant Vektörün Kompetent One Shot® Mach1™-T1R <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyonu	41
3.5. Doğru Transformant Seçimi.....	42
3.5.1. Koloni PCR	42

3.6. Plazmit DNA İzolasyonu.....	43
3.7. PCR Ürününün Ekspresyonu.....	43
3.7.1. BL21(DE3) bakterisine transformasyon basamakları	43
3.7.2. Deneme (Pilot) ve büyük ölçekli ekspresyon.....	44
3.8. Protein Tayini	45
3.8.1. Kalitatif protein tayini	45
3.8.2. Bradford yöntemi ile protein tayini	45
3.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektroföresi ve Western Blot Tekniğinin Uygulanması	46
3.10. Karbonik Anhidraz Aktivite Tayini	48
3.11. Doğal Şartlar Altında Kolondan Rekombinant Füzyon Proteinin Saflaştırılması	49
3.11.1. Probond kolonun hazırlanması.....	49
3.11.2. Hücre lizatı hazırlama ve kolona yükleme	50
3.11.2.a Hücre lizatı hazırlama.....	50
3.11.2.b Kolona yükleme	50
3.12. SUMO Füzyon Proteinin Sumo Proteaz ile Kesimi	51
3.13. Kinetik Çalışmalar.....	52
3.13.1. Rekombinant hCA II izoenzimi için optimum pH belirlemesi	52
3.13.2. Rekombinant hCA II izoenzimi için optimum sıcaklık belirlemesi.....	52
3.13.3. Rekombinant hCA II izoenzimi için optimum iyonik şiddeti belirlenmesi ...	52
3.13.4. p-Nitrofenilasetat substratı için K_M , V_{max} ve k_{cat} değerlerinin belirlenmesi	52
3.14. Hesaplamalı Mutagenез Çalışması	53
3.15. Bölge Yönelimli Mutagenез Çalışması.....	54
3.16. Mutajenik Primerlerin Tasarlanması	54
3.17. Mutant DNA Sentez Reaksiyonu	55
3.18. Amplifikasyon Ürünlerinin Dpn I Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	55
3.19. XL1- Blue Süperkompetant Hücrelere Aktarım	56
3.20. Dizi Analizi ile Mutasyonların Doğrulanması	56
3.21. Rekombinant hCA II İzoenzimi Üzerine Yapılan İnhibisyon Çalışmaları	57
3.22. Çalışmada Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	62

4.1. hCA II Gen Bölgesinin ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi	62
4.2. hCA II Enzimine Ait Aminoasit Dizisi	63
4.3. hCA II Genine Ait Primerler	63
4.4. hCA II Geninin PCR Sonucu	64
4.5. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi ve One Shot® Mach1™-T1R <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyon Sonuçları	65
4.6. Koloni PCR Sonuçları	65
4.7. İzole edilen Plazmit DNA	66
4.8. SUMO Vektörüne Aktarılan Genin DNA Dizi Analizi	67
4.9. Deneme (Pilot) Ekspresyon	69
4.10. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik	72
4.11. SUMO hCA II Füzyon Proteinin SUMO Proteazla Kesim Sonuçları	72
4.12. Rekombinant hCA II İzoenziminin Optimum pH Çalışmasının Sonuçları	74
4.12.1. Tris-SO ₄ tamponunda optimum pH çalışma sonuçları	74
4.12.2. KH ₂ PO ₄ tamponunda optimum pH çalışması	75
4.13. Rekombinant hCA II İzoenziminin Optimum İyonik Şiddet Çalışmasının Sonuçları	75
4.14. Rekombinant hCA II İzoenziminin Optimum Sıcaklık Çalışmasının Sonuçları	76
4.15. Doğal Tip ve Mutant (W209I, TW209L, W209P ve W209V) hCA II Enzimlerinin Spesifik Aktivite Değerleri	77
4.16. Doğal tip ve Mutant (W209I, TW209L, W209P ve W209V) hCA II Enzimlerinin K _M , V _{max} ve k _{cat} Değerleri	78
4.17. Doğal Tip ve Mutant (W209V, W209L, W209I ve W209P) hCA II Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bazı Benzenesülfonamid Türevlerinin İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi	81
4.18. Hesaplamalı Mutagenез Sonuçları	92
4.18.1. Mutant hCA II'lerin hazırlanması	95
4.19. Bölge Yönelimli Mutagenез Sonuçları	109
4.19.1. Mutant DNA'ların eldesi	110
4.19.2. Amplifikasyon ürünlerinin Dpn I restriksiyon enzimi ile kesimi	110
4.19.3. XL1- Blue Süperkompetant hücrelere aktarım sonucu	111

4.19.4. Mutasyonların dizi analizi sonuçları	112
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	118
KAYNAKLAR	123
ÖZGEÇMİŞ	130



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	: Bovine (sığır) serum albümin
cDNA	: Komplementer DNA
CA	: Karbonik anhidraz enzimi
CAF	: Karbonik anhidraz geninin forward primeri
CAR	: Karbonik anhidraz geninin revers primeri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosid trifosfat
EtBr	: Etidyum Bromür
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
E	: Enzim
E.C.	: Enzim komisyon numarası
E.Ü.	: Enzim ünitesi
hCA II	: İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	: İnhibitör
IPTG	: İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
IC ₅₀	: Maksimum hızı yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu
kb	: Kilobaz
K _M	: Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
K _i	: Enzimin inhibitöre ilgisini gösteren sabit
LB	: Luria Bertani
mRNA	: ‘Messenger’ (haberci) ribonükleik asit
NCBI	: ‘National Center for Biotechnology Information’ - Biyoteknoloji Bilgi Ulusal Merkezi
ORF	: ‘Open reading frame’ Translasyona uğrayan gen bölgesi
OD	: Optik dansite
PAGE	: Poli akrilamid jel elektroforezi
PBS	: ‘Phosphate buffered saline’ (fosfatla tamponlanmış tuz)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDB	: Protein data bankası

RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SUMO	: Small ubiquitin-like modifier (küçük ubiquitin benzeri değıştirici)
SUMOF	: pET SUMO vektörünün forward primeri
SUMOR	: pET SUMO vektörünün revers primeri
TAPS	: N-[Tris(hidrosimetil)metil]-3-aminopropansülfonik asit
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TBE	: Tris-Borat-EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
T _m	: Ayrılma sıcaklığı
UV	: Ultraviyole
V _{max}	: Maksimum hız
λ	: Dalga boyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İnsan karbonik anhidraz II'nin özellikleri; C terminali, N terminali, Zn kofaktörü, aktif bölge rezidüleri.....	3
Şekil 1.2. İnsan karbonik anhidraz II'nin aktif bölge rezidüleri	4
Şekil 1.3. İnsan pankreasındaki hCA II'nin fizyolojik rolü.....	9
Şekil 1.4. TA klonlama metotunun şematik gösterimi	10
Şekil 1.5. pET SUMO vektörü.....	14
Şekil 1.6. Rekombinant vektörün eldesi	15
Şekil 1.7. pET SUMO+hCA II rekombinant vektör	16
Şekil 1.8. Protein mühendisliği için doğru metot seçimi	18
Şekil 1.9. Rastgele mutasyon aşamaları.....	21
Şekil 1.10. SAS VE SES terimlerinin açıklanması.....	24
Şekil 3.1. p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması	49
Şekil 3.2. Bölge yönelimli mutagenез yöntemi	54
Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 1,2 nolu kuyular hCA II geni, 8 nolu kuyu markır	64
Şekil 4.2. LB-Agar fotoğrafı <i>E.coli</i> (One Shot® Mach1™-T1R)	65
Şekil 4.3. Koloni PCR agaroz jel elektroforezi fotoğrafı.....	66
Şekil 4.4. İzole edilen plazmitin agaroz jel elektroforezi fotoğrafı; 1 nolu kuyu markır, 2,3 nolu kuyu plazmit.....	67
Şekil 4.5. Blastlama sonucu	68
Şekil 4.6. Pilot ekspresyon SDS PAGE sonucu.....	70
Şekil 4.7. Saflaştırılan SUMO Füzyon hCA II SDS PAGE fotoğrafı	71
Şekil 4.8. Saflaştırılan SUMO Füzyon hCA II western blot sonucu	72
Şekil 4.9. Bradford metotunda kullanılan standart grafik.....	72
Şekil 4.10. SUMO proteaz ile kesilen füzyon proteinin SDS PAGE fotoğrafı	73
Şekil 4.11. Saflaştırılan SUMO hCA II füzyonu ve hCA II için log M_K/R_f grafiği	74
Şekil 4.12. 50 mM KH_2PO_4 ve 50 mM Tris- SO_4 tampon çözeltileri kullanılarak hCA II izoenzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği	75

Şekil 4.13. hCA II izoenzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesi için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği	76
Şekil 4.14. Rekombinant hCA II izoenziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	77
Şekil 4.15. Doğal tip hCA II izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	78
Şekil 4.16. Mutant (W209I) hCA II izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	79
Şekil 4.17. Mutant (W209L) hCA II izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	80
Şekil 4.18. Mutant (W209P) hCA II izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	80
Şekil 4.19. Mutant (W209V) hCA II izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	81
Şekil 4.20. Çalışmada kullanılan inhibitörler; 3,4-diamino-benzenesülfonamid (1), 3-Amino-4-klorobenzenesülfonamid (2), 5-Amino-2-metilbenzensülfonamid (3) ve AZA (asetazolamid) (4)	82
Şekil 4.21. Doğal tip hCA II izoenziminin aktivitesi için % aktivite-[3,4-diamino-benzensülfonamid (μM)] grafiği	82
Şekil 4.22. Mutant W209P hCA II enziminin % aktivite-[3,4-diamino-benzensülfonamid (μM)] grafiği	83
Şekil 4.23. Mutant W209L hCA II enziminin % aktivite-[3,4-diamino-benzensülfonamid (μM)] grafiği	83
Şekil 4.24. Mutant W209I hCA II enziminin % aktivite-[3,4-diamino-benzensülfonamid (μM)] grafiği	84
Şekil 4.25. Mutant W209V hCA II enziminin % aktivite-[3,4-diamino-benzensülfonamid (μM)] grafiği	84
Şekil 4.26. Doğal tip hCA II enziminin % aktivite-[3-Amino-4-klorobenzenesülfonamid (μM)] grafiği	85
Şekil 4.27. Mutant W209P hCA II enziminin % aktivite-[3-Amino-4-klorobenzenesülfonamid (μM)] grafiği	85

Şekil 4.28. Mutant W209L hCA II enziminin % aktivite-[3-Amino-4- klorobenzensülfonamid (μM)] grafiği	86
Şekil 4.29. Mutant W209I hCA II enziminin % aktivite-[3-Amino-4- klorobenzensülfonamid (μM)] grafiği	86
Şekil 4.30. Mutant W209V hCA II enziminin % aktivite-[3-Amino-4- klorobenzensülfonamid (μM)] grafiği	87
Şekil 4.31. Doğal tip hCA II enziminin % aktivite-[5-Amino-2- metilbensensülfonamid (μM)] grafiği.....	87
Şekil 4.32. Mutant W209P hCA II enziminin % aktivite-[5-Amino-2- metilbensensülfonamid (μM)] grafiği.....	88
Şekil 4.33. Mutant W209L hCA II enziminin % aktivite-[5-Amino-2- metilbensensülfonamid (μM)] grafiği.....	88
Şekil 4.34. Mutant W209I hCA II enziminin % aktivite-[5-Amino-2- metilbensensülfonamid (μM)] grafiği.....	89
Şekil 4.35. Mutant W209V hCA II enziminin % aktivite-[5-Amino-2- metilbensensülfonamid (μM)] grafiği.....	89
Şekil 4.36. Doğal tip hCA II enziminin % aktivite-[AZA (μM)] grafiği	90
Şekil 4.37. Mutant W209P hCA II enziminin % aktivite-[AZA (mM)] grafiği	90
Şekil 4.38. Mutant W209L hCA II enziminin % aktivite-[AZA (μM)] grafiği.....	91
Şekil 4.39. Mutant W209I hCA II enziminin % aktivite-[AZA (μM)] grafiği.....	91
Şekil 4.40. Mutant W209V hCA II enziminin % aktivite-[AZA (μM)] grafiği	92
Şekil 4.41. Hazırlanmış hCAII proteinin genel yapısı	93
Şekil 4.42. hCA II proteinin Ramachandran blatı.....	94
Şekil 4.43. Hazırlanmış hCAII proteinin katalitik bölgesi	94
Şekil 4.44. Trp 209'un gösterimi	96
Şekil 4.45. Trp209Ile 3D gösterimi	96
Şekil 4.46. Trp209Leu 3D gösterimi	97
Şekil 4.47. Trp209Pro 3D gösterimi.....	97
Şekil 4.48. Trp209Val 3D gösterimi.....	98
Şekil 4.49. Trp209 aminoasitinin 2D gösterimi.....	99
Şekil 4.50. Trp209Ile 2D gösterimi	100
Şekil 4.51. Trp209Leu 2D gösterimi	101

Şekil 4.52. Trp209Pro 2D gösterimi.....	102
Şekil 4.53. Trp209Val 2D gösterimi.....	103
Şekil 4.54. W209I mutant protein zinciri ile doğal tip zincirin üstüste çakışma pozu	104
Şekil 4.55. W209L mutant protein zinciri ile doğal tip zincirin üstüste çakışma pozu	105
Şekil 4.56. W209P mutant protein zinciri ile doğal tip zincirin üstüste çakışma pozu	105
Şekil 4.57. W209V mutant protein zinciri ile doğal tip zincirin üstüste çakışma pozu	106
Şekil 4.58. W209I mutant proteinin doğal tip ile aktif bölge rezidülerinin üstüste çakışması	106
Şekil 4.59. W209L mutant proteinin doğal tip ile aktif bölge rezidülerinin üstüste çakışması	107
Şekil 4.60. W209P mutant proteinin doğal tip ile aktif bölge rezidülerinin üstüste çakışması	107
Şekil 4.61. W209V mutant proteinin doğal tip ile aktif bölge rezidülerinin üstüste çakışması	108
Şekil 4.62. LB-Agar fotoğrafı XL1-blue süperkompetant.....	111
Şekil 4.63. Doğal tip hCA II'nin dizi analiz sonucu.....	113
Şekil 4.64. Trp209Val hCA II'nin dizi analiz sonucu	113
Şekil 4.65. Trp209Leu hCA II'nin dizi analiz sonucu.....	114
Şekil 4.66. Trp209Ile hCA II'nin dizi analiz sonucu.....	114
Şekil 4.67. Trp209Pro hCA II'nin dizi analiz sonucu	115
Şekil 4.68. Elde edilen mutant plazmitlerin sekans sonuçlarının hizalanması	116
Şekil 4.69. Bazı memeli CA'ların sekanslarının hizalanması.....	117

ÇİZELGELER DİZİNİ

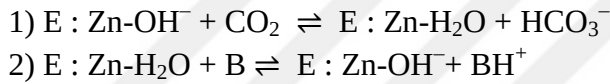
Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	2
Çizelge 1.2. Farklı moleküler mühendisliklerin avantajları ve dezavantajları	17
Çizelge 3.1. hCA II geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon karışımı ve PCR parametreleri.....	40
Çizelge 3.2. pET SUMO vektör: hCA II ligasyon reaksiyon şartları	41
Çizelge 3.3. Doğru transformant seçimi için transformantlardan yapılan koloni PCR da kullanılan primerler ve reaksiyon şartları	42
Çizelge 3.4. SUMO füzyon proteinin sumo proteaz ile kesimi	51
Çizelge 3.5. Mutant DNA sentez reaksiyonu.....	55
Çizelge 3.6. Bölge Yönelimli Mutageniz için PCR koşulları	55
Çizelge 3.7. DNA dizi analizi için kullanılan primerler	56
Çizelge 4.1. SUMO hCA II füzyon proteini ile hCA II izoenziminin molekül kütle sonuçları	74
Çizelge 4.2. 50 mM Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak hCA II izoenziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan ölçüm sonuçları	75
Çizelge 4.3. 50 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak hCA II izoenziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan ölçüm sonuçları	75
Çizelge 4.4. hCA II izoenziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	76
Çizelge 4.5. hCA II izoenziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan ölçüm sonuçları	77
Çizelge 4.6. Doğal tip ve mutant enzimlerin spesifik aktivite değerleri.....	78
Çizelge 4.7. hCA II izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K _M , V _{max} ve k _{cat} çalışma sonuçları	79
Çizelge 4.8. Mutant (W209I) hCA II izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K _M , V _{max} ve k _{cat} çalışma sonuçları	79
Çizelge 4.9. Mutant (W209L) hCA II izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K _M , V _{max} ve k _{cat} çalışma sonuçları.....	80

Çizelge 4.10. Mutant (W209P) hCA II izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , V_{max} ve k_{cat} çalışma sonuçları.....	81
Çizelge 4.11. Mutant (W209V) hCA II izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , V_{max} ve k_{cat} çalışma sonuçları.....	81
Çizelge 4.12. Doğal tip ve mutant enzimlerin K_i değerleri	92
Çizelge 4.13. Hesaplamalı mutagenез sonuçları	109
Çizelge 4.14. Mutagenез sonucu bağların stabilitesindeki değişimler	109
Çizelge 4.15. Mutagenез primerleri.....	110
Çizelge 4.16. DNA dizi analizi için kullanılan primerler	112

1. GİRİŞ

1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik Anhidraz enzimi (CAs, EC 4.2.1.1) çinko metaloenzim ailesinin üyesidir, CO₂'in H₂O ile reaksiyonunu dönüşümlü olarak katalizler ve bu katalizleme reaksiyonu aşağıdaki reaksiyonda gösterildiği gibi iki adımda gerçekleşir. Birincisi, CO₂ bileşiğinin Zn-OH'a nükleofilik atağı sonucu HCO₃⁻ oluşumudur. İkincisi ise Zn-H₂O'dan bir proton transfer edilerek Zn-OH⁻ oluşumudur, bu proton transferi bir sonraki reaksiyonun katalizlenmesi için gereklidir. Reaksiyondaki B ise iç kaynaklı H⁺ alıcısı olarak görev yapmaktadır.



Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesindeki Zn (II) iyonu, reaksiyonların katalizi için büyük önem arz etmektedir. Bu enzimin X-ray kristalografi çalışmaları sonucunda elde edilen yapılar incelendiğinde, bu metal iyonun aktif bölgenin 15 Å derinliğindeki tabanda, ayrıca üç histidin rezidüsü (His94, His96, His119) ve su molekülü/hidroksit iyonu ile koordine halinde bulunduğu saptanmıştır. Çinko bağlı H₂O ise Thr199'un hidroksil grubu ile hidrojen bağı, Glu106'nın karboksilat grubu ile de köprü halinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu bağlantılar çinkoya bağlı molekülün nükleofilitesini artırır ve böylece molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO₂'e doğru hareket etmek için hazır hale gelir (Scozzafava and Supuran 2001).

Karbonik anhidraz CO₂'in hidratasyonu reaksiyonunun yanısıra, 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 (Çizelge 1.1) (Scozzafava and Supuran 2001).

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

-
- (1) $\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
 - (2) $\text{O}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCOOH}$
 - (3) $\text{HN}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCONH}_2$
 - (4) $\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCH}(\text{OH})_2$
 - (5) $\text{RCOOAr} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCOOH} + \text{ArOH}$
 - (6) $\text{RSO}_3\text{Ar} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{ArOH}$
 - (7) $\text{ArOPO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ArOH} + \text{HPO}_3^{2-}$
 - (8) $\text{ArF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HF} + \text{ArOH}$ (Ar = 2,4-dinitrofenil)
 - (9) $\text{PhCH}_2\text{OCOC}l + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{PhCH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{HCl}$
 - (10) $\text{RSO}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{HCl}$ (R = Me; Ph)
-

Metaloenzim ailesinden olan, CO_2 ile HCO_3^- arasındaki dönüşümlü reaksiyonu katalizleyen karbonik anhidrazların 6 farklı genetik aileye sahip olduğu bilinmektedir. Bu genetik aile şu şekilde sınıflandırılmaktadır; α , β , γ , δ , ζ ve η . α -CA'lar omurgalılarda, alglerde, tek hücrelilerde, bazı bakterilerde ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında bulunurken; β -CA'lar bakterilerde, alglerde, birçok mantar ve birkaç arkeada, tek çenekli ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında baskın olarak bulunur, γ -CA'lar arkealarda, siyanobakterilerde ve bakterilerin birçok tipinde, η -CA'lar tek hücrelilerde iken δ -CA ve ζ -CA'lar ise sadece diatomlarda bulunmaktadır.

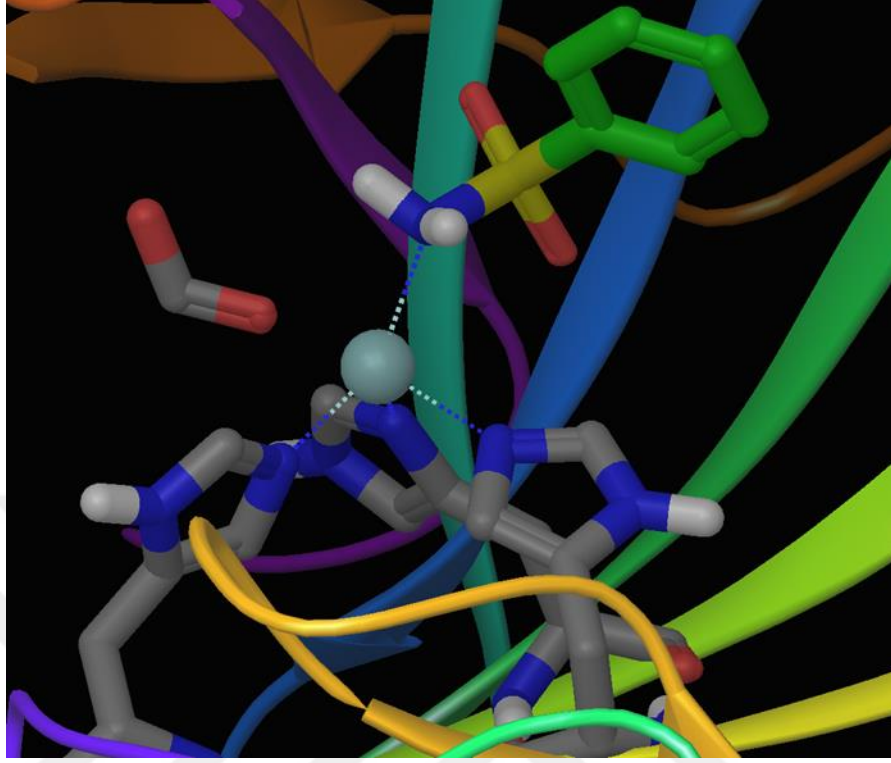
İnsan karbonik anhidraz (hCA) ailesi α izoformuna sahip 16 farklı izoenzim içermektedir. Bu izoenzimlerden CA I, II, III, VII ve XIII olmak üzere beş tanesi sitozolik, CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve XV ise membrana bağlı, CA VA ve VB mitokondriyal, CA VI tükürükte salgılanır ve üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Supuran 2011).



Şekil 1.1. İnsan karbonik anhidraz II'nin özellikleri; C terminali, N terminali, Zn kofaktörü, aktif bölge rezidüleri (PDB; 2WEJ)

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin yapılarında Şekil 1.1'de görüldüğü gibi birçok tersiyer ve sekonder yapılar bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin protein yapısı uzanmış elips şeklinde ve globüler yapıdadır. Elipsin küçük çapı 40 Å iken büyük çapı 56 Å'dur. α -CA'ların hayvan sınıflarının yapısında, bir merkez 10 örgü şekli ve bükülmüş β tabaka'ların çevresinde α -sarmal bulunmaktadır.

Karbonik anhidraz II'nin globüler yapısı; çeşitli pH'lara sahip çözeltilere maruz bırakıldığında, ligand bağlandığında ve çinko kofaktörü uzaklaştırıldığında değişebilmektedir. Bu değişimler aktivitenin düşmesine neden olur (Krishnamurthy *et al.* 2008).



Şekil 1.2. İnsan karbonik anhidraz II'nin aktif bölge rezidüleri (PDB; 2WEJ)

Karbonik anhidrazlar kompleks yapıya sahip aktif bölge içerir. Bu aktif bölge üç fonksiyonel bölgeye sahiptir. Birincisi çinko iyonuna bağlı bir hidroksil iyonu ve üç histidin rezidüsünden (His 94, His96, His 119) oluşurken (Şekil 1.2), ikincisi ligandların ve substratların bağlanması için hidrofobik kısım, son olarak üçüncüsü ise hidrofilik kısımdır. Bu hidrofilik kısımda katalitik bölgenin yenilenmesi gerçekleşmektedir. Ayrıca bu enzimlerin aktif bölgesinin dışında büyük polar bölgeler bulunmaktadır, bu bölgeler ise bikarbonatın özel şoförü olarak düşünülmektedir.

Hidrofobik kısımdaki rezidüler birincil ve ikincil bağlanma bölgelerinden oluşur. Birincil hidrofobik bölge hidrofobik paket olarak adlandırılır ve Val121, Val143, Leu198, Trp209 ve Val207 rezidülerinden oluşur ve bu hidrofobik pakete CO₂ bağlanır böylece hidroliz reaksiyonu gerçekleşir. İkincil bağlanma bölge ise çinko kofaktörüne yakın değildir ve bu bölge karbonik anhidraz inhibitörlerinin bağlanma bölgesi olarak bilinir (Krishnamurthy *et al.* 2008).

Bağlanma oyuğundaki hidrofilik kısım 1988’ de ilk olarak karakterize edilmiştir. Ayrıca bu kısım sekiz rezidüden oluşur. Bu rezidüler Thr199, Thr200, His64, Tyr7, Asn62, Asn67, Gln92 ve Glu106’dır. Thr199 ve His64 rezidüleri direkt katalizlemede rol alırken diğerleri katalizleme reaksiyonunu desteklemede rol alır. Tyr7, Asn62, Asn67, Gln92 ve Glu106 rezidüleri aktif bölgede bulunan su molekülleri ile hidrojen bağ ağı oluştururken Tyr7, Asn62 ve Asn67 rezidüleri Zn^{+2} iyonu ve His64 arasında proton transferinin gerçekleşmesine imkan sağlar. Oluşan hidrojen bağ ağı enzimatik aktiviteye katkıda bulunur ayrıca çinko iyonu ile koordinasyon yapan üç histidin rezidüsünün uygun pozisyon almasına olanak sağlar. Aktif bölge etrafında gömülü bulunan rezidüler aynı zamanda hidrojen bağ ağına dâhil olurlar. Glu117 rezidüsü aktif bölgeden uzakta gömülü olarak bulunurken hidrojen bağ ağı sayesinde His119 ile hidrojen bağ yapmaktadır. Bu durum yüksek pH’da üç negatif yük tarafından stabile olan çinkonun iki pozitif yük kazanmasına olanak sağlar (Eriksson *et al.* 1986). Aktif bölgede hidrojen bağ ağına katılan 9 su molekülü çok önemlidir. Bu ağın oluşumuna imkan sağlayan su molekülleri Thr199’un yöneliminden sorumludur. Bu rezidünün hidroksil grubu çiftleşmemiş elektronuyla hizalanmak amacıyla CO_2 ’e yönelerek bikarbonatın üretimi için nükleofilik atak yapar.

Katalitik döngü içerisinde görev alan His64 rezidüsü protonun uzaklaştırılmasına yardım etmek için proton taşıyıcısı gibi görev yapar ayrıca çinko ile koordine halinde bulunan su molekülünden (water263) uzaklaştırılan bir protonu tampondaki moleküllere transfer eder. Water263 diye anılan çinko ile koordineli olan bu su molekülünün doğasını anlamak önemlidir çünkü bunu anlamak CO_2 ’in hidratasyonunu ve inhibitörün bağlanma mekanizmasını anlamamıza olanak sağlar. Zn^{+2} metalini içeren metaloenzimlerin çoğunda, suyun aktivasyon mekanizması katalizleme olayının gerçekleşmesi ile sağlanır (Crabtree 1994). Karbonik anhidrazlar için suyun aktifleşmesi, su molekülünden proton uzaklaştırılarak hidroksit molekülüne dönüşmesidir. Ayrıca Zn kofaktörünün asıl amacı hem deneysel hemde bilgisayar ortamında incelendiğinde elektrostatik etkileşimler vasıtasıyla suyun pK_a ’sını düşürmek ve hidroksil molekülünün nükleofil özelliğini sürdürmek olduğu belirlenmiştir (Eriksson *et al.* 1986).

1.2. Karbonik Anhidraz II İzoenzimi (Yapısı, Katalitik Mekanizması, İnhibitörleri ve İnsan Pankreasındaki Fizyolojik Rolü)

Karbonik anhidrazın en çok çalışılan formu, hCA II izoenzimidir. Bu izoenzim 29 kDa büyüklüğünde olan bir proteindir ve turnover sayısı 25°C de 10^6 s^{-1} olarak bulunmuştur. Diğer izoenzimlere göre katalitik aktivitesi oldukça yüksektir, doku dağılımı ise geniştir ve pek çok farklı organ ve hücre tipinde bulunur. İnsan doku ve organları incelendiğinde yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir. Osteoporoz, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyonla ilişkili olması bu izoenzimin kemikte, böbrekte ve beyindeki önemini göstermektedir (Lindskog 1997).

CA II geni kromozom 8'de lokalize olup ve 17 kb uzunluğuna sahiptir. hCA II geninin protein kodlama bölgesi hCA I ve hCA III ile %64-65 benzerlik göstermektedir. Bu durumun gen duplikasyonları sonucu oluştuğu düşünülmektedir.

Karbonik Anhidraz II enzimi mide, onikiparmak bağırsağı, ince bağırsağın üst ve alt yarısı, kör bağırsak, rectum ve brunner bezlerinde eksprese olmaktadır. Bu izoenzim sindirim sistemi dış salgı bezlerinde, bikarbonat salgı oluşumuna katılmaktadır. Mide ve onikiparmak bağırsağı yüzey epitelyal hücreleri, mukus ve bikarbonat salgılayarak HCO_3^- içeren mukus tabakası oluşturmaktadır Böylece epitelyumu çevirir ve onu sindirimden korur. Midede, gastrik mukozanın yüzeyindeki epitelyal ve periyatel hücrelerde eksprese olarak, gastrik sıvının asiditesinin düzenlenmesinde görev almaktadır. Ayrıca bu izoenzimin hepatositlerde ve safra kanalı epitel hücrelerinde varlığı belirlenmiştir. Pankreas kanal epitelyal hücrelerinde immünohistokimyasal olarak gözlenen CA II pozitif sinyallerine rastlanmıştır. Böbrekte ise bu izoenzim tübüler hücrelerinde ve üriner asidifikasyona dağıldığı böbrek toplama kanallarında ekspre olmaktadır.

Yukarıda anlatılanlara ilave olarak CA II izoenzimi merkezi sinir sistemi, insan adrenal ve pitüitrin bezleri, akciğer alveollerini kaplayan epitel hücreleri, insan plasenta, cenin membranları, üreme sisteminin birçok dokusu ve osteoklast gibi birçok farklı doku ve

organda eksprese olmaktadır. Ayrıca bu izoenzim hücreler arası pH ve Ca^{+2} seviyesini düzenleyerek osteoklast farklılaşması ve kemik emiliminde görev almaktadır (Hilvo 2005; Leppilampi 2006).

Karbonik anhidraz II, gözün damar tabakasının arka kısmındaki sinir ağın'da üretilen sıvının pH'sını düzenler ve gözdeki humor aközün oluşumuna katılır bu yüzden glokoma hastalığında etkili olan bir enzimdir. Glokoma, göz içi sıvı kanallarının kısmen ya da tamamen tıkanması sonucu, göz içi basıncının anormal boyutlarda yükselmesiyle oluşur. Basıncın bu derece artması retina ve optik sinirlere zarar vererek dönüşümsüz körlüğe neden olabilmektedir. Göz içi basıncının yegane kontrol noktası, göz içi sıvısı yani humor aközdür (Arslan 1994; Hilvo 2005; Bayram 2005).

Şeffaf ve in vivo olarak incelenebilen humor aköz, göz içi basıncının sağlanmasında, lens ve korneanın beslenme ve metabolik faaliyetlerinde büyük rol oynamaktadır. Bu sıvının içerisinde birçok metabolik materyal bulunmaktadır ve bu materyaller bazı önemli fonksiyonların görülmesinde önemli roller almaktadır. Ayrıca bu göz içi sıvısı yüksek miktarda Na^+ , Cl^- , laktat ve askorbat ile birlikte HCO_3^- iyonlarını da içermektedir.

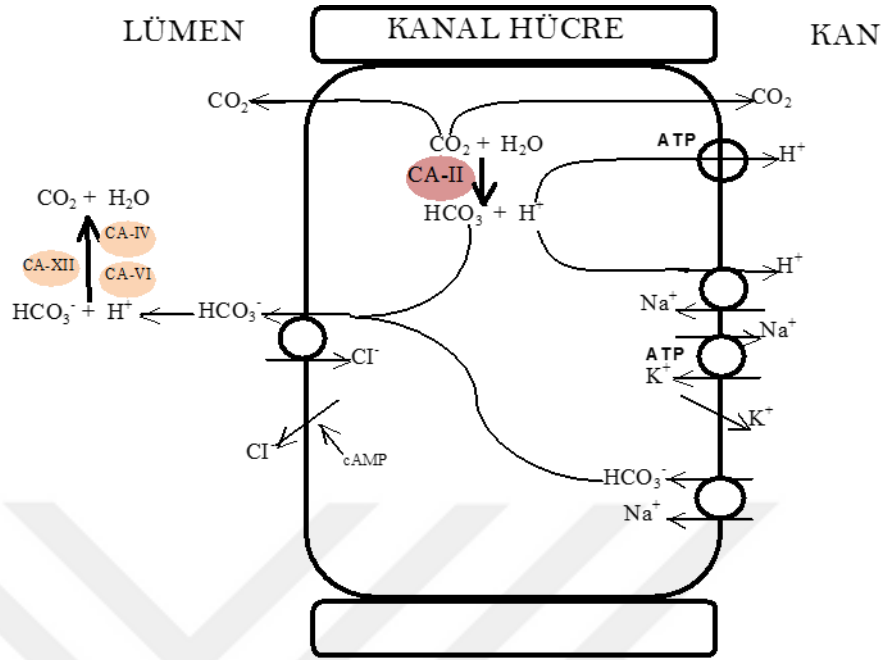
Humor aköz boşaltım kanallarının tıkanması ile humor aköz arka kamarada birikmeye başlar. Artan osmotik basıncı azaltmak amacıyla plazmadan arka kamaraya su salgılanmaya başlar. Osmotik basınç dengeye gelirken, göz küresinin çeperlerine uygulanan göz içi basınç artar. Basıncı yüksek değerlere ulaştığında göz küresinin arkasında bulunan optik sinirlerde atrofi meydana gelir ve görüntü kayıpları başlar. Humor aközün salgılanmasında CA enzimi, HCO_3^- iyonu birikimini sağladığından, uyarıcı bir etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu sonucu göz içi sıvısının salgılanma oranı yaklaşık yarı yarıya azalmakta, göz içerisindeki osmotik basınç ve dolayısıyla göz içi basıncı kontrol altında tutulabilmektedir. Bu bilgiler ışığında karbonik anhidraz inhibitörleri 40 yılı aşkın bir süredir Glokoma hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Arslan 1994; Bayram 2005).

Karbonik anhidraz enziminin izoenzimleri arasında hCA II, en güçlü aktiviteye sahiptir. Bu izoenzim insanların farklı organ ve hücrelerinde pankreas da dahil eksprese olmaktadır (Sly and Hu 1995). İnsan pankreasındaki hCA II izoenzimi için yapılan Northern ve Western Blot analizleri neticesinde 30 kD molekül ağırlığı, 1.7 kb transkript olduğu belirlenmiştir (Frazier *et al.* 1990).

Karbonik anhidraz II izoenzimi için yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda intra ve interlobüler pankreatik kanalların epitel hücrelerinin sitoplazmasında yoğun sinyal gözlenirken asiner ve Langerhan adacık hücrelerinde herhangi bir sinyal gözlenmemiştir (Parkkila *et al.* 1994). Bu nedenle CA II tümör hücre kökenli çalışmalarda kanal hücre belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

Pankreatik kanal hücrelerinde bol miktarda bulunan CA II izoenzimi CO₂'in hidratasyon reaksiyonunu katalizleyerek bikarbonatça zengin izotonik sıvı üretimine yardım ederken, pankreastaki diğer izoenzimlerin fizyolojik rolü belli değildir (Kumpulainen and Jalovaara 1981). Ayrıca bu izotonik sıvıya kanal hücrelerinin basoleteral yüzeyleri üzerinde bulunan Na⁺-HCO₃⁻ kotransportları yardımıyla HCO₃⁻ transferi gerçekleşmektedir (Abuladze *et al.* 1998; Marino *et al.* 1999).

Cl⁻-HCO₃⁻ değiştiriciler sayesinde kanal hücreleri içerisindeki HCO₃⁻ 'lar lümene salınır bu sırada cAMP denetimli Cl⁻ kanalları da bu işleme paralel çalışır (Şekil 1.3). Lümene salınan HCO₃⁻'lar, pankreas sıvısının bazikliğinin veya nötralliğinin sürdürülmesinde ve sindirim enzimlerinin aktive olmasına olanak sağlayan üst sindirim borusundaki gastrik asidin nötralize edilmesinde rol alırlar (Raeder 1992).



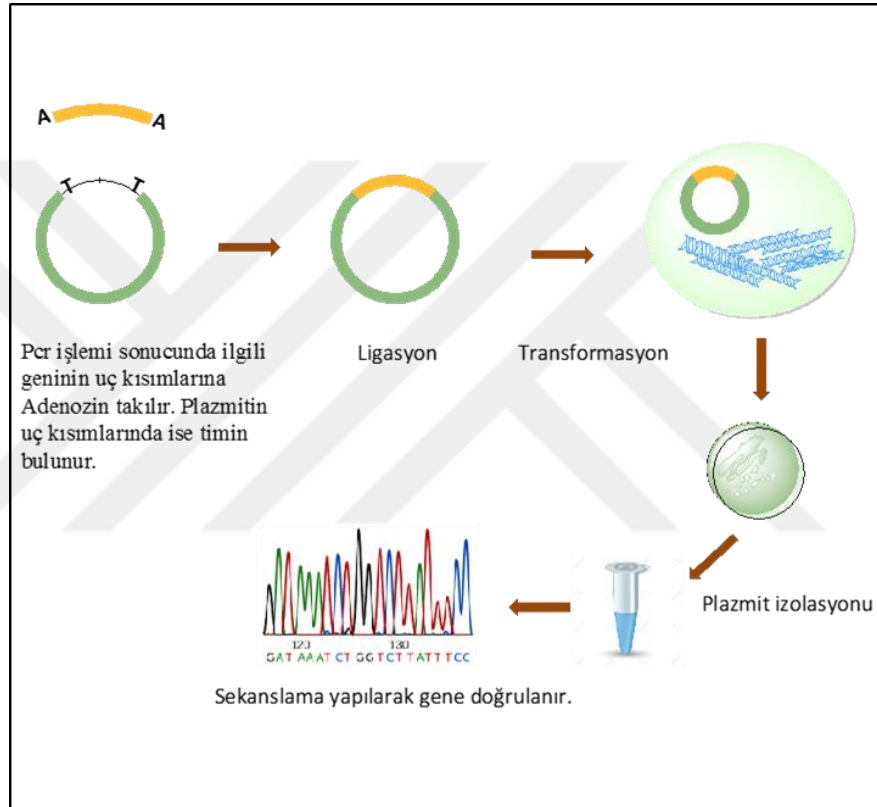
Şekil 1.3. İnsan pankreasındaki hCA II'nin fizyolojik rolü (Nishimori *et al.* 1999)

1.3. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA fikri ilk olarak tıp fakültesi biyokimya bölümünde Prof. Dale Kaiser'ın öğrencisi Peter Lobban tarafından önerildi. Bu öneri üzerine çalışılarak yeni yöntemler geliştirildi ve rekombinant DNA teknolojisi oluşturuldu. Bu teknoloji sayesinde organizmalarda bulunan DNA'ların değiştirilmesi ve yapay araçlar vasıtasıyla DNA üretimi gerçekleştirilebilir, gelecekte ise daha pratik uygulamalara sahip olunabilir (Stryjewska *et al.* 2013).

Rekombinant DNA teknolojisinde yaygın olarak kullanılan plazmitler, DNA klonlama işlemi sırasında vektör olarak kullanılabilmesi için temelde üç bölgeye sahip olacak şekilde tasarlanır. Bu üç bölge; replikasyon orijini, seçim için markır gen (ilaç direnç geni) ve eksojenik DNA fragmentlerinin insert edilebileceği bölgelerdir.

Çoğu moleküler biyoloji tekniklerinin temeli genlerdir. Genler ile yapılan çalışmaları kolaylaştırmak için genler izole edilebilir ve çoğaltılabilir. İlgili genin izolasyonu ve çoğaltılmasının bir metodu klonlamaktır. Bu metotta canlı hücrelerde çoğalabilen vektörlerle genin birleştirilmesi sonucu rekombinant DNA elde edilir (Newman *et al.* 1994).



Şekil 1.4. TA klonlama metotunun şematik gösterimi

Rekombinant DNA elde etmenin farklı yolları bulunmaktadır. Bunlardan biri, virüslere karşı bakterilerin ürettiği restriksiyon enzimlerini kullanarak yapılır. Restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerini içeren primerler kullanılarak PCR işlemi yapılır ve elde edilen amplifiye genin uç kısımları restriksiyon bölgelerini taşır. Kesim bölgelerini içeren vektör de enzimlerle kesilir ve her ikisi kullanılarak ligasyon işlemi yapılır. Sonuç olarak rekombinant DNA elde edilir. Diğer metot ise TA klonlamadır. Bu klonlama küt uçlu ligasyona göre daha fazla etkilidir. Subklonlanan DNA fragmentinde uygun restriksiyon kesim bölgeleri bulunmadığında genellikle bu yöntem tercih edilir.

Şekil 1.4’de gösterildiği gibi fragmentin 3’ uçlarına Taq polimeraz kullanılarak tek deoksiadenozin eklenir ve bu fragmentler ile lineer halde bulunan 3’ uçlarında tek deoksitimidin bulunduran vektörler ile uyumlu bir şekilde rekombinant DNA oluşturulur. Elde edilen rekombinant DNA’lar uygun konak hücrelere transfer edilir ve konak hücre DNA’sı ile birlikte çoğaltılır. Genellikle konak hücre olarak metabolizması çok iyi bilinen *E. coli* bakterileri tercih edilir. Kolayca üreyebilme, ucuz ve mükemmel genetik araçlara sahip olma tercih edilme sebeplerindendir (Makino *et al.* 2011). Rekombinant DNA’ların bu konak hücrelere aktarımı için hücre membranından geçip replike ve eksprese olacağı bölgelere ulaşması gereklidir. Bu da kimyasal ve elektroporasyon yöntemi ile yapılır. Kimyasal yöntemde; iki değerlikli katyonlar kullanılarak soğukta kompetent yapılan bakterilere, ısı şoku ile DNA’ların hücre membrandan geçmesi sağlanırken elektroporasyon yönteminde ise hücreleri ve DNA’ları içeren çözeltiye elektriksel titreşim uygulanarak hücre membranından DNA’ların geçişi gerçekleştirilir (Sambrook and Russell 2001). Bu aktarma işleminden sonra yapılması gereken rekombinant DNA’yı taşıyan bakterilerin tespit edilmesidir. Bunun için de antibiyotiğe dirençli gen bölgesi içeren vektör kullanılmalıdır. Fragmenti içerisine alan bakterinin antibiyotiğe direnci değişmektedir ve bu değişim sayesinde sadece antibiyotikli besiyerde antibiyotiğe direnç kazanan bakteriler gözlenmektedir.

Rekombinant vektörü taşıyan bakteriler toplanır ve uygun antibiyotiği içeren kültürde çoğaltılır, ardından bu kültürden plazmit DNA izole edilir. Elde edilen plazmit DNA’ların doğruluğunu tespit etmek için uygun restriksiyon enzimleri ile kesim yapılır ve fragmentin boyutuna uygun agaroz jelde yürütülür. Ayrıca fragmentin içeriğinin doğruluğunu tamamen öğrenmek için sekans analizi yapılır (Sambrook and Russell 2001).

1990’lı yıllarda çeşitli ekspresyon uygulamalarında pET ekspresyon sistemi tanımlanmıştır. Bu sistem, *E. coli*’de rekombinant proteinlerin klonlanması ve ekspresyonu için geliştirilen çok güçlü bir sistemdir.

pET sistemi, hedef genin bazal ekspresyon seviyelerini optimize etmek için ayarlanabilen konak-vektör kombinasyonlarını bulmamıza olanak sağlar. Her hedef proteinin elde edilmesi için tek bir strateji ve koşul uygun olmadığından bu kombinasyonlar çok gereklidir.

Bu sistem ile ekspresyon yapabilmek için, IPTG ile indüklenen lacUV5 promoter kontrolündeki T7 RNA polimeraz genini (bakteriyofaj T7 geni) kodlayan DE3 faj dizisi içeren lizojenik bir *E. coli* suşuna ihtiyaç duyulmaktadır. LacI, lacUV5 promotörünü baskılar ve ekspresyon plazmitinde T7/lac hibrit promotör kodlanır. LacI geni kopyası *E. coli* genomunda ve çeşitli özellikteki pET plazmitlerinde bulunur. Yüksek ekspresyon promotör mutant LacIq işlev gördüğünde zayıf olarak eksprese olan LacI geninin represyonu 10 kat oranında artırılır. IPTG Lac represör proteinine bağlanır ve represörün Lac promotörüne bağlanmasını engeller. Böylece T7 RNA polimeraz geni serbest kalır ve T7 RNA polimeraz enzimi sentezlenir. T7 promotör, 20 nükleotid dizisinden oluşur ve *E. coli* RNA polimerazları tarafından tanınmaz. T7 RNA polimeraz transkripsiyonu saniyede maksimum 230 nükleotid şeklinde gerçekleşir. *E. coli* RNA polimerazları (saniyede 50 nükleotid) ile karşılaştırıldığında 5 kat daha hızlıdır. pET ekspresyon plazmitinin protein ekspresyonu T7 RNA polimerazın doğal inhibitörü olan T7 lizozim enzimi varlığıyla azalır.

Plazmitler genin ekspresyonunu gerçekleştirmeyen bir konakta oluşturulduktan sonra, hedef proteinlerin ekspresyonu için çoğunlukla T7 RNA polimeraz genini (IDE3 lizojen) taşıyan bir konakçıya transfer edilir. IDE3 lizojenlerde T7 RNA polimeraz geni lacUV5 promotörünün kontrolü altındadır. Bu, indüklenmemiş durumda bir dereceye kadar geçiş yapılmasına izin verir ve daha ileri kontrollerin olmaması durumunda konakçı hücre büyümesinde zararsız etkilere sahip birçok genin ekspresyonu için uygundur. Daha sıkı kontrol için, pLysS veya pLysE taşıyan konaklar mevcuttur. PLys plazmitleri, T7 RNA polimerazın doğal bir inhibitörü olan T7 lizozimi kodlar ve böylece indüklenmemiş hücrelerde hedeflenen genleri kopyalama kabiliyetini azaltır. PLysS konakçıları az miktarda T7 lizozimi üretirken, pLysE konakçısı çok daha fazla enzim üretir ve bu nedenle de IDE3 lizojenlerinde bulunan en sıkı kontrolü temsil eder.

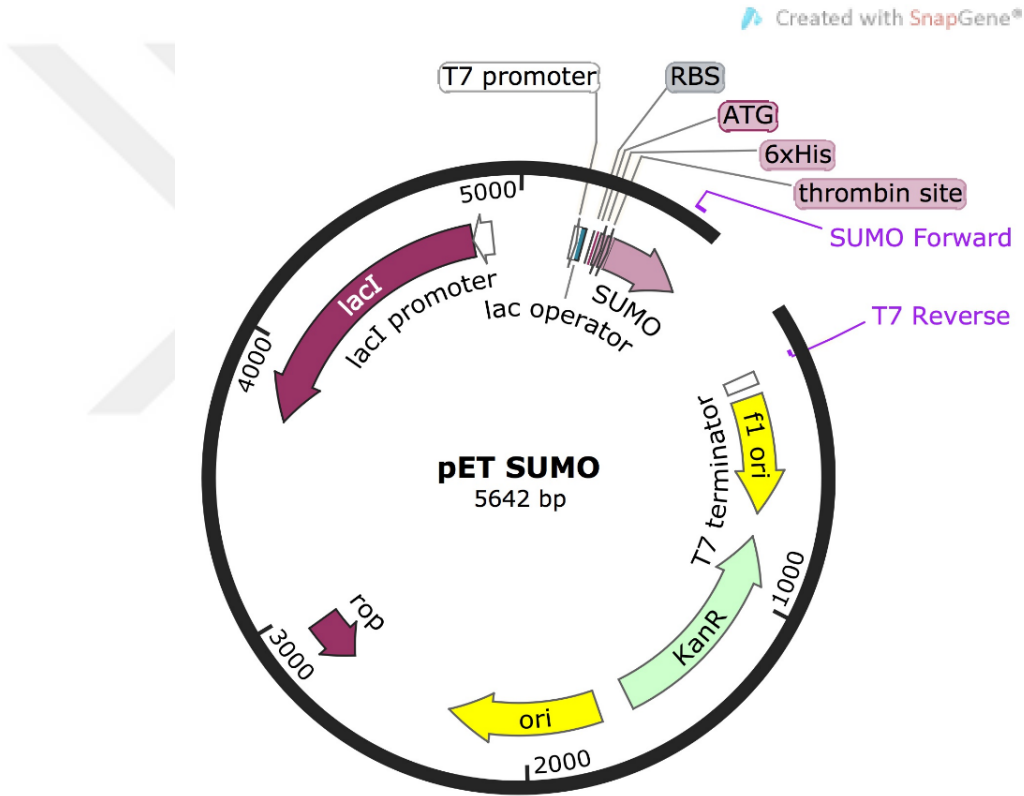
Protein füzyon yapıları üzerine yapılan geniş kapsamlı in vivo ve in vitro araştırmalar sonucunda genellikle füzyon kısımların proteinlerin çözünürlüğünü arttırdığı kanısına varılmıştır (Waugh 2005; Costa *et al.* 2014). Füzyon proteinler ile ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen yine de protein için en iyi füzyon sistemini seçmek zordur. Genel olarak, proteinler için füzyon kısım seçimi yapılırken ilgili proteinin özellikleri incelenmelidir. Bu özelliklerden bazıları; boyutu, stabilitesi, hidrofobikliği ve ekspresyon bölgesidir. Füzyon kısmın hedef proteine bağlandıktan sonra her bir füzyon protein için verimdeki ve çözünürlükteki artış farklılık arz eder. Bu füzyon kısımların rekombinant proteinlere eklenmesi ile verimin ve çözünürlüğün artmasının mekanizması tam olarak açıklanamamaktadır. Çözünmeyen rekombinant protein ile korunan ve stabilitesi olan bir yapının biraraya getirilmesi, bu rekombinant proteinin uygun katlanmasını ve stabil olmasını teşvik edebilir. Ayrıca diğer bir hipotez ise füzyon kısım protein katlanmasının çekirdeği olarak görev alır. Bu hipotez “molten globül hipotezi” olarak bilinir (Creighton 1997a; Butt *et al.* 2005).

5.6 kb’lık pET SUMO vektörü (Şekil 1.5) rekombinant proteinlerin eksprese edilmesi için kullanılan vektördür. İçerisine ilgili gen yerleştirildikten sonra *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R *E. coli* aracılığıyla klonlanır, klonlanan vektör BL21(DE3) suşuna aktarılır ve protein ekspresyonu sağlanır. Kullanılan *E. coli* BL21(DE3) hücreleri bir dış membran proteaz kodlayan ompT geninde mutasyon taşırlar ve böylece eksprese olan rekombinant protein hücrede uzun süre stabil kalır. Bu nedenle *E. coli* BL21(DE3) protein ekspresyon çalışmalarında yüksek oranda tercih edilen bir hücre soyudur. Ayrıca bu vektör kullanılarak yapılan ekspresyonlarda protein SUMO füzyon olarak elde edilir.

pET SUMO vektörünün içeriği;

1. T7 lac promotör; rekombinant gen ekspresyonunu düzenler, IPTG ile indüklenir.
2. N terminal polihistidin kuyruğu (6xHis); rekombinant füzyon proteinin kolay saflaştırılması için kullanılır.
3. N terminal SUMO füzyon proteini; rekombinant füzyon proteinin çözünürlüğünü ve ekspresyonunu artırır ve SUMO proteaz ile kesimi sonucu doğal protein elde edilir.

4. TA klonlama bölgesi (5'T çıkıntıları); Taq ile amplifiye olan PCR ürününün etkili bir şekilde klonlanmasını sağlar.
5. Kanamisin direnç geni; *E. coli* seçimi için kullanılır.
6. lac I geni; bazal transkripsiyonu azaltmak için kullanılır.
7. pBR322 orijini; replikasyon orjinidir.
8. ROP; pBR322 orijini ile etkileşerek *E. coli*'deki replikasyona olanak sağlar. (invitrogen, cat no: V19520).



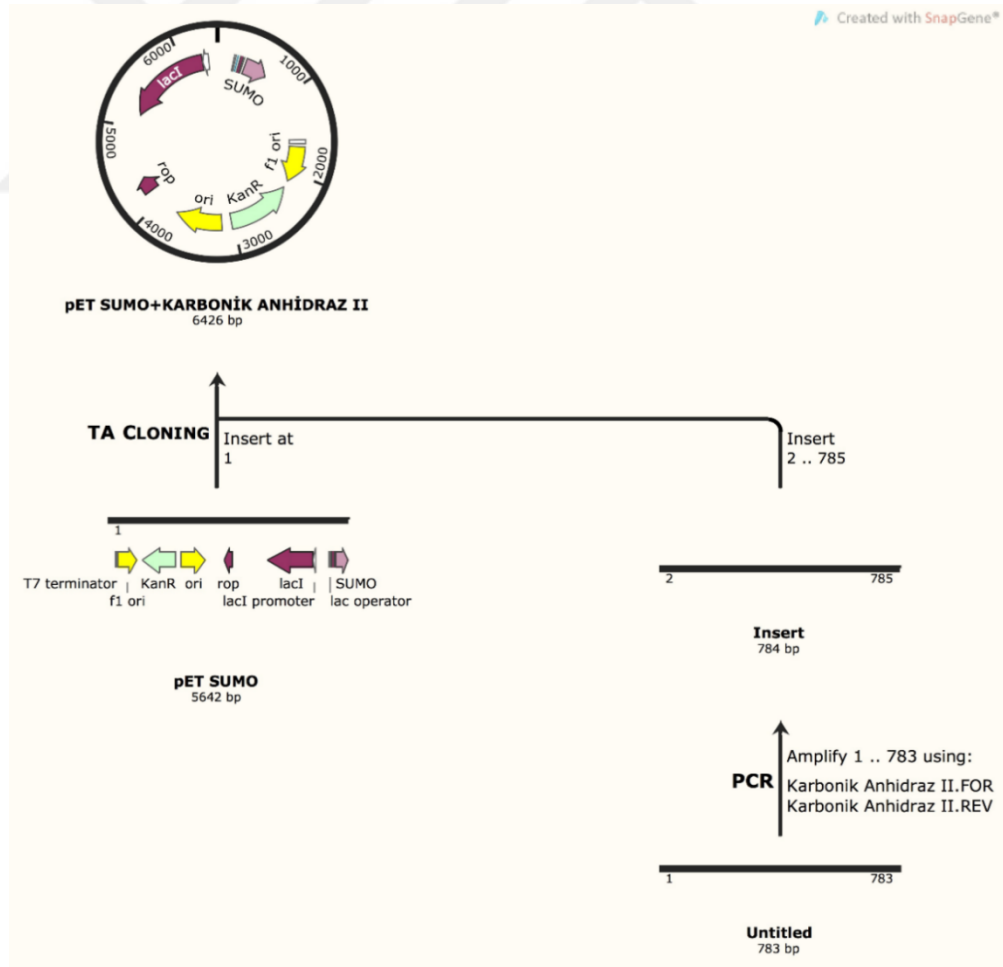
Şekil 1.5. pET SUMO vektörü (SnapGene programı kullanılarak çizildi).

pET SUMO protein ekspresyon sisteminin avantajları;

1. Rekombinant füzyon proteinin ekspresyonunu artırır.
2. Rekombinant füzyon proteinin çözünürlüğünü artırır.
3. SUMO proteaz kullanılarak doğal protein elde edilir.
4. Ni^{+2} reçineli afinite kromatografisi ile SUMO proteaz ve SUMO füzyon proteinini kolayca uzaklaştırılabilir.

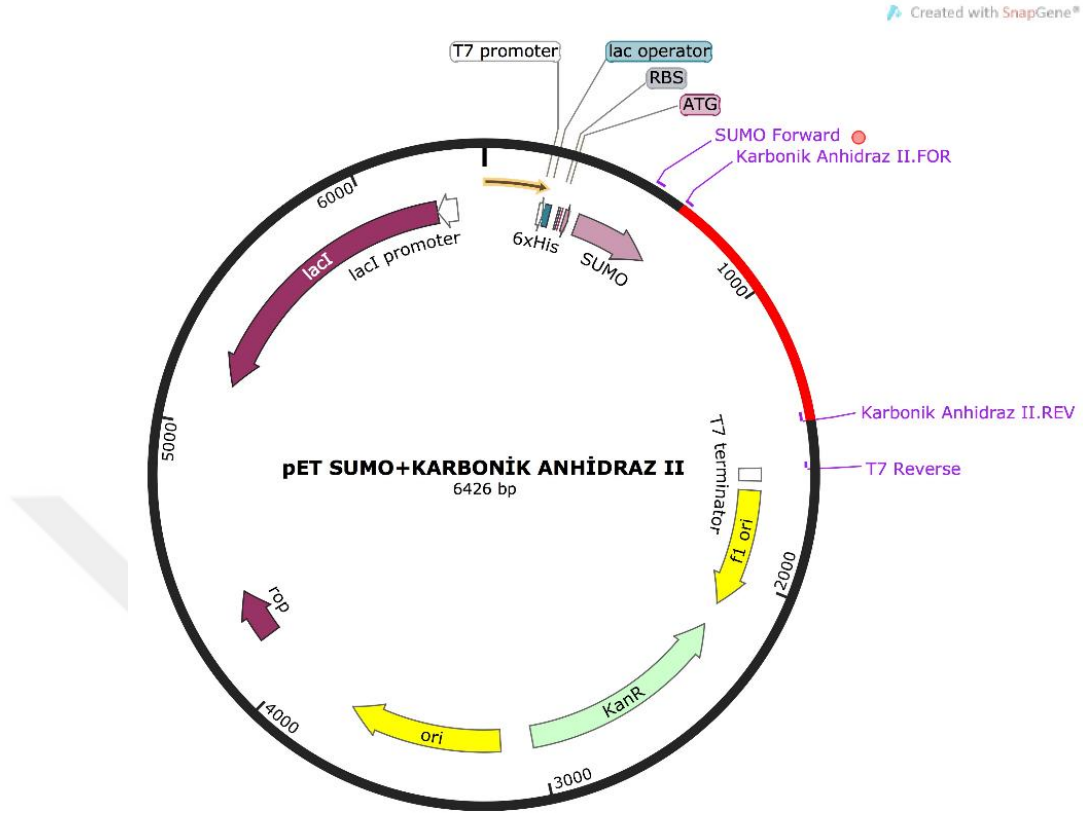
pET SUMO vektöründe T7 RNA polimeraz geni lac UV5 promotörünün kontrolü altındadır. Bu promotör lac promotörünün mutasyonla değiştirilmiş bir versiyonudur. Lac UV5 bir laktoz analogu olan IPTG (izopropil β -D tiyogalaktozid) ile uyarılır. Ortama IPTG ilave edildiği zaman T7 RNA polimeraz eksprese olmakta ve rekombinant hedef genin transkripsiyonunu gerçekleştirmektedir. Böylece N terminal histidin kuyruk içeren hedef proteininin ekspresyonu gerçekleşmektedir.

Bu çalışmada ise hCA II geni pet SUMO vektörü kullanılarak TA klonlama yöntemi ile klonlandı. Bu klonlama işlemi deneme lisansı SnapGene kullanılarak bilgisayar ortamında şematize edildi (Şekil 1.6). Bu klonlama işlemi ardından oluşturulan pET SUMO+hCA II rekombinant vektör Şekil 1.7’de verildi.



Şekil 1.6. Rekombinant vektörün eldesi (pET SUMO+hCA II)

*(SnapGene programı kullanılarak çizildi)



Şekil 1.7. pET SUMO+hCA II rekombinant vektör
 *(SnapGene programı kullanılarak çizildi)

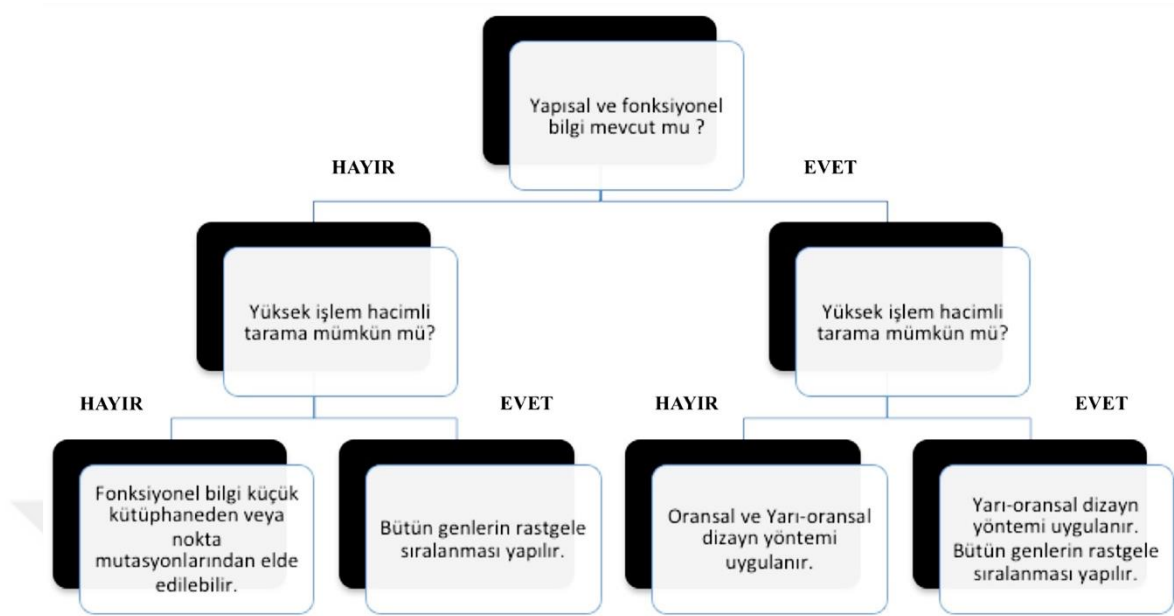
1.4. Protein Mühendisliği

Mikroorganizmaların çoğu doğal olarak birçok enzimi üretebilir fakat üretilen bu enzimlerin endüstride kullanımı için bazı engeller vardır. Bunlar enzimin katalitik etkinliğinin azalması, düşük aktivite ve düşük stablitedir. Bu gibi engellerin aşılması için birçok protein mühendisliği uygulamaları geliştirilmiştir. Bu uygulamalar oransal dizayn ve yönlendirilmiş değişim olarak iki yonteme dayandırılmaktadır. Oransal dizayn en önceki yaklaşımdır. Bu yontemin uygulanabilmesi için enzimin aktif bölgesindeki yapısal özellikleri ve o bölgenin protein fonksiyonundaki rolünün bilinmesi gerekmektedir. Çok yakın geçmişte ise yönlendirilmiş değişim popüler olmaya başladı çünkü oransal dizaynın aksine protein yapı ve fonksiyonun ilişkisi hakkında detaylı bilgiye gerek duymaksızın enzim mühendisliği nispeten daha hızlı yapılabilmektedir (Chica *et al.* 2005). Son olarak yarı oransal dizayn yontemi

öngörölmüş ve bu yöntemin diğer ikisinin özelliklerini kapsadığı ve yüksek işlem hacimli tarama metotuna gerek duymadığı onaylanmıştır. Ayrıca bütün oransal gen mutagenез yaklaşımı ile karşılaştırıldığında akıllı kütüphaneler oluşabilir. Oransal yaklaşım ve yönelimli yeniliğin arasında kalan birkaç yeni metot geliştirilmiştir ki bu metotlar Çizelge 1.2’de özet olarak verildi ayrıca bu metotların avantaj ve dezavantajları tabloda belirtildi (Sağdıç 2015). Protein mühendisliği için doğru metot seçimi Şekil 1.8’de şematize edildi.

Çizelge 1.2. Farklı moleküler mühendisliklerin avantajları ve dezavantajları

Faktörler	Avantajlar	Dezavantajlar
Yönelimli yenilik	Benzer doğal yenilik	Rastgele mutasyon kütüphanesi büyük, düşük verimlilik
Bölge yönelimli mutagenез	Yönlendirilmiş, yüksek verimlilik, mutasyon kütüphanesi küçük, mutagenез için basit yöntemler	Hedef proteinin yapı ve fonksiyon ilişkileri belirgin olmalı
Doygun mutagenез	Kolay, etkili tarama	Mutasyon kütüphanesi büyük
Tekrarlı doymun mutagenез	Yüksek kaliteli kütüphaneler, doymun mutagenезden daha hızlı ve daha etkili	Mutasyon kütüphanesi büyük
Kesme	Yüksek verimlilik	Domainler ve özellikleri arasındaki ilişki açık olmalı
Füzyon	Hedef proteinin yapı ve fonksiyon ilişkileri gerekli değil	Füzyon sekans kriterinde netlik yok



Şekil 1.8. Protein mühendisliği için doğru metot seçimi

1.5. Mutagenез Çalışmalar

1.5.1. Oransal dizayn

Oransal dizayn yöntemi, bir molekülün yapısındaki değişikliğin fonksiyonuna nasıl etki edeceği temeline dayanır. Bu yöntem molekül iskeletinde hesaplamalar ve kompleks modeller yapabilen bilim adamlarının bilgisayar programlarından bilgi alarak işler.

1.5.1.a. Bölge yönelimli mutagenез

Bölge yönelimli mutagenез 1978’de Michael Smith tarafından belirlenen yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu teknik genellikle yapısı, fonksiyonu ve katalitik mekanizması bilinen biyomolekülün doğal tipindeki bir oligonükleotin üzerinde bulunan nokta yönelimli mutasyonların etkisini anlamak için kullanılır. Bu amaçla o bölgedeki aminoasitin yeri değiştirilebilir, başka aminoasitler eklenebilir veya çıkartılabilir.

Spesifik bir rezidünün yapı ve fonksiyonundaki önemini algılamak için bu yöntem genellikle tercih edilir. Bunu tespit edebilmek için hedef aminoasit ya tamamen uzaklaştırılır ya da farklı bir aminoasitle yer değiştirilir. Son zamanlarda bu amaç için alanin tarama yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde yan zinciri yüksüz, küçük ve kimyasal olarak aktif olmayan alanin aminoasiti tercih edilir.

1.5.2. Yarı oransal dizayn

Yarı oransal dizayn, yönelimli yeniliğin rastgele metotları ile oransal enzim ayarlarının önemli özelliklerinin kombinasyonu olarak tanımlanabilir. Bu yüzden hem yönelimli yeniliğin hem de oransal dizaynın kısıtlamalarının üstesinden gelinebilir. Bu metotta, yapısal ve fonksiyonel bilgiler baz alınarak belirli rezidüler hedeflendiği için yönelimli yeniliğe benzer akıllı kütüphaneler muhtemel pozitif sonuçların elde edilmesini mümkün kılar (Chica *et al.* 2005).

1.5.2.a. Bölge doygun mutagenез

Bölge yönelimli doygun mutagenез, hızlı bir şekilde laboratuvar şartlarında proteini değiştirmek için kullanılır. Bu sistemde proteinin her bir aminoasiti doğal olarak oluşan diğer 19 aminoasitle yer değiştirir. Doygun mutagenез çalışmalarında genellikle enzimlerin sıcak noktaları (Hotspots) seçilir. Ayrıca tek bir aminoasit varyantları ile artan termostabilite ve katalitik etkinlik sağlanabilir (Chen *et al.* 2012).

a. Tekrarlı doygun mutagenез

Bölge yönelimli doygun mutagenезin özel bir şekli tekrarlı doygun mutagenезdir. Bu yöntemde rezidülerin uygun bölgelerinin rastgele mutasyonları oluşturulur ve katalitik etkinlik, steroseçicilik, termal dayanıklılık gibi özellikler için mutant kütüphanesinde tarama yapılır. Ayrıca diğer bölgelerde yapılan mutasyonlarda ise kalıp olarak en iyi dataları veren kullanılır (Gumulya *et al.* 2012).

b. Kesme

Protein domainlerinin birkaçı enzim aktivitesi için temel değildir. Rastgele ve yönlendirilmiş kesme kullanılarak enzimin özellikleri artırılabilir ya da değiştirilebilir. Rastgele mutasyonda istenilen özelliklere sahip mutantlar kesme kütüphanesi vasıtasıyla taranır, tam tersine yönlendirilmiş kesme ile yapılanlar ise direkt elde edilir (Yang *et al.* 2014).

c. Füzyon

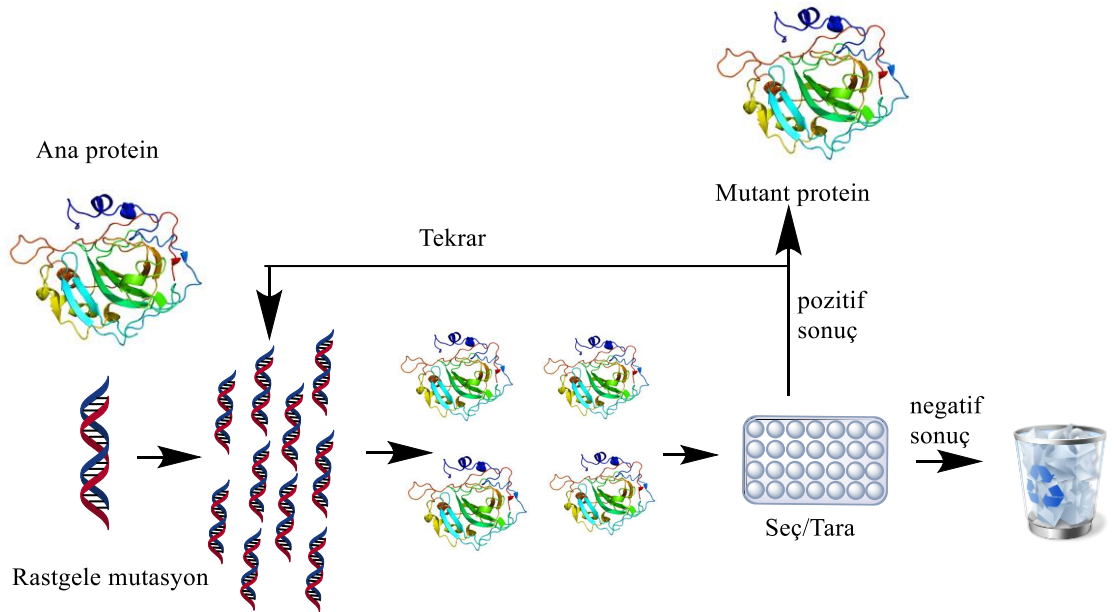
Son zamanlarda enzim mühendisliği için tahmini enzimlerin inşası yeni ve önemli bir olay haline gelmiştir. Özellikle katalitik aktiviteyi artırmak amaçlı yapılmaktadır. Farklı enzimlerin substrat bağlanma veya katalitik domainleri birleştirilerek yeni birçok tahmini enzim elde edilmiştir. Örneğin, karbohidrat aktif enzimler füzyon stratejisi için iyi bir hedef olmuştur. Katalitik modül ve karbohidrat bağlanma modülü olmak üzere iki farklı molekül içermektedir. Yapısal ve fonksiyonel bu iki modül esnek bağlayıcılar ile birbirine bağlanır. Aminoasit benzerlikleri incelenerek bakıldığında karbohidrat bağlanma modüllerinin 54 farklı bilinen ailesi bulunmaktadır ve bunların ligand spesifiklikleri önemli ölçüde farklıdır. Bunun neticesi olarak bağlanma bölgeleri ile farklı karbohidratlar etkileşmektedir. Bunu en aza indirmek katalitik kaliteyi artırmak için füzyon yöntemi kullanılarak tahmini enzimler oluşturulmaktadır.

1.5.3. Yönelimli yenilik

Proteinin yapı ve fonksiyonu hakkında herhangi bilgi olmaksızın varyantlarının oluşturulduğu tekniktir. Bu teknikte tarama araçları kullanılarak istenilen fenotipe sahip varyantlardan oluşan kütüphaneler oluşturulur. Son zamanlarda hem enzim özelliklerinin hem de yeni metabolik yolların geliştirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

Yönelimli yenilik, in vitro şartlarda proteinlerin doğal yapısından farklı gelişmiş yapıya sahip fenotiplerinin elde edilmesi amacıyla gen manipülasyonlarının yapıldığı yöntemdir. Ayrıca DNA Shuffling yöntemini de içerir. Bu yöntem ise protein sekanslarının homolojisine ve DNA fragmentlerinin bir araya gelmesiyle oluşan hibrit sekansların oluşumuna dayanır. Fakat sekansları tekrar kombine etmek için genler arasındaki homolojinin minimum %70 olması gerekir (Chen 2001).

Rastgele mutagenез ise yönelimli yeniliğin diğer önemli bir yöntemidir (Şekil 1.9). Düşük verimliliğe sahip DNA polimerazlar kullanılarak, polimerazların verimliliğini azaltarak yapılan hata eğilimli PCR, bu mutagenез yönteminin yaygın uygulamasıdır. Normalde PCR’da kullanılan polimerazlar reaksiyon boyunca hata oluşturur bu özellik rastgele mutagenез için kullanılır. Ayrıca bu özellik reaksiyonu optimal olmayan şartlarda (polimeraz konsantrasyonu artırmak, reaksiyon süresinin uzatmak, Mg^{+2} konsantrasyonunun artırmak, Mg^{+2} yerine Mn^{+2} kullanmak, 4 deoksiribozun miktarını yetersiz miktarda kullanmak) yaparak artırılabilir (Yamamoto *et al.* 1983).



Şekil 1.9. Rastgele mutasyon aşamaları

Memeli CA'ların aktif bölgesi hidrofobik ve hidrofilik olarak iki kısma ayrılmıştır. 121, 131, 141, 143, 198 ve 209 'daki rezidüler hidrofobik kısmı sınırlarken, 62, 64, 67, 92 ve 200 konumlarındaki rezidüler hidrofilik kısmı sınırlar. Enzimin substratı olan CO₂'in bağlandığı hidrofobik cebi değiştirmek için birçok mutasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalar sayesinde enzimin kataliz mekanizması aydınlatılmıştır. Bu çalışmada ise aktif bölge oyuğundaki hidrofobik kısımda yer alan rezidülerden Trp 209'un mutagenез çalışması yapıldı. Bu mutagenез çalışması ile aktif bölge oyuğunun sterik hacminde değişiklikler yapıldı. hCA II enzimin dört farklı mutanıtı (Trp209Ile, Trp209Leu, Trp209Val, Trp209Pro) bölge yönelimli mutagenез yöntemi kullanılarak elde edildi. Elde edilen bu mutanıtların enzimin katalitik etkinliğine etkisi incelendi. Ayrıca bu mutanıtların inhibitörlere karşı (bazı benzensülfonamid türevleri ve ilaç olarak kullanılan asetazolamid) ilgisi incelendi.

1.6. Hesaplamalı Mutagenез

Moleküler modelleme, model oluşturma ve hesaplama yoluyla moleküler yapı ve işlevi inceleyen bilim ve sanattır. Moleküler modelleme, X ışını kristalografisi ve NMR ile elde edilen deneysel verilerin geliştirilmesiyle başlar ve *ab initio*, yarı deneysel kuantum mekaniği, ampirik, mekanik, moleküler dinamikler, yapı/aktivite ilişkileri ve veritabanları ile devam eder. Moleküler modelleme, tanımlanan ve karakterize edilen proteinlerin artan sayısının yapısal ve fonksiyonel özelliklerini öngörmeye önemli bir rol oynamaktadır (Hinchliffe 2006; Schlick 2006; Machida 2007)

Moleküler mekanik kuvvet-alan veya potansiyel enerji terimleri altında bilinir. Moleküler mekaniğin temel ilkesi moleküler geometrileri ve enerjileri tanımlayan fiziksel kuvvetlerdir. Neticede elde edilen üç boyutlu yapı, geometrinin ayarlanması ile oluşur. Bu geometrinin ayarlanması sırasında toplam iç enerji minimize olur. Moleküler mekanik, potansiyel enerjinin bir araya getirilmesini ve atomik pozisyonların fonksiyonunu içerir. Entropik katkılar ihmal edilir veya yaklaşık alınır. Kuvvet alanlarının birkaç versiyonu yaygın olarak kullanılır. Moleküler mekanik genellikle küçük moleküler sistemler için kullanılır. CHARMM paketi protein modelleyiciler

tarafından tercih edilir, AMBER genellikle nükleik asit modelleyicileri tarafından kullanılır.

Mutagenesis protein mühendisliğinde ve analizinde önemli olan protein ve peptidlerin içerdiği aminoasitlerin değiştirilmesine dayanan bir tekniktir. Bölge yönelimli mutagenesis deneysel olarak gerçekleştirildiğinde pahalı, zaman alıcı ve araştırmada hız sınırlayıcı bir adımdır. Hesaplamalı araçlar bu olumsuz etmenleri tolere etmek için kullanılır. Proteinin doğal yapısındaki rezidülerin değiştirilmesi sonucu yapısındaki ve fonksiyonundaki değişiklikler tespit edilebilir ve bu bilgiler ışığında yeni daha iyi biyomoleküller dizayn edilebilir.

Teorik modelleme, biyomoleküllerin düşük basınçta izole edilmiş ve etkileşimsiz türler olarak işlenmesiyle gerçekleştirilebilir. Ancak vakumdaki hesaplamaların doğruluğu tartışmalıdır, çünkü biyomoleküller ve reaksiyonları çoğunlukla sulu ortamda gerçekleşmektedir. Biyomoleküllerin fiziksel doğasını doğru bir şekilde tanımlamak için çözücünün etkisi göz önüne alınmalıdır.

Çözücünün etkilerini tanımlama yöntemleri iki gruba ayrılır; saklı ve açık çözücü yöntemleri. Açık çözücü metotları, bireysel çözücü moleküllerini tanımlarken, saklı çözücü yöntemlerinde ise çözücü sürekli ortam olarak ele alınır.

Saklı çözücü tekniklerinde, çözünen moleküller devamlılık ortamında bir boşluğa yerleştirilir ve çözünen madde ile boşluk arasındaki etkileşim hesaplanır. Oyuk boyutunun ve oyuğun şeklinin hesaplanması, devamlılık modellerinin geliştirilmesinde anahtar adımlardır.

Boşluğun boyutu, van der waals değerlerine yakın yarıçapların tanımıyla ilgilidir. En çok kullanılan van der waals yarıçapı değerleri Bondi, Pauling ve evrensel kuvvet alanıdır. Şekil 1.10'da gösterildiği gibi bu noktada iki farklı yüzey sunulur; çözücünün erişebildiği yüzey (SAS) ve çözücünün erişemediği yüzey (SES). Boşluğun şekli ve boyutu bu iki yüzeyi tanımlamaktadır. SAS, çözücü küre merkezince ulaşılabilen

çözünen çevresindeki yüzey olarak tanımlanabilirken ikinci yüzey SES, çözünen ortamın etrafındaki alanın çözücü tarafından girilemeyen yüzeyi olarak bilinmektedir (Tschammer 2007).

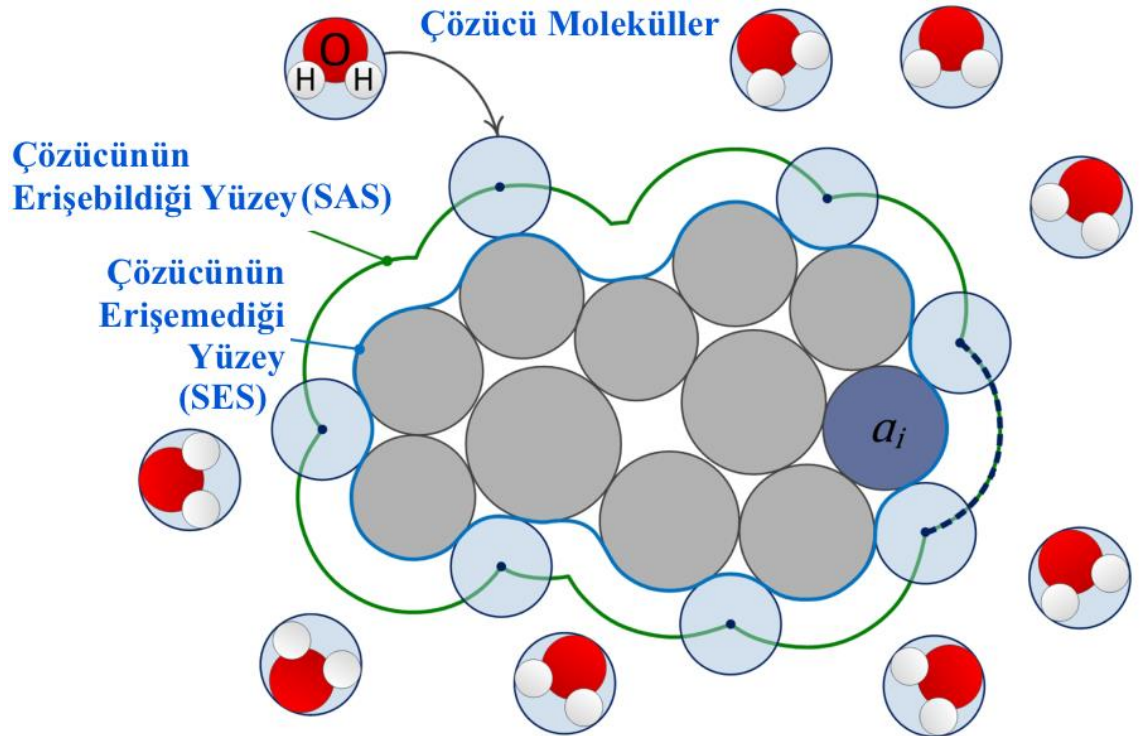
Oyuğun belirlemesi ile güvenilir SAS ve SES yüzeylerinin oluşturulmasından sonra, çözünen madde ile çözücü arasındaki enerji hesaplanır. Hesaplanan etkileşim enerjisi dört kısma ayrılmaktadır.

*Çözünürlük boyutuna bağlı olan kavitasyon enerjisi.

*Dağılım enerjisi (çözücü-çözücü dağılım kuvvetlerinin neden olduğu).

*Reorganizasyon enerjisi (çözücü-çözücü dağılım kuvvetlerinin dağılımından kaynaklanır).

*Çözücü ve çözünen madde yükleri arasındaki elektrostatik etkileşim enerjisi.



Şekil 1.10. SAS VE SES terimlerinin açıklanması (Tavousi *et al.* 2016)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İnsan karbonik anhidraz II enziminin reaksiyon mekanizmasını açıklayabilmek için çok sayıda araştırmacı tarafından enzim üzerine çeşitli mutasyon çalışmaları yapılmıştır. 1988 yılında Forsman ve grubu tarafından hCA II enziminde bulunan histidin 64 aminoasitinin CO₂ hidratasyonunda gerekli olmadığı çeşitli mutasyon çalışmalarıyla tespit edilmiştir. Bu çalışmada, CO₂-HCO₃⁻ dönüşümü sırasında histidin 64 aminoasitinin önemli bir proton transfer vektörü olduğu hipotezini test etmek için histidin 64 yönlendirilmiş mutagenез ile lizin, glutamin, glutamik asit ve alanin aminoasitlerine dönüştürülmüştür. Yapılan mutasyonlar sonucu elde edilen mutant enzimler yüksek CO₂ hidratasyon aktivitesi göstermiştir (Forsman *et al.* 1988).

1989 yılında Tu ve grubu hCA II enziminin katalitik mekanizmasında proton transferinde rol olan histidin 64 aminoasitinin rolünü açıklamak amacıyla enzimde yönlendirilmiş mutagenез ile histidin 64'ü alanin aminoasidine dönüştürmüşlerdir. Bu mutasyon sonucu elde edilen mutant enzimin katalizlediği CO₂-HCO₃⁻ dönüşümü pH 7'den büyük olduğu durumlarda değişmemiştir. Ayrıca doğal tip enzim, Cu⁺²'nin mikromolar düzeyde uygulanan konsantrasyonu ile inhibe olurken, mutant enzim bu konsantrasyondan etkilenmemiştir. Oluşturulan mutasyonun aktif bölge ile reaksiyon tamponu arasındaki proton transfer oranını etkilediği tespit edilmiştir. Ayrıca enzimde aktif bölge ile tampon arasındaki proton transferinin, tampon içeriğinin kimyasal yapısına bağlı olduğu tespit edilmiştir (Tu *et al.* 1989).

Jewell *et al.* (1991) tarafından, insan karbonik anhidraz III izoenziminin aktif bölgesine yakın iki temel rezidü olan lizin 64 ve arginin 67 rezidülerinin bu izoenzimin sahip olduğu bazı özelliklerinden sorumlu olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca bilindiği üzere bu iki rezidü karbonik anhidraz izoenzimleri arasında en etkili olan hCA II izoenziminin, ilişkili pozisyonlarında da bulunmaktadır. Bölge yönelimli mutagenез yöntemi kullanılarak hCA III izoenziminin bu iki rezidüsü değiştirilmiştir. Doğal tip ve mutant hCA III'ler tarafından gerçekleştirilen katalizleme, durgulu akım spektrofotometresi ile kararlı durumda bulunan CO₂'e ait hidrasyonun başlangıç

hızından ve kütle spektrometresi ile kimyasal dengedeki su ve CO₂ arasındaki ¹⁸O değişiminden belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada hCA III'deki lizin 64'ü histidine çevirerek karbonik anhidrazda histidin 64'ün, bir proton mekiği olarak çalıştığı gösterilmiştir. Artan CO₂ hidrasyon aktivitesi ve oluşan mutantın pH profili, katalitik aktivitede histidin 64'ün bu rolünü desteklemiştir. Ayrıca çalışmada diğer izoenzim gruplarındaki aktif bölge rezidülerinin mekanistik rolünü araştırmada kullanışlı bir yaklaşım olabileceği de belirtilmiştir. hCA III'de arginin 67'nin asparagin ile değiştirilmesi, doğal hCA III ile karşılaştırıldığında CO₂ hidrasyonunun katalizini üç kat artırmış ve oluşan mutantın pH profilinin lizin 64 için proton transferiyle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Yapılan mutasyon sonucu elde edilen mutant proteinlerin ne hCA III'ün asetazolamid ile zayıf inhibisyonunu ne de 4-nitrofenil asetatın katalitik hidrolizini artırmadığı sonucuna varılmıştır (Jewell *et al.* 1991).

Behravan *et al.* (1991) karbonik anhidraz I'i karakterize eden rezidüler ile insan karbonik anhidraz II'nin aktif bölgesindeki rezidüleri yer değiştirmek için bölge yönelimli mutagenез yöntemini kullanmıştır. Asn62'nin valine ve Asn67'nin histidine dönüştürüldüğü iki tek mutantın ve ayrıca her iki dönüşümü içeren mutantın bazı özelliklerini belirlemiştir. Yapılan çalışmayla çift mutantın izoenzim I'in spesifik katalitik özelliği için önemli olan tek mutant His200 (izoenzim II'de Thr200'ün histidine dönüştürülmesi) gibi davranmasına rağmen, Val62 ve His67'nin izoenzim I benzeri özelliğe sebep olmadığı gösterilmiştir. pH 8,9'da His67 varyantı artmış k_{cat} değerine sahipken Val62 varyantı, modifiye edilmemiş izoenzim II'den CO₂ hidrasyonu için daha yüksek k_{cat}/K_M değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Asn62'nin valinle yer değiştirmesi, 4-nitrofenil asetatın hidrolaz aktivitesinde %20'lik bir artışa neden olmuştur. Çift mutant için esteraz aktivitesi, aktivasyon serbest enerjisi üzerine iki tek mutantın etkisinin ilave edici olduğu varsayımıyla hesaplanan değere oldukça yakın bulunmuştur.

Engstrand *et al.* (1992) rekombinant karbonik anhidraz II ve His64 ile yer değiştirilen Lys, Glu, Gln, Ala varyantlarının CO₂ hidrasyon aktivitelerini pH 6-9 aralığındaki farklı tamponlarda ölçmüştür. Buna göre Lys64, Gln64 ve Ala64 varyantları, pH 9'a yakinken

bilinen inhibisyon şartları altında Michaelis-Menten'e uymayan davranış göstermiştir. Ancak asimptotik Michaelis-Menten parametreleri, düşük substrat konsantrasyonunda tahmin edilebilmiştir. Bütün varyantlar, farklı tampon özgünlükleri göstermiştir ve benzer şartların dışında Bicine, Taps ve Mops tamponlarındaki imidazol türevleri, Ches ve fosfat tamponları daha yüksek k_{cat} değerleri vermiştir. Değiştirilmemiş enzimde çok yüksek katalitik aktivitenin, etkili bir proton transfer grubu olarak His64 fonksiyonuna bağlı olduğu fakat bu metabolik yolun, Gln64 ve Ala64 varyantlarında mevcut olmadığı bildirilmiştir. Lys64 ve Glu64 varyantları Ala64 ve Gln64 türevleri Mops, Taps ve Mes tamponları ile anlamlı olarak daha yüksek k_{cat} değeri vermiştir. Lys64 ve Glu64 varyantları, Taps, Mops ve Mes tamponlarında Ala64 ve Gln64 varyantlarından önemli derecede daha yüksek k_{cat} değeri vermiştir. Böylece 9'a yakın pH'da Glu64 etkin değilken Lys64, His64'den sadece 5 kat daha az etkin görünmüştür. pH 6'da Lys64'ün verimsiz bir proton transfer grubu olduğu ancak Glu64'ün His64'ten sadece 2-3 kat daha az verimli olduğu bulunmuştur.

Martensson *et al.* (1992) tarafından yapılan bir çalışmada karbonik anhidrazın bilinen tüm izoenzimlerine ait birincil yapılarında değişmeyen bazı amino asitlerden biri olan Ser29'un bölgeye yönelik mutagenез aracılığıyla yapısal rolü araştırılmıştır. Guanidin-HCl tarafından denaturasyona karşı Ser29'un alanin ve sisteine dönüştürüldüğü mutantların stabilitesi çalışılmıştır. Ser29'un Ala'ya dönüştürülmesi, 2-3 hidrojen bağının kaybindan sorumlu olan 2,6 kcal/mol tarafından destabilizasyona neden olmuştur. Ser29'un sisteine dönüştürülmesi ise küçük yapısal değişimlere rağmen protein stabilitesinde etkili bir azalışa sebep olmuştur. Bu destabilizasyonun yaklaşık 7-8 kcal/mol'den sorumlu olduğu ve sadece hidrojen bağındaki değişimlerle açıklanamayacağı ama aynı zamanda biraz daha büyük tiyol grubundan kaynaklanan van der Waals bağlarını önlemek için olumsuz yapısal değişiklikler içermesi gerektiği bildirilmiştir.

Martensson *et al.* (1993) UV absorbansı, CD spektrumları ve enzim aktivitesi ölçümleriyle guanidin hidrokloritin orta yoğunluğunda insan karbonik anhidraz II'nin stabil ve kompakt katlanan bir aracı oluşturduğunu göstermiştir. Bu çalışmada bölgeye

yönelik mutagenез, merkezi β -yapısının çeşitli bölümlerinde tek bir sistein kalıntısı oluşturmak için kullanılmıştır. Proteinin katlanmasındaki aracının, β -tabakasının periferik kısmında daha az düzenli olduğu görülürken, β -tabakasının merkezi kısmında düzenli bir doğallımsı ikincil yapıya sahip olduğu bildirilmiştir. Yüzeydeki ikincil yapı elementleri ve merkezi β -tabakası arasına yerleşmiş büyük bir hidrofobik kümenin sağlam olduğu ve yüksek guanidin-HCl konsantrasyonlarında (5 M <) bile dikkat çekici şekilde stabil olduğu görülmüştür. Bu alışılmadık stabil altyapının katlama sürecinin başlatılması sırasında bir "tohum" olarak işlev gösterebileceği bildirilmiştir.

Elleby *et al.* (2000) çinko bağlama bölgesinde düzenleme yapmak için histidin ile argininin yer değiştirilmesiyle oluşturulan bir mutasyonun $1,2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 'lik CO_2 -hidrasyon turnover sayısı ile katalitik olarak inaktif fare karbonik anhidraz ilişkili proteini (CARP), aktif bir karbonik anhidraza çevirmek için yeterli olduğunu bildirmiştir. Karbonik anhidraz benzeri aktif boşlukta gerçekleşen birçok mutasyon aktivitenin artmasına sebep olmuştur. His94, Gln92, Val121, Val143 ve Thr200'ü içeren beşli mutant, k_{cat} değerini $4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ ve k_{cat}/K_M değerini $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ olarak göstermiştir. Ayrıca pH 9'da 50 mM TAPS/NaOH'dan 50 mM 1,2-dimetilimidazol/ H_2SO_4 'e tampon değişikliği, bu beşli mutant için k_{cat} değerinde 4 kat artışa sebep olmuştur. His94 ve Gln92 çift mutantın CO_2 hidrasyon etkinliği, kompleks pH bağımlılığı göstermiştir. 121 veya 143 pozisyonunda Val ile Ile'nin yer değiştirmesi, ölçülebilir 4-nitrofenil asetat hidrolaz aktivitesine neden olmuştur. Bu aktivite için pH-hız profilinin karbonik anhidraz I ve II ile benzer şekle sahip olduğu bildirilmiştir.

An *et al.* (2002) His64'ün Ala ile değiştirilmesi sonucu oluşan hCA II'nin bölge spesifik bir mutantının (H64A hCA II) genellikle imidazol ve piridin türevleri olan ekzojen proton verici/alıcıları tarafından kurtarılabileceğini belirtmiştir. X-ray kristallografisi, H64A hCA II üzerindeki koruyucu ajan 4-metilimidazol'un bağlanma bölgesi olarak Trp5'i tanımlamıştır. Bu bağlama bölgesi, His64'ün çinko'dan uzağa yönlendiği "dış" pozisyonla çakışmıştır. Katalizlemede proton vericisi/alıcısı olarak 4-metilimidazol aracılığıyla aktivasyon, CO_2 ve su arasındaki ^{18}O değişimini kullanan dehidrasyon yönünde ve durgun akım spektrofotometrisi ile hidrasyon yönünde tespit

edilmiştir. H64A hCA II mutant protein yapısında Ala, Leu ve Phe ile Trp5'in değiştirilmesi, 10^5 s^{-1} 'e yakın seviyeleri katalizlemede proton transferi için maksimum hız sabitlerinin 4-metilimidazol ile artışı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmamıştır. Kimyasal koruma için bu yüksek aktivite, H64A hCA II'deki Trp5'de 4-metilimidazol bağlama bölgesinin üretken olmayan bir bağlama bölgesi gibi görüldüğünü belirtmiştir. Elde edilen veriler, yalnız dikkate alınan His64'ün dış pozisyonunun hCA II'de proton transferinde aktif olmadığını akla getirmiştir. İzoenzim II'nin aksine hCA III'de Trp5'in Ala ile değiştirilmesi, imidazol tarafından k_{cat} 'ın kimyasal yardımını kaldırmışken, değişmeyen hidrasyon için k_{cat}/K_M aynı kalmıştır. Trp5, proton transferinin 10^4 s^{-1} 'e yakın hız sabiti için maksimum seviyeli imidazol için baskın üretken bağlanma bölgesine katkıda bulunmuştur. CA II ve III'ün duyarlılığındaki bu farklar, CA II ile kıyasla CA III'e ait aktif bölge boşluğunun elektrostatik olarak pozitif doğası ve sterik olarak daha kısıtlı olduğuyla ilgili olabileceği bildirilmiştir.

Host *et al.* (2006) farklı açıl zincir uzunluğuyla esterler için insan karbonik anhidraz II'nin (hCAII) esteraz aktivitesi ve spesifikliği üzerine hidrofobik kısmın şeklinin ve büyüklüğünün etkisini araştırmıştır. Pozisyon 121, 143 ve 198'nin alaninle değiştirilmesinin ardından V121A, V143A, V121A/V143A varyantlar ve hCAII için kinetik ölçümler yapılmıştır. Bazı varyantlarda hidrofobik kısmın artmış büyüklüğü, daha uzun substratlar için artmış aktivite ve spesifikliğe neden olmuştur. V121A/V143A varyantında p-nitrofenil valerat için hidrolizinin oranı yaklaşık 3000 kat artmıştır. Ayrıca spesifiklikler önemli ölçüde değişmiştir. Örneğin hCA II'nin p-nitrofenil asetattan p-nitrofenil valerat ile 500 kat daha verimli iken V121A/V143A'nın, p-nitrofenil asetattan p-nitrofenil valerat ile 6,3 kat daha verimli olduğu bulunmuştur. Docking prosedürü ile hidroliz reaksiyonu için geçiş durum analogları bu varyantların üzerinde gerçekleştirilmiştir. Docking sonuçları ile katalitik hız sabitlerinin ilişkili olabileceği belirtilerek her bir varyant için verimli hidrolizin genellikle başarılı TSA-docking ile korelasyonunun saptandığı bildirilmiştir.

Host *et al.* (2007) aktif bölgedeki çinko atomu ve sülfonamid arasındaki yüksek afiniteden yararlanmıştır. Sülfonamid içeren p-nitrofenil esterlerinin hidrolizini

katalizlemek için kalıp proteinde iki rezidülü reaktif bölge düzenlenmiştir. İnsan karbonik anhidraz II'nin doğal aktif bölgesini kullanmak için uygun substrat tasarlanmıştır. Ester substratı, kalıp proteindeki His64 rezidüsünün yakınında bölünebilir bağ pozisyonu için tasarlanmıştır. Katalitik His-His çiftini oluşturmak için üç potansiyel bölge tespit edilmiştir ve buna karşılık gelen N62H/H64, F131H/V135H ve L198H/P202H mutantları oluşturulmuştur. En verimli varyant F131H/V135H'nin k_{cat}/K_M değeri, yaklaşık $14\,000\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Bhatt *et al.* (2007) Trp64'ün yan zincirine 4-metilimidazol'ün bağlanma mekanizmasıyla aktive edilen hCA II mutantını (H64W) oluşturmuştur. Bir dizi denemeler, Trp64'ün indol halkası ile ekzojen bir proton vericisi olarak imidazol ve piridin türevlerinin etkileşimi H64W hCA II aktivasyonu ile tutarlı bulunmuştur. Bu denemeler Gly64 ile karşılaştırıldığında Trp64 içeren mutant ile yaklaşık dört kat daha büyük bir aktivasyon göstermiştir. W5A-H64W hCA II'daki Trp64'ün daha az esnek yan zincire bağlı proton vericileri aktivasyon göstermezken daha esnek yan zincire bağlı olanlar aktivasyon göstermiştir. Bu sonuçlar, bağlanma bölgesine ait yapısal hareketin daha etkili proton transferi ile ilişkili olduğu önerisini desteklemiştir.

Host and Jonsson (2008) bir üçlü mutantı (V121A/V143A/T200A) oluşturmuş ve bu mutantın $k_{cat}/K_M=625 (\pm 38)\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ile pNPBenzo'yu hidroliz ettiğini göstermiştir. Ayrıca bunun diğer ester substratlar ile de aktif olduğunu ve şimdiye kadar CA varyantlarında en yüksek esteraz etkinliği olan $k_{cat}/K_M=101,700 (\pm 4800)\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ile p-nitrofenil asetatı hidrolizlediğini belirtmiştir. V121A/V143A mutantın p-nitrofenil butirat (pNPB) ve valerat (pNPV) için ölçülebilir K_M değerine sahip olduğunu fakat T200A mutasyon ilavesinin substrat bağlanmasını azalttığını göstererek V121A/V143A/T200A'nın K_M değerinin belirlenemediğini bildirmiştir. Ancak k_{cat}/K_M değeri, üçlü mutantta her iki substrat için daha yüksek bulunmuştur.

Zheng *et al.* (2008) hCA II'nin birçok bölgeye spesifik yapılan değişimleri ile 62 pozisyonunda (Ala, Val, Leu, Thr ve Asp) gerçekleştirilen mutantları karşılaştırmıştır. Çalışmada elde edilen mutantlar için CO_2 hidrasyonundaki katalizör etkinliği, ^{18}O

değişimi ile karakterize edilmiştir ve mutantların yapısı, X-ray kristalografisi ile belirlenmiştir. Bu mutantların her biri, doğal hCA II'nin aktif bölge boşluğundaki X-ray kristalografisi tarafından gözlemlenen düzenli su yapısını korumuştur. Bu nedenle yabancı tip ile karşılaştırıldığında bu su yapısının 62 rezidüsündeki mutantların aktivitesini değiştirmedeği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada yabancı tip ve N62T hCA II'nin kristal yapısı, His64'ün yan zincirinin hem içe hem de dışa doğru yönelmesini göstermiştir. Bununla birlikte, diğer mutantlardan N62A, N62V, N62L'nin içe doğru ve N62D'nin dışa doğru bir His64 yönelmesi gösterilmiştir. hCA II'deki Asn62'nin önemli bir rolü, aktif bölge ile çözelti arasındaki proton transferinin maksimum verimliliğine katkı sağlayan His64'ün yan zincirine ait iki konformasyona (içe ve dışa doğru) izin vermiştir. Bölge spesifik mutant N62D ile katalizlemede proton transfer oranının yabancı tipin %5'i olduğu bildirilmiştir.

Genis *et al.* (2009) CA IX'un aktif bölgesine benzetmek için Ala65'i serine ve Asn67'yi glutamine dönüştürerek CA II'nin çift mutantını oluşturmuştur. Tek başına ve beş tane sulfonamid türevi inhibitörlerle (asetazolamid, benzolamid, klolorzolamid, etokszolamid ve metazolamid) oluşan kompleksinde kinetik olarak ¹⁸O değişimi ve yapısal olarak X-ray kristallografi kullanılarak CA IX'un taklidi karakterize edilmiştir. Bu yapısal bilgiler hem inhibisyon çalışmaları hem de in vitro sitotoksik testleriyle değerlendirilmiştir ve yapı-aktivite ilişkisi göstermiştir. CA II ve CA IX'un taklidine ait kinetik ve yapısal çalışmalar, klorzolamidin bağlanması üzerine aktif bölgenin konformasyonel değişimine sebep olan CA IX'un güçlü bir önleyicisi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca klorzolamidin prostat kanser hücrelerine karşı sitotoksik olduğu bildirilmiştir. Bu ön çalışmada CA IX taklidinin bazı kanserlerin tedavisinde yeni gelişmelere neden olabilecek fazla izoenzim-spesifik CA IX inhibitörleri tasarlamak için kullanışlı bir model sağlayabileceği gösterilmiştir.

Kockar *et al.* (2010) bölge yönelimli mutagenesi kullanarak karbonik anhidraz izoenzim I'in katalizlemesinde gerekli olmadığı düşünülen fakat enzimin substrat bağlama bölgesinin yanında bulunan bir amino asit rezidüsünü (Phe91Asn) değiştirmiştir. Bu değişim, mutant hCA I'in katalitik aktivitesinde %16'lık sabit bir artışa neden olmuştur.

Bu durumda, CO₂ hidrasyonu için katalizör olarak hCA I ve hCA II karşılaştırılırsa katalitik verimlilikte %50 kazanç olduğu bildirilmiştir. Bu etkinin yabancı tip ile karşılaştırıldığında mutanttaki büyük hidrofobik cep yüzünden olduğu tahmin edilmiştir. Yabancı tip enzimle karşılaştırıldığında mutant CA I'in sadece fizyolojik reaksiyon için daha iyi bir katalizör olduğu değil, aynı zamanda birçok durumda sülfonamid/sülfamat inhibitörlerine karşı daha yüksek (2,6-15,9 kat) afinite gösterdiği bildirilmiştir. Pozisyon 91 rezidüsü, katalitik olarak aktif 13 CA izoformları arasında oldukça değişken olduğu için; bu çalışmanın, enzimin süper ailesine ait kataliz/inhibisyon olaylarının daha iyi anlaşılmasına ışık tutacağı bildirilmiştir.

Schueler *et al.* (2011) NBCe1 (elektrojenik sodyum bikarbonat kontrasportör 1) transport aktivitesini artırmak maksadıyla yeteneğini ve katalitik aktivitesini belirlemek için NBCe1 ile birlikte ve tek başına *Xenopus oocytes*'de ifade edilen farklı CA izoformlarını çalışmıştır. CA I, CA II ve CA III izoformları, transport akımı ve oositteki hücre içi sodyum artış oranıyla ölçüldüğü gibi NBCe1'in transport aktivitesini artırmıştır. İnamoleküler proton metabolik yolunu değiştiren iki CA II mutan (CAII-H64A ve CAII-Y7F) önemli katalitik aktivite göstermiş ve ayrıca NBCe1 transport aktivitesini artırmıştır. Yapılan çalışmanın sonuçları, farklı CA izoformları ve mutantlarının in vitro olarak çok az enzimatik aktivite gösterse bile intact hücrelerde önemli katalitik aktivite sergileyebileceğini göstermiş ve NBCe1 transportunu artırmak için CA yeteneğinin öncelikli olarak katalitik aktivitesine bağlı olduğunu ifade etmiştir.

Mikulski *et al.* (2011b) membran inlet kütle spektrometri kullanarak ¹⁸O değişimiyle kataliz ölçümünü ve bölgeye spesifik mutagenез kullanarak Tyr7'nin rolünü incelemiştir. Diğer sekiz amino asit ile tyr7'nin değiştirilmesi, bikarbonat ve CO₂'nin dönüştürülmesini etkilememiştir. Fakat aynı durumda proton transfer hız sabitinde yaklaşık on kat artışa sebep olmuştur. Varyant Y7I hCA II inamoleküler proton transferini yaklaşık iki kat artırmıştır. Proton mekiği His64'ün yan zincir konformasyonunda ve aktif bölge boşluğundaki düzenli çözücü yapısında hiçbir değişim gözlenmemiştir. Diferansiyel tarama kalorimetri, pozisyon 7'deki varyantlara ait erime sıcaklığının doğal tipten yaklaşık 8°C daha düşük olduğunu göstermiştir.

Turkoglu *et al.* (2012) insan karbonik anhidraz II'nin aktif bölgesindeki inhibitörün bağlandığı üç amino asit rezidüsünü (Asn67Ile; Gln92Val ve Leu204Ser) değiştirmek için bölge yönelimli mutagenез kullanmıştır. Rezidüler (67, 92 ve 204), hidrofobikten hidrofilige ve tam tersine çevrilmiştir. Asn67Ile ve Leu204Ser mutantlar, yabancı tip enzimle kıyaslandığında benzer k_{cat}/K_M değeri göstermiştir. Gln92Val mutanıtı, yabancı tip protein ile karşılaştırıldığında CO₂ hidrasyonu için bir katalist olarak yaklaşık %30 daha az aktif olmuştur. Sülfonamidler/Sülfamatlar'lara ilgi, yabancı tip hCA II ile karşılaştırıldığında üç mutantın hepsinde azalmıştır. Bu etki, Asn67Ile mutanıtı (çinko iyonuna en yakın rezidü) için en güçlü, bunun ardından Gln92Val mutanıtı (aktif bölgenin ortasındaki rezidü) ve Leu204Ser mutanıtı (boşluğun girişinde katalitik metal iyonundan uzakta bulunan aminoasit) için en zayıf bulunmuştur. Bu çalışmada aktif bölgedeki küçük karışıklığın katalitik verimliliği etkilediği, fakat özellikle mutant amino asit rezidüleri katalitik metal iyonunun yanında olduğu zaman CA enzimleri arasında inhibitörler için afiniteyi önemli ölçüde değiştirdiği gösterilmiştir.

Mikulski *et al.* (2013) Tyr7 ile Phe'nin (Y7F) ve Asn67 ile Gln'nin (N67Q) yer değiştirilmesiyle oluşturulan hCA II'ye ait varyantların yapısal ve katalitik özelliğini araştırmak için x-ray kristalografisi ve membran giriş kütle spektrometresi ile ölçülen ¹⁸O değişimini kullanmıştır. Katalizleme sırasında His64'ten çinko bağılı hidroksite bir protonun transferi için hız sabitleri, yabancı tip hCA II'nin 0,8 μs^{-1} 'lik değeri ile kıyaslandığında Y7F'nin 4 ve Y7F/N67Q'nun 9 μs^{-1} olduğu bulunmuştur. Y7F ve Y7F/N67Q hCA II'ye ait bu daha yüksek değerlerin 1,5-1,6 Å çözünürlükteki kristal yapısında gözleendiği gibi çinko bağılı çözücü ve proton mekik rezidüsü His64 arasında hidrojen bağılı su moleküllerinin ağında dallanmanın düşük seviye ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın karbonik anhidraz tarafından katalizlemede proton transferi için düzenli su yapısıyla ilişkili hız sabitlerine açık bir örnek sunduğu bildirilmiştir.

Boone *et al.* (2013) hCA II'nin katalitik aktivitesi, termostabilitesi ve yapısındaki F226'nı rolünü üç varyantın (F226I/L/W) bölge yönelimli mutagenezi vasıtasıyla araştırmıştır. ¹⁸O kütle spektrometri ile F226 varyantlarının ölçülen katalitik oranları, doğal enzime benzer bulunmuştur. Fakat diferansiyal tarama kalorimetri çalışmaları,

denatürasyon sıcaklığında 3-4 K'lık azalış göstermiştir. X-ray kristallografik analizler, bu destabilizasyona ait yapısal temelin F66, F95 ve W97 ile F226 arasındaki zayıf C-H π etkileşiminin bozulmasıyla oluştuğunu önermiştir. Yapılan çalışmada, genel protein stabilitesinde aromatik kümeler arasındaki bu zayıf etkileşimlere ait hassas düzenlemelerin önemi vurgulanmıştır.

Pinard *et al.* (2013) yaygın olarak kullanılan CA inhibitörü ilaçların (Brinzolamide ve Dorzolamide), CA II'nin aktif bölgesini CA IX'un aktif bölgesine benzetmek için bölge yönelimli mutagenез kullanılarak oluşturulan CA IX taklidi ve CA II ile bağlanma interaksyonu üzerine yapısal bir çalışma gerçekleştirmiştir. Ayrıca CA II ve CA IX inhibisyonu ve moleküler docking, Brinzolamid'in Dorzolamid'e göre diğer katalitik açıdan aktif CA izoformları arasında daha güçlü bir inhibitör olduğunu ortaya koymuştur. Sülfonamid inhibitörüne ait uç kısmın sıkı bağlanmayı etkileyen stabil etkileşimlerin oluşturulmasında önemli olduğu bildirilmiştir.

Aggarwal *et al.* (2014) His64 ile Ala'nın yer değiştirildiği bir varyantın (H64A CA II), yabanıl tipe göre 20 kat daha düşük katalitik aktivite gösterdiği ve bu varyantın, katalitik aktiviteyi genellikle imidazol ve piridin türevleri olan ekzojen proton vericisi/alıcısı tarafından hemen hemen yabanıl tip seviyesine kadar artırılabilceği bildirilmiştir. Dört imidazol türeviyle (imidazol, 1-metilimidazol, 2-metilimidazol ve 4-metilimidazol) kompleks halindeki H64A CA II'nin x-ray kristal yapısı, çoklu bağlama bölgesi ortaya çıkarmıştır. Bu bağlama bölgelerinden ikisinin vahşi tip CA II'deki His64'e ait iç ve dış rotamer konumlarını taklit ederken diğerleri doğrudan çinko bağlı çözücüyü çıkararak katalizi inhibe etmiştir. Sunulan verilerin, sadece CA kataliz sırasında proton transferindeki His64'ün imidazol yan zincirinin önemini doğrulamadığı aynı zamanda imidazolün H64A CA II aktivitesini artırdığı mekanizmanın tam yapısını anlamaya yardımcı olduğunu belirtilmiştir.

Boone *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada çevreleyen peptid omurgasında yeniden düzenleme olmaksızın sınırlayıcı ana zincir konformasyonlarını karşılayabilen yüzey halkalarına yerleşik 170 ve 234 pozisyonlarındaki prolin kalıntılarının

katılmasıyla insan karbonik anhidraz II'nin (hCA II; EC 4.2.1.1) rijitliğini artırma etkisi vurgulanmıştır. Buna ek olarak hCA II'nin kompakt etkisi, *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* YO3AOP1 bakterisinden izole edilen hipertermofilik karbonik anhidraz için termal stabilitenin olası bir kaynağı olarak daha önce tanımlanan bir yüzey döngüsünü (rezidüler 230-240) silinerek incelemiştir. Bu hCA II varyantlarının diferansiyel taramalı kalorimetri analizi, bu yapısal modifikasyonların enzimin termal stabilitesi üzerinde minimum etkisi olduğunu göstermiştir. Oysa kinetik çalışmalar, katalitik etkinlik ve proton transfer oranları üzerinde beklenmedik etkiler göstermiştir. Bu hCA II varyantlarının X-ray kristalografik analizi, yüksek asidik döngü (kalıntılar 230-240) konfigürasyonunun ve elektrostatik potansiyelinin onun yüksek katalitik aktivitesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bu gözlemlere ve önceki çalışmalara dayanarak, stabilite için anahtar olan hCA II'nin genel yapısal mimarisi içinde çeşitli bileşenlerin bir resmi ortaya çıkarılmıştır.

Çok sayıda gen füzyon sisteminin varlığına rağmen, *Escherichia coli*'de rekombinant protein ekspresyonu halen zordur. Ekspresyonu zor gerçekleştiren proteinlerin ekspresyonunu gerçekleştirmek için en iyi füzyon kısmın seçilmesi gereklidir. Doğru seçimin gerçekleştirilebilmesi için deneyim gereklidir. Marblestone *et al.* (2006) tarafından hangi füzyon materyalinin zor ifade edilen proteinlere en uygun olduğunu belirlemek için, yaygın olarak kullanılan, yeni tanımlanan SUMO füzyon sisteminin çeşitli füzyon sistemleri ile karşılaştırmalı bir analizi yapılmıştır. Bu çalışma için üç model protein kullanılmıştır (yeşil floresans protein, matriks metalloproteaz-13 ve miyostatin). Bu proteinler Glutasyon S-transferaz, tioredoksin, NUS A, ubikitin ve SUMO ile füzyon hale getirilmiştir. Bu yapılar *E. coli*'de eksprese edilmiş, ekspresyon ve çözünürlük açısından değerlendirilmiştir. Beklendiği gibi farklı füzyon kısma sahip proteinlerin protein üretme kabiliyetlerinde farklılık gözlenmiştir. SUMO ve NUS A füzyonları, rekombinant proteinlerin ekspresyonunu ve çözünürlüğünü dramatik biçimde artırmıştır. SUMO füzyonları, doğal SUMO proteaz enizimi tarafından bölünürken, NUS A ve onun füzyon proteinini ayırmak için bir AcTEV proteaz bölgesi elde etmek gerekli olduğu düşünülmüştür. Bu bölgenin eklenmesi için protein mühendisliği kullanılmıştır. Bir kinetik analiz, SUMO ve AcTEV proteazlarının benzer

K_M değerlerine sahip olduğunu gösterirken, SUMO proteaz AcTEV proteazdan 25 kat daha yüksek k_{cat} değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgiye dayanarak SUMO proteazın daha fazla katalitik olarak etkili bir enzim olduğu belirlenmiştir. Bütün veriler incelendiğinde, SUMO füzyonun, proteinlerin ekspresyonunu ve çözünürlüğünü arttırmada yaygın olarak kullanılan füzyon materyallerinden daha üstün olduğunu ortaya koymuştur.

Şiddetli akut solunumla ilgili sendrom koronavirüsü membran proteini ve 5-lipoksigenaz aktive edici protein, geleneksel ekspresyon sistemleri ve yöntemleri kullanıldığında zayıf şekilde eksprese edilen çok sayıda zar proteinleri arasındadır. Bu nedenle, zor membran proteinlerini verimli bir şekilde ifade etmek için, moleküler biyologlar yenilikçi ekspresyon sistemleri geliştirmelidirler. Bu amaçla Zuo *et al.* (2005) SUMO füzyon ekspresyon sistemi kullanarak, *Escherichia coli*'de sendrom koronavirüsü membran proteini ve 5-lipoksigenaz aktive edici proteinleri ifade edilmiştir. Bu füzyon sistem, protein katlanmasını kolaylaştırmış ve bu da saflaştırılmış proteinin çözünürlüğünü ve biyolojik aktivitesini artırmıştır. Bu avantajlara ek olarak SUMO Proteaz 1'in yerli protein üretmek için SUMO füzyonunun yüksek özgünlük yaratabileceğini bulmuşlardır. Bu çalışmada sendrom koronavirüsü membran proteini ve 5-lipoksigenaz aktive edici proteinlerinin *E. coli*'deki ekspresyonunun SUMO füzyonlarının kullanılması ile büyük ölçüde arttığını göstermişlerdir

Ökaryotik hücrelerde yüksek mobilite gruplu kutu kromozomal protein 1 (HMGB1), bol miktarda ve her yerde bulunan nükleer proteindir. Nükleer HMGB1, stres altında nükleer kararlılığın sürdürülmesinde önemli bir role sahiptir. Bununla birlikte hücre dışı HMGB1, bu hücre içi işlevlerle karşılaştırıldığında belirgin farklılıklar gösteren eylemler uygular. HMGB1, ekstraselüler olarak salındığında, konak savunma mekanizmalarını veya doku rejenerasyonunu başlatan güçlü bir doğuştan gelen sinyaldir. HMGB1 iki DNA bağlama alanına sahiptir: HMG A kutusu ve B kutusu. HMGB1 A kutusu, antagonistik, anti-amamit etki gösterir ve potansiyel bir terapötik hedeftir ancak, yüksek etkinlikte HMGB1 A kutusunun geniş ölçekli ifadesi ve saflığı bildirilmelidir. Ge *et al.* (2015) Bu çalışmada, terapötik protein üretiminin

gerekliliklerini karşılamak için yüksek düzeyde fonksiyonel HMGB1 A kutusunu ifade etmek ve saflaştırmak için bir SUMO füzyon ekspresyon sistemi kullanılmıştır.

Escherichia coli, rekombinant proteinleri ifade etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve protein çözünürlüğünü artırmak için birkaç füzyon kuyruk geliştirilmiştir. Ancak diğer organizmalardan proteinin eksprese edilmesi ve saflaştırılması her zaman başarılı değildir. Chen *et al.* (2016) bu çalışmada bazı proteinleri *E. coli*'de çözünür bir şekilde eksprese etmek amacıyla TtrD (tetratiyonat redüktaz)'yi füzyon kuyruk olarak kullanma ihtimali araştırılmıştır. İnsan genlerini ihtiva eden yirmi parmak bölgesi, 37°C ve 18°C'de yetiştirilen *E. coli*'de eksprese edilmiş ve diğer dört füzyon kuyruğu (His, SUMO, GST ve MBP) ile karşılaştırmalı olarak test etmiştir. Sonuçlar, füzyon kuyrukların çözünebilir ekspresyon yeteneğinin azalan şekilde MBP, GST, TtrD, SUMO ve His olduğunu ortaya koymuştur. İnklüzyon cisimciklerinde eksprese edilen proteinlerin saflaştırılması için tek sütunlu bir yeniden katlanma süreci kullanılmış ve TtrD en güçlü yeniden katlanma yeteneğini göstermiştir. Sonuçlar, TtrD kuyruğunun rekombinant protein çözünürlüğünü ve yeniden katlanma yeteneğini geliştirdiğini ve *E. coli*'de protein ekspresyonu için yararlı bir füzyon kuyruğu olabileceğini önermiştir.

Saf ve çözünür rekombinant proteinlere erişim, protein araştırmalarında sayısız uygulama için çok önemlidir. Antikorların üretimi, proteinlerin yapısal karakterizasyonu ve protein mikroyarray'leri gibi Alman cDNA konsorsiyumu aracılığıyla karakterize edilmemiş proteinleri kodlayan 1500'den fazla ORF'ye erişebiliriz. Çok sayıda rekombinant protein hazırlamak, protein saflaştırma araçlarının dikkatli bir şekilde düzenlenmesi ve yeniden değerlendirilmesini gerektirir. Ekspresyon ve saflaştırma stratejisi, mikroyarray temelli testlerde kullanılacak miktarda mg protein ile sonuçlanmalıdır. Buna ek olarak, deneysel düzenek hem otomatik protein ekspresyon taramasına hem de proteinlerin üretilmesine izin vermek için yeterli bir sağlamlıkta olmalıdır. Bu gereklilikler en iyi *Escherichia coli* gibi bir bakteri ekspresyon sistemi tarafından yerine getirilir. Bu çalışmada x etkili bir ekspresyon stratejisi geliştirmek için, 75 farklı ORF, Gateway klonlama sistemi kullanılarak uygun

ekspresyon vektörlerine aktarılmış. Dört farklı füzyon kuyruğu (*E. coli* transkripsiyon-sonlandırma anti-sonlandırma faktörü, hekzahistidin etiketi, maltoz bağlayıcı protein ve GST) ile iki farklı indüksiyon sıcaklığında indüklenen füzyon proteinlerin çözünürlüğü üzerine etkisi analiz edilmiştir. Afinite ile saflaştırılmış füzyon proteinleri MALDI-TOF MS ile doğrulanmıştır.

Disülfid bağları, salınan proteinin çoğunda görülmüştür. Doğal konformasyon, çözünürlük ve aktivite elde etmek için doğru disülfid bağlarının oluşturulması şarttır. Tedavi edici, teşhis ve diğer çeşitli amaçlar için disülfür bağı içeren rekombinant proteinlerin üretilmesi, araştırmanın zor bir kısmıdır. *E. coli*'nin indirgeyici sitozolik bölmesinde bu gibi proteinlerin üretimi çoğunlukla inklüzyon cisimciklerinin oluşumu ile sonuçlanır. Inklüzyon cisimciklerinin yeniden katlanması zor olabilir, zaman ve emek tüketir ve ekonomik değildir. Bu proteinlerin oksidatif periplazmik bölmeye translokasyonu, doğru disülfid bağ oluşumuna ve dolayısıyla doğal konformasyona erişmek için doğru çevreyi sağlar. Ancak tüm proteinler bakteriyel sinyal peptidleri yardımı olmaksızın verimli bir şekilde periplazma translokasyonuna tabi tutulamaz. Bu nedenle, küçük, iyi katlanmış ve sabit bir periplazmik proteinin kaynaşması disülfid bağı proteinlerin periplazmik üretimi için daha umut vericidir. Geçtiğimiz on yıllarda, translokasyon ve çözünürlüğü arttırmak için birkaç tam uzunlukta protein veya domain kullanıldı. Bu derlemede Malik (2016), periplazmik boşlukta hedef proteinlerin verimi önemli ölçüde arttıran protein füzyon kuyrukları gözden geçirilir.

Yapısal ve işlevsel genomiklerin, heterolog konakçılardaki büyük oranda çözünen, düzgün biçimde katlanan proteinler için talepleri, protein üretimi ve saflaştırma kaynaklı gelişmeler tarafından desteklenmiştir. Rekombinant protein ekspresyonu için tercih edilen konakçı olan *Escherichia coli*, heterolog proteinlerin aşırı eksprese edilmesi için üstesinden gelinmesi gereken birçok zorluklar sunmaktadır. Bu zorluklar, hedef proteinlerin proteolitik bozunumunu, proteinin yanlış katlanması, zayıf çözünürlüğü ve iyi saflaştırma metodolojilerinin gerekliliğini içerir. Gen füzyon teknolojileri, bu zorlukların çoğunun üstesinden gelinerek heterolog ifadeyi geliştirmiştir. Bu derlemede Butt *et al.* (2005), gen füzyonlarının ekspresyon,

çözünürlük, saflaştırma ve proteolitik bozunmayı azaltma yeteneği tartışılacaktır. Protein füzyonunu parçalamanın temel dezavantajı da ele alınacaktır. Yeni tanımlanan SUMO füzyon sistemine ve bu teknolojinin geleneksel gen füzyon sistemleri üzerinde geliştirdiği iyileştirmelere odaklanılacaktır.

Alterio *et al.* (2007) üç tane benzen-1, 3-disülfonamid türevi 12 memeli α karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) ve üç bakteriyel / arkeal α , β ve γ -CA sınıfına ait CA'lar arasındaki etkileşimleri açısından incelemiştir. hCA II ile benzen sülfonamidlerin kompleks yapısının X-ray kristalografik yapısı elde edilmiştir. Zn^{+2} ile koordine halinde olan SO_2NH_2 kısmına göre meta konumdaki sülfonamid grubu, aktif bölgedeki oyuğun hidrofilik tarafına yönelmiş ve His64, Asn67, Gln92 ve Thr200 ile hidrojen bağları kurmuştur. İnhibitörlerin fenil parçasının düzlemi, diğer CA II-sülfonamid komplekslerinde en tekrarlayan yönelişine göre 45° döndürülmüş ve 10° eğilmiştir.

Di Fiore *et al.* (2011) sülfonamid çinko bağlama grubunda N-amino-, N-hidroksi-ve N-metoksi-kısımlarını içeren N-sübsitiye benzensülfonamidler, CAI'lerin inhibisyon ve yapısal çalışmaları sayesinde, inhibisyon mekanizmalarıyla ilgili ilginç yönleri ortaya çıkararak araştırmıştır.

Hen *et al.* (2011) dallanmış alifatik karboksilik asitler ve 4-aminobenzen-sülfonamid içeren aromatik amitleri, karbonik anhidraz (CA) izoformlarının inhibisyonu için değerlendirmiştir. Bileşimlerin üçü CA II'yi inhibe ederken, ikisi tüm izoformları inhibe etmiştir. Yapısal çalışmalar, aktif alanların hidrofobisitesindeki farklılıkların inhibitörlerin afinitesini modüle ettiğini önermektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Primerlerin Hazırlanması

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gen bankası kullanılarak insan hCA II genine ait gen bölgesi belirlendi. Elde edilen gene ait protein kodlama bölgesi tespit edildi ve primerler gen kodlama bölgesinin başından ve sonundan tüm geni amplifiye edecek şekilde Primer 3 programı (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) kullanılarak dizayn edildi.

3.2. hCA II Genine Ait cDNA Sekansının Çoğaltılması

Çizelge 3.1'deki PCR protokolü dizayn edilen forward ve revers primerler kullanılarak uygulandı ve hCA II genine ait sekans çoğaltıldı.

Çizelge 3.1. hCA II geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon karışımı ve PCR parametreleri

Hedef		PCR şartları		PCR reaksiyon karışımı	
DNA					
hCA II geni	II	T ₁ =94 °C, 4 dk T ₁ =94 °C, 1 dk T ₂ =60 °C, 1 dk T ₃ =72 °C, 1 dk	1 Döngü 35 Döngü	10xPCR Buffer	2 µl
				MgCl ₂	1 µl
				dNTP mix (1mM)	0,5 µl
				Forward primer (10 pmol)	1 µl
		T ₄ =72 °C, 10 dk	1 Döngü	Revers primer (10 pmol)	1 µl
		T ₅ =4 °C, 5 dk		Kalıp DNA (0.01-1µg)	3 µl
				dH ₂ O	6 µl
				Taq DNA polimeraz (2.5 U/µl)	0,6 µl

3.3. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi

hCA II enziminin üretimi için kalıp olarak insan pankreas cDNA'sı kullanıldı. hCA II enzimine spesifik dizayn edilen forward ve revers primerler ile kalıp DNA, PCR'da çoğaltıldı ve liner pET SUMO vektörü ile ligasyon işlemi yapıldı. Bu işlem sonucunda rekombinant vektör elde edildi.

3.3.1. Ligasyon reaksiyonu

Çizelge 3.2'de verilen ligasyon reaksiyonu hCA II gen/vektör: 1/1 olacak şekilde hazırlandı ve 16°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 3.2. pET SUMO vektör: hCA II ligasyon reaksiyon şartları (1:1 oranı için)

hCA II ligasyon reaksiyon şartları	
10x Ligasyon Tamponu	1 µl
hCA II DNA	2 µl
Vektör DNA	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Steril dH ₂ O	10 µl'ye tamamlandı.

3.4. Rekombinant Vektörün Kompetent One Shot® Mach1™-T1R *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu

1. Ligasyon reaksiyonu (2 µl) kompetent One Shot® Mach1™-T1R *E. coli* bakterisine aktarıldı ve kibarca karıştırıldı.
2. Buz üzerinde yarım saat inkübe edildi.
3. 42°C'deki su banyosunda 30 saniye bekletildi ve hemen buza transfer edildi.
4. Oda sıcaklığındaki S.O.C sıvı besiyerinden 250 µl eklendi.
5. Mikrosantrifüj tüpünün ağzı sıkıca kapatıldı ve 200 rpm 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

6. Kanamisin antibiyotiği içeren kültür sıvısı (200 µl) LB agar plaklarına transfer edildi ve sıvının agar tarafından absorbe edilmesi beklendi.
7. LB agar plakları 37°C'de bir gece inkübe edildi ve inkübasyondan sonra plazmit taşıyan koloniler gözlemlendi.

3.5. Doğru Transformant Seçimi

hCA II genine ve vektöre ait primerler kullanılarak sekansın koloni PCR ile amplifikasyonu yapıldı. Bu amplifikasyon sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü ile rekombinant vektörü taşıyan koloni tesbit edildi.

3.5.1. Koloni PCR

Bakteri kolonilerinin PCR'ı Taq polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Hem genin hemde vektörün primerleri kullanılarak PCR reaksiyonları kuruldu. PCR reaksiyonu kurmak için kolonilerden çok küçük miktar steril mikropipet ucu ile alındı. Pipet ucu PCR reaksiyonunu içeren PCR tüpüne yerleştirildi ve tüpün içerisinde dairesel hareketler yaptırıldı. Daha sonra Çizelge 3.3'de verildiği gibi belirlenen PCR reaksiyon şartlarına göre PCR işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.3. Doğru transformant seçimi için transformantlardan yapılan koloni PCR da kullanılan primerler ve reaksiyon şartları

Forward primer	Revers primer	PCR reaksiyon şartları
hCA II gen primer	CA II gen primer	Gene ait cDNA sekansının çoğaltılması için uygulanan şartlar
SUMO primer	CA II gen primer	Optimize edildi
hCA II gen primer	SUMO primer	Optimize edildi.

3.6. Plazmit DNA İzolasyonu

1. İçerisinde rekombinant vektörün varlığından emin olduğumuz koloniden 50 µg/ml kanamisin antibiyotiği içeren LB besiyerine ekim yapıldı ve bir gece 37°C 130 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. LB besiyerinde üretilen bu bakterilerden 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 2'şer ml pipetlendi.
2. 12 000xg'de 1 dk +4°C santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı.
3. Pelet üzerine resüspansiyon çözeltisi (200 µl) eklendi ve homojen oluncaya kadar karıştırıldı.
4. Elde edilen homojen çözeltiye lizis çözeltisi (200 µl) eklendi ve çözelti hemen karıştırıldı. 8 kez yavaşça alt üst yapıldı ve karışım temiz görünüme getirildi.
5. Bu karışıma nötralizasyon/bağlanma çözeltisi (350 µl) eklenerek yavaşça 6 kez alt üst edildi ardından 12 000xg de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda hücre kalıntıları, proteinler, lipidler, SDS ve kromozomal DNA çökeltili.
6. Mikrosantrifüj tüpünün içine spin kolon yerleştirildi. Bunun üzerine kolon hazırlama çözeltisinden (500 µl) eklendi ve 12 000xg de 1 dk santrifüj edildi ve alttaki sıvı atıldı. Bu işlem ile kolon hazır hale getirildi.
7. 5. aşama sonucunda elde edilen süpernatant, hazırlanmış kolona eklendi ve 12 000xg de 1 dk santrifüj edildi ve alttaki sıvı atıldı.
8. Kolona yıkama çözeltisi (750 µl) eklendi ardından 12 000xg de 1 dk santrifüj edildi ve yine alttaki sıvı atıldı.
9. Kolona herhangi bir çözelti eklemeyen 12 000xg de 1 dk santrifüj edildi.
10. Yeni bir mikrosantrifüj tüpüne kolon yerleştirildi ve kolona elüsyon tamponu eklendi. 11 400 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Kolona tutunan plazmitler bu şekilde elüe edildi. Elde edilen plazmitler -20°C de saklandı.

3.7. PCR Ürününün Ekspresyonu

3.7.1. BL21(DE3) bakterisine transformasyon basamakları

1. BL21(DE3) bakterileri buz üzerinde çözündürüldü.

2. Bakteriye verilecek plazmitin hacimsel oranı 1/5 olacak şekilde ayarlandı. 10 µl plazmit 50 µl'lik bakteriye pipetlendi ve kibarca karıştırıldı.
3. Bu karışım 30 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
4. 42°C deki su banyosunda 30 sn karıştırmadan bekletildi, hemen buz üzerine transfer edildi ve oda sıcaklığındaki S.O.C'den 250 µl eklendi.
5. Mikrosantrifüj tüpünün ağzı ve kenarları parafinle sıkıca sarıldı ve 37°C, 200 rpm'de 1 saat bekletildi.
6. Transformasyon reaksiyonunun tamamı 10 ml'lik LB'ye (50 µg/ml kanamisin ve %1 glukoz içeren) eklendi, 200 rpm'de 37°C de bir gece bekletildi.

3.7.2. Deneme (Pilot) ve büyük ölçekli ekspresyon

1. Transformasyon reaksiyonunun tamamı 10 ml'lik LB (50 µg/ml kanamisin ve %1 glukoz içeren)'ye aktarıldı. 37°C 200 rpm'de bir gece bekletildi.
2. Bir gecelik kültürden (500 µl) alınıp 10 ml'lik LB (50 µg/ml kanamisin ve %1 glukoz içeren)'ye inoküle edildi. OD₆₀₀ 0,4-0,6 oluncaya kadar 37°C 200 rpm'de 2 saat bekletildi.
3. Kültür sıvısı iki eşit hacime ayrıldı. Birine son konsantrasyonu 1 mM olacak kadar IPTG eklenirken diğerine herhangi bir müdahale yapılmadı.
4. Her iki kültürden de (500 µl) alındı maksimum hızda santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı. Peletler -20°C ye kaldırıldı. Bunlar sıfırıncı saat olarak adlandırıldı.
5. Geri kalan kültür sıvıları ise 37°C de çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Her saat sonunda 500 µl kültür alındı, tekrar santrifüj yapıldı, süpernatant uzaklaştırıldı ve peletler -20°C'ye kaldırıldı. Bu işleme 4-6 saat kadar devam edildi.

Pilot ekspresyonun ardından optimal şartlar belirlendi ve bu şartlarda büyük ölçekli ekspresyon yapıldı.

1. Transformasyon reaksiyonunun tamamı 10 ml'lik LB (50 µg/ml kanamisin ve %1 glukoz içeren)'ye aktarıldı. 37°C 200 rpm'de bir gece bekletildi. Yaklaşık OD₆₀₀ 1-2 olan ön kültür elde edildi.
2. Bu ön kültürden kültürden 1ml alınıp 50 ml'lik LB (50 µg/ml kanamisin ve %1 glukoz içeren)'ye inoküle edildi. Yaklaşık OD₆₀₀ 0,5 oluncaya kadar 37°C 225 rpm'de 2-3 saat bekletildi.
3. Kültüre son konsantrasyonu 1 mM olacak kadar IPTG eklendi. Önceden pilot ekspresyon çalışması ile optimize edilen koşullarda üretim gerçekleştirildi. 37°C'de 5 saat çalkalamalı inkübatörde ekspresyon gerçekleştirildi.
4. Ekspresyon gerçekleşen kültür 3000xg de 10 dk +4°C santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler -20°C'ye kaldırıldı.

3.8. Protein Tayini

3.8.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanarak yapılır (Segel 1968). Kromatografi işlemlerinde eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapılır ve fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak absorbandsları spektrofotometrede köre karşı okunur.

3.8.2. Bradford yöntemi ile protein tayini

Enzim çözeltilerinin protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Bu bağlanma sonucu oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Protein miktarını belirlerken şu prosedür takip edildi : 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve

100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 4,9 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edildi ve karıştırıldı. Köre karşı absorbens değerleri 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde okundu. Kör olarak 0,1 ml su ve 4,9 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı ve absorbens değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

3.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektroföresi ve Western Blot Tekniğinin Uygulanması

SDS PAGE tekniğı ile enzimin hem saflık derecesi hem de mol kütlesi (M_K) belirlenir (Laemmli 1970). Bu amaçla mol kütlesi bilinen standart proteinler ticari olarak temin edildi. Bu proteinler ve hCA II izoenzimi jelde birlikte yürütüldü. Örnekler jele yüklenmeden önce 2xSDS PAGE tamponu ile muamele edildi ve daha sonra 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Hazırlanan numuneler %10 ayırma jelinde yürütüldükten sonra boyama yapılarak bantlar tespit edildi. Standart proteinlerin R_f değerleri elektroföres fotoğrafları kullanılarak hesaplandı ve $\log M_K$ - R_f standart grafikleri çizildi. Daha sonra hCA II izoenziminin R_f değerleri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak bu izoenzimin $\log M_K$ 'sı belirlendi. Bu değerin antilogaritması alındığında ise numunenin molekül kütlesi hesaplanmış oldu.

Proteinlerin R_f değerleri:

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

formülü kullanılarak belirlenir.

X_e = Proteinlerin yürüme mesafesi

X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

Protein blotlama metodu olan western blot ile; Ni kolonundan elde edilen saf protein SDS PAGE jel elektroföresi ile molekül ağırlığıyla orantılı olarak, artı kutba (anot) doğru göç ederek ayrıldı. Ayrılan proteinler, destek membrana transfer edildi. Bu yöntem, otoradyografi, ultraviyole ışığı ya da peroksidaz reaksiyon ürünü ile

membrandaki proteinlerin molekül ağırlığını ve göreceli miktarını belirlemek için kullanıldı. SDS PAGE jel elektroforezi takip eden aşağıdaki 4 basamak ile tamamlandı.

- a) SDS PAGE jel elektroforezi ile molekül ağırlıklarına göre jel üzerinde ayrılmış proteinin, nitroselüloz veya poliviniliden diflorid (PVDF) membrana transfer edildiği blotlama basamağı,
- b) Blotlama işlemi sonrasında spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için membranda protein bağlanmayan bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplandığı bloklama basamağı,
- c) Spesifik antikorlarla inkübasyon basamağı,
- d) Membrandaki proteinlerin molekül ağırlığının ve göreceli miktarının belirlenmesi için kemilüminesans, floresans, kolorimetrik veya radyoaktif olarak görüntülenme basamağı (Budak 2009).

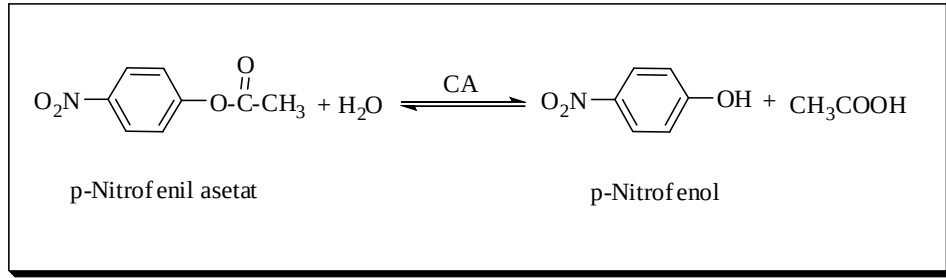
Hazırlanan SDS PAGE jelinin kuyularına yüklenen örnekler elektroforezde yürütüldü. SDS PAGE jelinde yürütülen rekombinant protein için uygun Anti-His (C-term)-HRP antikor (Invitrogen) ile western blot analizi yapıldı. Bu işlem için; SDS PAGE jel elektroforezinde yürütülen jel, musluk suyunda yıkandıktan sonra 1xtransfer tamponunda 5 dk bekletildi. Membranlar kullanılmadan önce metanol ile 5 dk muamele edildikten sonra 1xtransfer tamponu ile 5 dk muamele edildi. Semidry Blotlama cihazına sıra ile 4-5 parça blot kağıdı, nitroselüloz membran, jel ve 4-5 parça blot kağıdı konulup cihaz kapatıldı. 1 watt elektriksel alana konularak 75 dk blotlama işlemi yapıldı. Süre sonunda membran alınıp, bantların geçtiği yüze gelecek şekilde 10 ml bloklama tamponunda 1 saat oda sıcaklığında çevrilerek inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran, 20 ml PBST ile 2 kez 5 dk yavaşça çevrilerek yıkandı. 5 ml bloklama tamponuna 1 µl Anti-His (C-term)-HRP antikoru ilave edildi. 1 gece +4°C’de yavaş çalkalama ile inkübe edildi. Süre sonunda membran 20 ml PBST ile yavaşça çalkalanarak 2 kez 5 dk yıkandı. Femto ve Pico substratları (ECL reagent) kullanılarak antikorun kimyasal sinyal oluşturması sağlanarak görüntülendi. Ayrıca nitroselüloz membran Coomassie Brilliant Blue ile boyanarak da görüntülenmesi sağlanır (Budak 2009).

3.10. Karbonik Anhidraz Aktivite Tayini

Karbonik anhidraz enziminin aktivite yöntemlerinden biri olan hidrataz aktivitesi, CO₂'nin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan dolayı oluşan pH değişiminin brom timol mavi indikatörü kullanılarak belirlenmesi ve bu değişim sırasında geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır ve bu yöntem Wilbur-Anderson yöntemi olarak adlandırılır (Wilbur and Anderson 1948).

Hidrataz aktivitesini belirlemek için kör olarak hazırlanan tüpe 1ml 0,025 M veronal tamponu (pH 8,2), 0,1 ml %0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 ml saf su ve 2,5 ml CO₂ çözeltisi ilave edildi ve bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH 6,3) için geçen süre belirlendi (t₀). Numune tüpüne ise sudan 0,05 ml azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH 6,3) için geçen süre belirlendi (t_c). Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. $EU = (t_0 - t_c) / t_c$ formülüne göre, kullanılan enzim çözeltisi hacmi göz önüne alınarak enzim ünitesi hesaplandı (Maren 1960).

Esteraz aktivite tayini ise karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensip olarak karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve bu da 348 nm'de absorpsiyon vermektedir. ($\epsilon_{348} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Verpoorte *et al.* 1967). Bu aktivite yönteminin reaksiyon mekanizması Şekil 3.1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.1. p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması

Bu yöntemde ise kuvarz küvetlere tamponlanmış enzim çözeltisi (0,05 M Tris-SO₄ pH 7,4 içinde) ve 0,5 ml substrat konuldu ve 3 dakika sonra 25°C’da 348 nm’de absorbans değeri köre karşı okundu. Substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetat 27 mg alındı, 1 ml aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edilerek hazırlandı.

3.11. Doğal Şartlar Altında Kolondan Rekombinant Füzyon Proteinin Saflaştırılması

3.11.1. Probond kolonun hazırlanması

1. Şişedeki probond reçine ters çevrilip hafifçe vurularak süspanse edildi.
2. Saflaştırma kolonuna (10 ml’lik) 2 ml reçine döküldü. Reçinenin yer çekimi ile (5-10 dk) kolona yerleşimi sağlandı. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
3. Steril distile su (6 ml) ilave edildi, kolon materyali yeniden süspanse edildi ve kolona yerleşimi sağlandı. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
4. Doğal bağlanma tamponu (6 ml) ilave edildi, reçine yeniden süspanse edildi ardından kolona yerleşimi sağlandı. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı.

3.11.2. Hücre lizati hazırlama ve kolona yükleme

3.11.2.a Hücre lizati hazırlama

1. Optimal şartlarda geliştirilmiş 50 ml'lik kültür 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonucu süpernatant atıldı ve peletlerin üzerine 8 ml doğal bağlanma tamponu ilave edildi.
2. Lizozim (8 mg) eklendi ve 30 dk buz üzerinde inkübe edildi.
3. Buz üzerindeki lizat 3 kez 10'ar saniyelik periyotlarla sonike edildi ve sıvı azotla donduruldu. Daha sonra hızlı bir şekilde 37°C'de ısıtıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.
4. Elde edilen lizat 3000xg'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant taze tüpe alındı. Pelet atıldı.

3.11.2.b Kolona yükleme

1. Doğal şartlar altında hazırlanan hücre lizatının 8 ml'si hazırlanan saflaştırma kolonuna yüklendi.
2. Reçineyi lizat solüsyonunda süspanse halde tutmak için yavaşça bir saat +4°C'de çalkalandı. Histidin kuyruğuna sahip rekombinant hCA II ve mutantlarının Ni^{+2} ile kompleks yaparak reçineye tutunması sağlandı.
3. Kompleks oluşumundan sonra reçinenin yer çekimi (5-10 dk) veya düşük santrifüjle (800xg, 1 dk) kolona yerleşimi sağlandı. Rekombinant proteinlerin kolona bağlanıp bağlanmadığının analizini yapabilmek için süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı, +4°C'de SDS PAGE analizi için saklandı.
4. İstenmeyen proteinleri reçineden uzaklaştırmak için doğal yıkama tamponu (8 ml) ile yıkama yapıldı. Reçinenin yer çekimi (5-10 dk) veya düşük santrifüjle (800xg, 1 dk) kolona yerleşimi sağlandı. Kolona bağlanan rekombinant proteinlerin yıkama ile kaybedilebilirliği olduğundan süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı, +4°C'de SDS PAGE analizi için saklandı. Bu yıkama basamağı 3-4 kez tekrarlandı.
5. Yıkama basamağından sonra kolon dik pozisyonda kelepçe ile bağlandı. Alt uçtaki kapağı çıkarıldı ve doğal elüsyon tamponu (8-12 ml) ile proteinler elüe edildi.

Elüsyonlar 1'er ml'lik fraksiyonlar şeklinde toplandı. Elüantlarda kalitatif ve kantitatif protein analizi ve SDS PAGE analizi yapıldı.

Analiz ardından kalan elüantlar, +4°C'de stoklandı. Uzun süreli stoklama düşünüldüğünde -20°C'de fraksiyonlara gliserol eklenmesi gerekir. Ayrıca proteaz inhibitörü de ilave edilebilir.

Aynı rekombinant proteini saflaştırmak için reçine yeniden kullanılmak isteniyorsa 0,5 M NaOH ile 30 dk yıkanır ve reçine uygun bağlanma tamponunda dengelenir. Probond reçine aynı rekombinant proteini 3 veya 4 kez saflaştırmada kullanılabilir.

3.12. SUMO Füzyon Proteinin Sumo Proteaz ile Kesimi

Kolondan elüe edilen rekombinant füzyon proteinin protein miktarı, Bradford metodu için hazırlanan standart grafik (Şekil 4.9) kullanılarak belirlendi. Çizelge 3.4.'de verilen reaksiyon karışımına, belirlenen füzyon protein miktarına oranla SUMO proteaz enzimi eklendi ve füzyon protein 6 saat bu enzim ile inkübe edildi. Böylece SUMO hCA II füzyon proteinin füzyon kuyruğunun ayrılması sağlandı. Ardından kesim reaksiyonunun SDS PAGE ile analizi yapıldı.

Çizelge 3.4. SUMO füzyon proteinin sumo proteaz ile kesimi

Füzyon proteinin sumo proteaz ile kesim reaksiyonu	
SUMO Füzyon Proteini	20 µg
10xSUMO Proteaz Tamponu	20 µl
Sumo Proteaz (10 unit)	10 µl
Son hacim destile suyla 200 µl tamamlandı. +4°C'de 6 saat bekletildi. Sonra SDS PAGE yapıldı.	

3.13. Kinetik Çalışmalar

3.13.1. Rekombinant hCA II izoenzimi için optimum pH belirlenmesi

Rekombinant hCA II izoenziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 5,5- 6,0- 6,5- 7,0- 7,5 ve 8,0 olan Na-Fosfat ve 5,5- 6,0- 6,5- 7,0- 7,5 ve 8,0 olan Maleat-Tris tamponları hazırlandı. p-Nitrofenil asetat substratı kullanılarak estera aktivite ölçümleri yapıldı ve optimum pH değeri belirlenmeye çalışıldı.

3.13.2. Rekombinant hCA II izoenzimi için optimum sıcaklık belirlenmesi

Rekombinant hCA II izoenziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0°C-50°C arasında 5'er °C artırılmak suretiyle en uygun çalışma sıcaklığı belirlenmeye çalışıldı.

3.13.3. Rekombinant hCA II izoenzimi için optimum iyonik şiddeti belirlenmesi

Rekombinant hCA II izoenziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek amacıyla 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000 mM'lık Na-Fosfat tamponları hazırlandı. Hazırlanan tamponlarla aktivite ölçümleri yapılarak optimum iyonik şiddet değeri belirlenmeye çalışıldı.

3.13.4. p-Nitrofenilasetat subtratu için K_M , V_{max} ve k_{cat} değerlerinin belirlenmesi

Doğal tip ve mutant hCA II enzimlerinin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanması için gerçekleştirilecek deneylerde kullanılan enzim çözeltisinde kantitatif protein tayini yapılarak toplam enzim (E_T) miktarı belirlendi.

Enzimin turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T}$$

formülünden faydalanılarak hesaplandı.

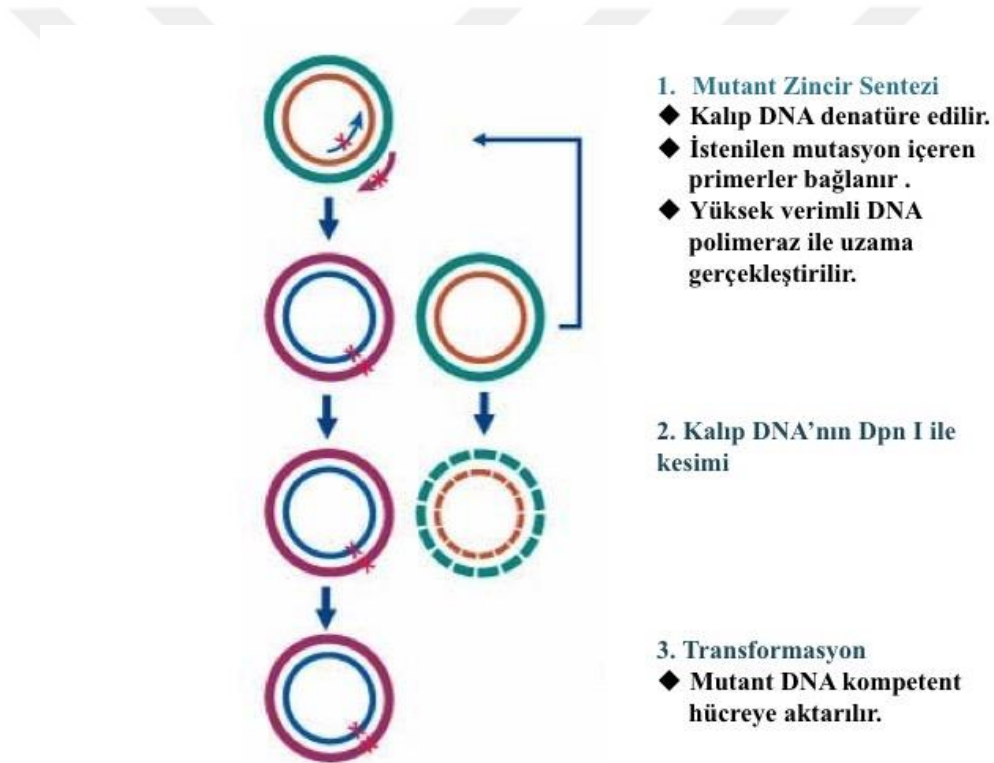
3.14. Hesaplamalı Mutagenез Çalışması

Kullanım izni alınmış Schrödinger Maestro programı kullanılarak ve hCA II proteinin benzensülfonamid bileşiği ile kristalizasyonu yapılmış olan PDB yapısı (2WEJ), protein hazırlama sihirbazı kullanılarak hazırlandı. Hazırlama işlemi yapılırken bağ düzeni oluşturuldu, yapıdaki eksik hidrojenler eklendi. Ayrıca bizim eklemmediğimiz yapının orijinalinde var olan hidrojenler uzaklaştırılmış oldu. Bu da hidrojen bağ optimizasyonunun sağlanması için önem arz etmektedir. Metaller ile yapılan bağlar kırıldı ve etkileşim haline getirildi. Metal ile komşu atomların formal yükleri ayarlandı. Kuvvet alanı metallere bir iyon gibi davrandı. 3.2 Å⁰luk alandaki sülfür atomları arasındaki bağlar belirlendi ve disülfid bağları oluşturuldu. Het gruplarından 5 Å⁰ uzaklıktaki su molekülleri silindi ve bu sayede ligandın bağlanması için gerekli olan su molekülleri alıkonuldu ve diğerleri uzaklaştırılmış oldu. Yapının incelenmesi yapıldı. Proteinin zincir adı, su molekül numaraları, residue (NH₂-CHR-COO-, -NH-CHR-COOH, -NH-CHR-COO-) numaraları ve Het (su ve residue hariç herşey) numaraları ve isimleri belirlendi. Düzeltmeler yapıldı. Hidrojen bağ optimizasyonu yapıldı ve sonuç olarak protein yapısı hazırlandı. Yapıda herhangi bir problem olup olmadığı incelendi ve sonuç olarak herhangi bir problem olmadığı belirlendi. Yapının Ramachandran plot analizi yapıldı.

Literatür araştırmaları sonucu hCA II'nin birçok aminoasitinin mutagenез çalışmasının yapıldığı fakat aktif bölgenin hidrofobik kısmının substrat bağlanma bölgesindeki triptofan 209 (Trp209) aminoasitinin W209V, W209L, W209I ve W209P mutantlarının oluşturulmadığı belirlendi. Trp 209 rezidüsünün mutagenез çalışması öncelikle kullanım izni alınmış Maestro Schrödinger bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Hesaplamalı mutagenез ile aromatik yapıya sahip bu rezidü alifatik aminoasitler ile yer değiştirdi ve enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen değişiklikler belirlendi.

3.15. Bölge Yönelimli Mutagenез Çalışması

Hesaplamalı olarak incelenen Trp 209 rezidüsünün mutantları “Quick Change Site Directed Mutagenesis” kiti kullanılarak PCR aracılığı ile bölge yönelimli mutagenез yöntemi ile elde edildi (Şekil 3.2). Mutasyonlar (Tyr209Leu, Tyr209Ile, Tyr209Pro, Tyr209Val), insan karbonik anhidraz enziminin aktif bölge oyuğunda; spesifik baz değişimine sahip oligonükleotidler ve kalıp olarak pET SUMO hCA II plazmiti kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. Bölge yönelimli mutagenез yöntemi

3.16. Mutajenik Primerlerin Tasarlanması

Mutagenез çalışmalarında kullanılan primer çiftleri, T_m sıcaklığının 80°C 'nin üzerinde olmamasına, mutagenез oluşturulacak bölgenin primerin ortasında olmasına ve % GC içeriğini göz önüne alarak tasarlanır. Bu çalışmada bu parametreler dikkate alınarak mutajenik primerler dizayn edildi.

3.17. Mutant DNA Sentez Reaksiyonu

Rekombinant hCA II enziminin mutant proteinlerini elde etmek için öncelikle mutant rekombinant DNA'ları elde etmek gerekir. Bu amaç için Çizelge 3.5'de verilen reaksiyon karışımı hazırlandı. Daha sonra her bir reaksiyon, Çizelge 3.6'da verilen PCR koşulları kullanılarak amplifiye edildi.

Çizelge 3.5. Mutant DNA sentez reaksiyonu

Mutant DNA sentez reaksiyonu
10xReaksiyon tamponu (5 µl)
pET SUMO+hCAII (100-400 ng)
Forward primer (125 ng)
Revers primer (125 ng)
dNTP karışımı (1 µl)
Quick çözeltisi (1,5 µl)
Toplam reaksiyon hacmi ddH ₂ O ile 50 µl'ye tamamlandı.
QuikChange Lightning Enzim (1 µl)

Çizelge 3.6. Bölge Yönelimli Mutagenез için PCR koşulları

	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
1	1	95°C	2 dk
2	18	95°C	20 sn
		60°C	10 sn
		68°C	3 dk
3	1	68°C	5 dk

3.18. Amplifikasyon Ürünlerinin Dpn I Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

Her bir örnek PCR işleminin ardından 2 dakika buz üzerinde tutuldu ve karışımın sıcaklığı $\leq 37^{\circ}\text{C}$ 'ye getirildi. Daha sonra herbir karışıma 1 µl Dpn I (10 U/µl)

restriksiyon enzimi eklendi ve 37°C de 1 saat inkübe edildi. Dpn I (hedef dizisi: 5'Gm6ATC-3'), metillenmiş ve hemimetillenmiş DNA için spesifik bir restriksiyon enzimi olup, parental DNA'nın (mutasyona uğramamış) kesimi ve mutasyonu içeren DNA'nın seçiminde kullanıldı.

3.19. XL1- Blue Süperkompetant Hücrelere Aktarım

XL1-Blue süperkompetant hücrelerine aktarım, ısı-şok yöntemi ile gerçekleştirildi. Daha sonra her bir transformasyon karışımına, önceden 42°C'de ısıtılmış olan 0,5 ml NZY⁺ Broth eklendi ve karışımlar 37°C'de çalkalayıcı inkübatör içerisinde 225 rpm'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnek karışımlar LB-kanamisin içeren agar plaklara ekildi ve 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

3.20. Dizi Analizi ile Mutasyonların Doğrulanması

Plaklara ekim ve inkübasyon sonrasında mutagenез karışımının bulunduğu plaktan 3 adet koloni seçildi ve 50 µg/ml kanamisin içeren LB sıvı besiyerine (5 ml) ekilerek, çalkalayıcı inkübatör içerisinde 225 rpm 37°C'de 16 saat inkübe edildi. Çoğaltılan plazmit DNA'sı, XL1-Blue süperkompetant bakteriden miniprep kit kullanılarak saflaştırıldı. Daha sonra hedeflenen mutasyonların varlığını doğrulamak için DNA dizi analizi yapıldı. hCA II'nin DNA dizi analizi için kullanılan primerleri Çizelge 3.7'de gösterildi.

Çizelge 3.7. DNA dizi analizi için kullanılan primerler

SUMO forward	5'-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3'
T7 revers	5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'

3.21. Rekombinant hCA II İzoenzimi Üzerine Yapılan İnhibisyon Çalışmaları

İnhibisyon etkisi gösteren maddeler için inhibitörsüz ortamda ve en az beş farklı inhibitör konsantrasyonunda enzimin aktivite tayini yapılarak % aktivite-[I] grafikleri çizildi, grafiklerden IC_{50} değerleri hesaplandı. Ayrıca herbir inhibitör için K_i değerleri Cheng-Prusoff eşitliği kullanılarak belirlendi.

3.22. Çalışmada Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

Agaroz jel elektroforezi ve SDS PAGE çözeltileri;

50xTAE tamponunun (Tris Asetat EDTA) hazırlanması: 242 g tris, 57,1 ml glasiyal asetik asit ve 200 ml 0,5 M EDTA, 500 ml steril saf su içerisinde çözüldükten sonra son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

1xTAE tamponunun (Tris-Asetat-EDTA) hazırlanması: 20 ml 50xTAE'den alındı ve saf su ile 1 litreye tamamlandı.

1xTBE tamponunun (Tris-Borik Asit-EDTA) hazırlanması: 89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA (pH=8,0) olacak şekilde dH₂O kullanılarak 1 litre tampon hazırlandı.

%1'lik Agaroz: 1xTAE çözeltisinden 100 ml alındı, üzerine 1g agaroz ilave edildi ve 1,5-2 dk mikro dalga fırında ısıtılarak hazırlandı.

SDS PAGE analizi için ayırma jeli: 5 ml 1 M'lik Tris/HCl (pH 8,8), 4,4 ml %30'luk akrilamid-bisakrilamid, 0,2 ml %10'luk SDS, 0,13 ml TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlen diamin) ve 3,13 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0,07 ml %10 'luk amonyum persülfat ilave edildi.

SDS PAGE analizi için yığma jeli: 0,44 ml 1 M'lik tris/HCl (pH 6,8), 0,8 ml %30 akrilamid-bisakrilamid, 0,03 ml %10'luk SDS, 0,03 ml TEMED ve 2,45 ml saf su alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış, 0,05 ml %10'luk amonyum persülfat ilave edildi.

2xSDS PAGE numune yükleme tamponu: 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 2,0 ml Gliserol (%100), 0,4 ml β -merkaptoetanol, 0,02 g brom fenol mavisi ve 0,4 g SDS katıldı. Son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Alikuitlere ayrıldı ve -20°C'de saklandı.

10xTris-Glisin elektroforez çözeltisi: 30,2 g tris, 188 g glisin, 100 ml %10 SDS 1 litre saf su içersinde çözüldü.

SDS PAGE yürütme tamponu: 3 g Tris ve 14,2 g glisin 100 ml suda çözüldü ve daha sonra bunun üzerine 10 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

SDS PAGE sabitleştirme çözeltisi: %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde hazırlandı.

SDS PAGE boyama çözeltisi: 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde hazırlandı.

SDS PAGE yıkama çözeltisi: %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde hazırlandı.

Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi: 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı.

1 M Tris-HCl pH=8,8 tampon çözeltisi: 12,1 g Tris 90 ml suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

1 M Tris-HCl pH=6,8 tampon çözeltisi: 2,42 g Tris 5 ml suda çözülecek 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 20 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

%30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi: 6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid alınıp 13,84 ml suda çözülerek hazırlandı.

%10'luk SDS çözeltisi: 0,5 g SDS alınıp 4,5 ml suda çözülerek hazırlandı.

Standart serum albumin (BSA) çözeltisi (1 mg/ml): 25 mg standart serum albuminin 25 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

10xTransfer Çözeltisi: 29 g glisin, 58 g tris, 3,7 g SDS 900 ml saf su içerisinde çözüldü ve pH 8,3'e ayarlandıktan sonra son hacim 1 lt'ye tamamlandı.

1xTransfer Çözeltisi: 10x transfer çözeltisinden 100 ml alındı. 700 ml saf su ve 200 ml metanol ilave edildi.

PBS Çözeltisi (Phosphate-Buffered Saline): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 1 litre destile su içerisinde çözüldü.

PBST (Phosphate-Buffered Saline+Tween 20): PBS çözeltisi içerisine %0,05 oranında Tween-20 ilave edilerek hazırlandı.

Bloklama Tamponu: 10 ml PBST çözeltisine %5 oranında yağsız süt tozu ilave edilerek hazırlandı.

Ni reçine kolonu ile saflaştırma sırasında ve kinetik çalışmalarda kullanılan çözeltiler;

50 mM Tris-SO₄ (pH 7,5–9,0): 0,6055 g (0,005 mol) Tris 80 ml saf su içerisinde çözülerek 1 M H₂SO₄ ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

50 mM potasyum fosfat (pH 5,0–7,5): 0,68 g (0,005 mol) potasyum fosfat 80 ml saf su içerisinde çözülerek 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

0,05 M Tris-SO₄ (pH 7,4): 6,055 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

%0,02'lik NaN₃ çözeltisi: 20 mg NaN₃ alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Lizis Tamponu: 50 mM potasyum fosfat (pH 7,8), 400 mM NaCl, 100 mM KCl, %10 gliserol, %0,5 Triton X-100, 10 mM imidazol

5xDoğal Saflaştırma Tamponu: 250 mM NaH₂PO₄ (pH 8), 2,5 M NaCl

3M İmidazol (pH 6): 3 M İmidazole, 500 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄ tamponu (pH 6)

İmidazolsüz Doğal Bağlama Tamponu; 1xDoğal saflaştırma tamponu'nun 30 ml'si kullanılır.

İmidazollü Doğal Bağlama Tamponu: Kontaminasyona neden olan proteinlerin bağlanmasını aza indirmek için imidazollü doğal bağlanma tamponu hazırlandı. 10 mM içeren 30 ml doğal bağlanma tamponu hazırlamak için; 30 ml 1xdoğal saflaştırma

tamponu, 100 µl 3 M imidazol (pH 6,0) iyice karıştırıldı ve pH, NaOH veya HCl ile 8,0'e ayarlandı.

Doğal yıkama tamponu: 20 mM imidazol içeren 50 ml doğal yıkama tamponu hazırlamak için; 50 ml 1xdoğal saflaştırma tamponu 335 µl 3 M imidazol (pH 6,0) iyice karıştırıldı ve pH, NaOH veya HCl ile 8,0'e ayarlandı.

Doğal elüsyon tamponu: 250 mM imidazol içeren 15 ml doğal elüsyon tamponu hazırlamak için; 13,75 ml 1xdoğal saflaştırma tamponu 1,25 ml 3 M imidazol (pH 6,0) iyice karıştırıldı ve pH, NaOH veya HCl ile 8,0'e ayarlandı.

IPTG stok çözeltisinin (0,1 M) hazırlanması: 1,2 g izopropiltiyogalaktozid (IPTG; Cat.# V3951) alındı, son hacim 50 ml olacak şekilde üzerine deiyonize edilmiş su eklendi. Sterilize edildi ve +4°C'de saklandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. hCA II Gen Bölgesinin ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi

NCBI veri tabanı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) insan CA II genine ait gen bölgesi (1666 nükleotid) belirlendi ve aşağıda verildi. Bu gen bölgesinin protein kodlama bölgesi (783 nükleotid) koyu yazı tipiyle gösterildi.

NM_000067.2 Homo sapiens carbonic anhydrase II (CA2), mRNA

CCT CCC CTT GTC GCC TAG GTC CAC CCG AGC CCC CTC CCC CGG GCC
 GCC CCC GAG CAC GAA GTT GGC GGG AGC CTA TAA AAG CTG GTG CCG
 GCG CGA CCC GCG GAC ACA CAG TGC AGG CGC CCA AGC CGC CGC CGC
 CAG ATC GGT GCC GAT TCC TGC CCT GCC CCG ACC GCC AGC GCG ACC
ATG TCC CAT CAC TGG GGG TAC GGC AAA CAC AAC GGA CCT GAG
CAC TGG CAT AAG GAC TTC CCC ATT GCC AAG GGA GAG CGC CAG
TCC CCT GTT GAC ATC GAC ACT CAT ACA GCC AAG TAT GAC CCT
TCC CTG AAG CCC CTG TCT GTT TCC TAT GAT CAA GCA ACT TCC
CTG AGG ATC CTC AAC AAT GGT CAT GCT TTC AAC GTG GAG TTT
GAT GAC TCT CAG GAC AAA GCA GTG CTC AAG GGA GGA CCC CTG
GAT GGC ACT TAC AGA TTG ATT CAG TTT CAC TTT CAC TGG GGT
TCA CTT GAT GGA CAA GGT TCA GAG CAT ACT GTG GAT AAA AAG
AAA TAT GCT GCA GAA CTT CAC TTG GTT CAC TGG AAC ACC AAA
TAT GGG GAT TTT GGG AAA GCT GTG CAG CAA CCT GAT GGA CTG
GCC GTT CTA GGT ATT TTT TTG AAG GTT GGC AGC GCT AAA CCG
GGC CTT CAG AAA GTT GTT GAT GTG CTG GAT TCC ATT AAA ACA
AAG GGC AAG AGT GCT GAC TTC ACT AAC TTC GAT CCT CGT GGC
CTC CTT CCT GAA TCC TTG GAT TAC TGG ACC TAC CCA GGC TCA
CTG ACC ACC CCT CCT CTT CTG GAA TGT GTG ACC TGG ATT GTG
CTC AAG GAA CCC ATC AGC GTC AGC AGC GAG CAG GTG TTG AAA
TTC CGT AAA CTT AAC TTC AAT GGG GAG GGT GAA CCC GAA GAA
CTG ATG GTG GAC AAC TGG CGC CCA GCT CAG CCA CTG AAG AAC

AGG CAA ATC AAA GCT TCC TTC AAA TAA GAT GGT CCC ATA GTC TGT
 ATC CAA ATA ATG AAT CTT CGG GTG TTT CCC TTT AGC TAA GCA CAG
 ATC TAC CTT GGT GAT TTG GAC CCT GGT TGC TTT GTG TCT AGT TTT
 CTA GAC CCT TCA TCT CTT ACT TGA TAG ACT TAC TAA TAA AAT GTG
 AAG ACT AGA CCA ATT GTC ATG CTT GAC ACA ACT GCT GTG GCT GGT
 TGG TGC TTT GTT TAT GGT AGT AGT TTT TCT GTA ACA CAG AAT ATA
 GGA TAA GAA ATA AGA ATA AAG TAC CTT GAC TTT GTT CAC AGC ATG
 TAG GGT GAT GAG CAC TCA CAA TTG TTG ACT AAA ATG CTG CTT TTA
 AAA CAT AGG AAA GTA GAA TGG TTG AGT GCA AAT CCA TAG CAC AAG
 ATA AAT TGA GCT AGT TAA GGC AAA TCA GGT AAA ATA GTC ATG ATT
 CTA TGT AAT GTA AAC CAG AAA AAA TAA ATG TTC ATG ATT TCA AGA
 TGT TAT ATT AAA GAA AAA CTT TAA AAA TTA TTA TAT ATT TAT AGC
 AAA GTT ATC TTA AAT ATG AAT TCT GTT GTA ATT TAA TGA CTT TTG
 AAT TAC AGA GAT ATA AAT GAA GTA TTA TCT GTA AAA ATT GTT ATA
 ATT AGA GTT GTG ATA CAG AGT ATA TTT CCA TTC AGA CAA TAT ATC
 ATA ACT TAA TAA ATA TTG TAT TTT AGA TAT ATT CTC TAA TAA AAT
 TCA GAA TTC T

4.2. hCA II Enzime Ait Aminoasit Dizisi

hCA II enziminin translasyon sonucu oluşan aminoasit dizisi aşağıdaki gibidir.

"MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYD
 QATSLRILNNGHAFNVEFDDSDKAVLKGGPLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGS
 EHTVDKKKYAAELHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGL
 QKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSLTTPPLLEC VTWIV
 LKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASF"

4.3. hCA II Genine Ait Primerler

Primerler protein kodlama bölgesinin başından ve sonundan tüm geni amplifiye edecek

şekilde seçildi. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, T_m sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotidlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Bu kriterler göz önüne alınarak aşağıda verilen forward ve revers primerler dizayn edildi. Ayrıca tasarlanan primerler databanklarda bulunan DNA sekansları ile blastlanarak, hCA II geni ile en yüksek benzerliğe sahip olduğu tespit edildi.

İnsan CA II geni için kullanılan forward primer:

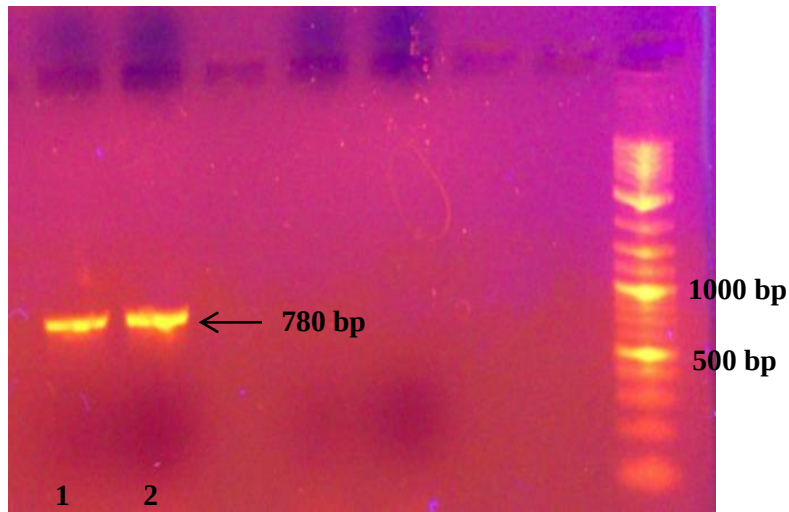
ATG TCC CAT CAC TGG GGG TA

İnsan CA II geni için kullanılan revers primer:

TTA TTT GAA GGA AGC TTT GAT TTG CCT GTT

4.4. hCA II Geninin PCR Sonucu

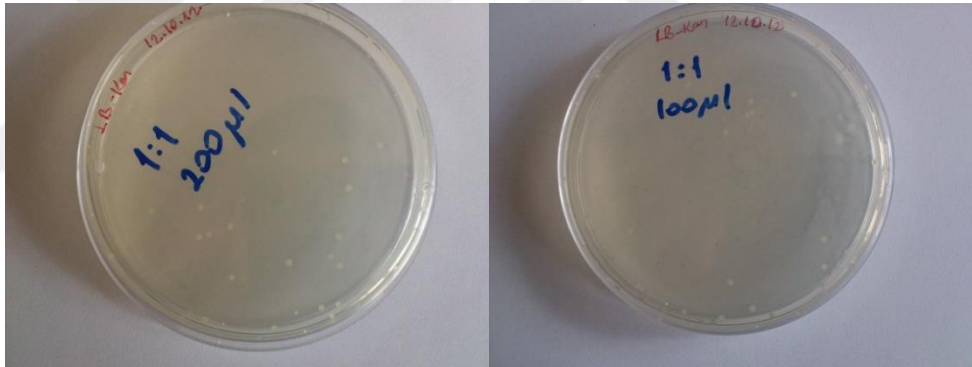
Gene spesifik primerlerin bağlanma sıcaklığı bilinmediği için 58°C ile 63°C arası gradientli PCR yapıldı. Primerlerin bağlanma sıcaklığı 60°C olarak belirlendi. PCR sonucu agaroz jelde gösterildi ve PCR ile amplifiye edilen DNA büyüklüğünün 780 bp olduğu doğrulandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı 1,2 nolu kuyular hCA II geni, 8 nolu kuyu markır

4.5. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi ve One Shot® Mach1™-T1R *E. coli* Hücrelerine Transformasyon Sonuçları

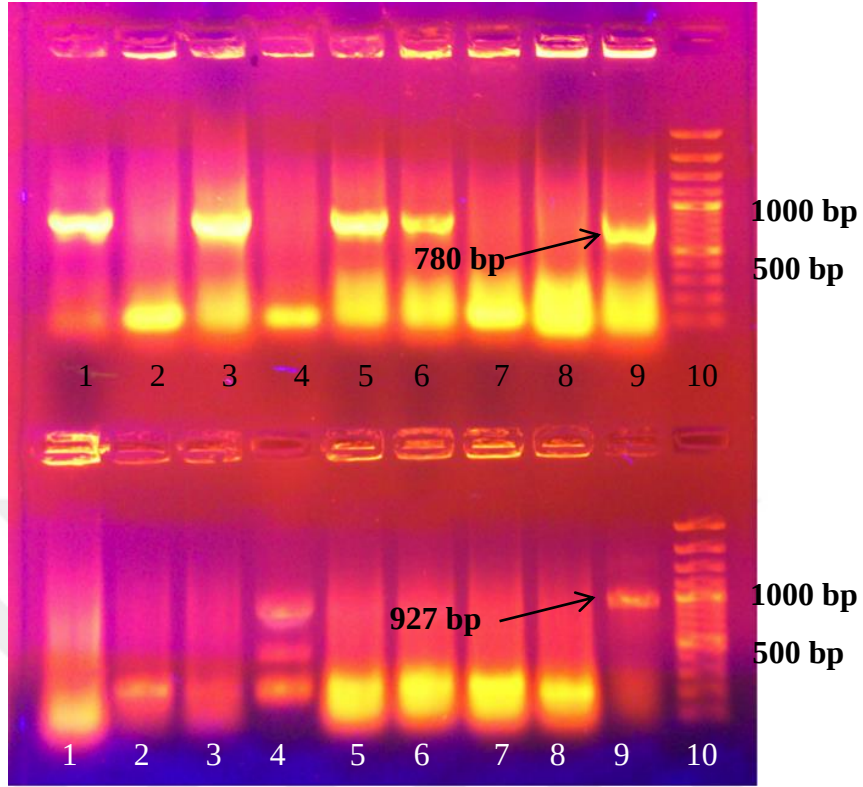
hCA II enziminin üretimi ile ilgili gen bölgesi (cDNA) dizayn edilen forward ve revers primerler ile PCR'da çoğaltıldıktan sonra ligasyon yapıldı. İnsert edilecek gen ve vektör DNA reaksiyon karışımına insert/vektör: 1/1 olacak şekilde ilave edildi. Ligasyon reaksiyon karışımı 16°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonucunda rekombinant vektör elde edildi. Bu rekombinant vektör ısı şokuyla One Shot® Mach1™-T1R *E. coli* hücrelerine aktarıldı ve ardından bakteriler içerisinde kanamisin antibiyotiği bulunan katı besiyerlerine ekildi. Etüvde 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı ve inkübasyonun ardından koloniler gözlemlendi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. LB-Agar fotoğrafı *E.coli* (One Shot® Mach1™-T1R)

4.6. Koloni PCR Sonuçları

E. coli (One Shot® Mach1™-T1R) hücrelerindeki transformantların doğruluğunu tespit etmek amacıyla dokuz farklı koloniye değdirilen pipet uçları PCR çözeltisine bırakılarak genin forward ve revers primerleriyle ayrıca genin forward, vektörün revers primeri ile koloni PCR yapıldı. Şekil 4.3 incelendiğinde 1, 3, 5, 6 ve 9 nolu kolonilerin genin primerleriyle beklenen büyüklükte (780 bp) bant oluşturduğunu, fakat vektörün primerleriyle sadece 9 nolu koloninin istenilen büyüklükte (927 bp) bant gösterdiği gözlemlendi.

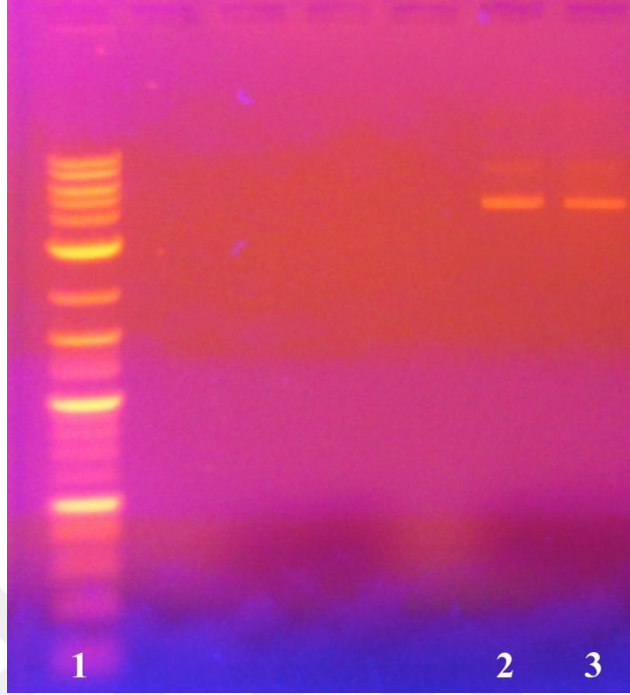


Şekil 4.3. Koloni PCR agaroz jel elektroforezi fotoğrafı

Üstteki Jel **1**; 1.koloni CAF,CAR **2**; 2.koloni CAF,CAR; **3**; 3.koloni CAF,CAR; **4**; 4.koloni CAF,CAR; **5**; 5.koloni CAF,CAR; **6**; 6.koloni CAF,CAR; **7**; 7.koloni CAF,CAR; **8**; 8.koloni CAF,CAR; **9**; 9.koloni CAF,CAR; **10**; Markır *Altındaki Jel* **1**; 1.koloni CAF,SUMOR **2**; 2.koloni CAF,SUMOR; **3**; 3.koloni CAF,SUMOR **4**; 4.koloni CAF,SUMOR; **5**; 5.koloni CAF,SUMOR **6**; 6.koloni CAF,SUMOR **7**; 7.koloni CAF,SUMOR; **8**; 8.koloni CAF,SUMOR **9**; 9.koloni CAF,SUMOR; **10**; Markır

4.7. İzole edilen Plazmit DNA

Koloni PCR sonuçları incelendiğinde, hem genin hemde vektörün primerleriyle istenilen büyüklükte ürün gözlenen 9 nolu koloni doğru transformant kabul edildi. Bu pozitif koloniden plazmit izole edildi ve bu plazmitlerin varlığını test etmek amacıyla agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. İzole edilen plazmitin agaroz jel elektroforezi fotoğrafı; 1 nolu kuyu markır, 2,3 nolu kuyu plazmit

4.8. SUMO Vektörüne Aktarılan Genin DNA Dizi Analizi

E. coli (One Shot® Mach1™-T1R) bakteri kolonisinden izole edilen SUMO hCA II plazmitinin, DNA dizilimi bir ticari firma tarafından (İONTEK) belirlendi. Alınan sekans sonuçları ile klonlanan bölgenin hCA II olduğu doğrulandı. Şekil 4.5'deki blastlama sonucu incelendiğinde %100 doğru gen bölgesinin çoğaltıldığı gözlemlendi. Bu çalışmada mutant DNA'ların eldesi düşünüldüğünden doğal tip hCA II'nin rekombinant oluşumunda herhangi baz değişikliği olmaması gerekmektedir.

```

Query 1   ATGTCCCATCACTGGGGGTACGGCAAACACAACGGACCTGAGCACTGGCATAAGGACTTC 60
Sbjct 181 ATGTCCCATCACTGGGGGTACGGCAAACACAACGGACCTGAGCACTGGCATAAGGACTTC 240
Query 61  CCCATTGCCAAGGGAGAGCGCCAGTCCCCTGTTGACATCGACACTCATACAGCCAAGTAT 120
Sbjct 241 CCCATTGCCAAGGGAGAGCGCCAGTCCCCTGTTGACATCGACACTCATACAGCCAAGTAT 300
Query 121 GACCCCTTCCCTGAAGCCCTGTCTGTTTCCTATGATCAAGCAACTTCCCTGAGGATCCTC 180
Sbjct 301 GACCCCTTCCCTGAAGCCCTGTCTGTTTCCTATGATCAAGCAACTTCCCTGAGGATCCTC 360
Query 181 AACAAATGGTCATGCTTTCAACGTGGAGTTTGATGACTCTCAGGACAAAGCAGTGCTCAAG 240
Sbjct 361 AACAAATGGTCATGCTTTCAACGTGGAGTTTGATGACTCTCAGGACAAAGCAGTGCTCAAG 420
Query 241 GGAGGACCCCTGGATGGCACTTACAGATTGATTCAGTTTCACTTTCACTGGGGTTCACTT 300
Sbjct 421 GGAGGACCCCTGGATGGCACTTACAGATTGATTCAGTTTCACTTTCACTGGGGTTCACTT 480
Query 301 GATGGACAAGGTTTCAAGCATACTGTGGATAAAAAGAAATATGCTGCAGAACTTCACTTG 360
Sbjct 481 GATGGACAAGGTTTCAAGCATACTGTGGATAAAAAGAAATATGCTGCAGAACTTCACTTG 540
Query 361 GTTCACTGGAACACCAAATATGGGGATTTTGGGAAAGCTGTGCAGCAACCTGATGGACTG 420
Sbjct 541 GTTCACTGGAACACCAAATATGGGGATTTTGGGAAAGCTGTGCAGCAACCTGATGGACTG 600
Query 421 GCCGTTCTAGGTATttttttGAAGGTTGGCAGCGCTAAACCGGGCCTTCAAGAAAGTTGTT 480
Sbjct 601 GCCGTTCTAGGTATTTTTGAAGGTTGGCAGCGCTAAACCGGGCCTTCAAGAAAGTTGTT 660
Query 481 GATGTGCTGGATTCCATTAAAACAAAGGGCAAGAGTGCTGACTTCACTAACTTCGATCCT 540
Sbjct 661 GATGTGCTGGATTCCATTAAAACAAAGGGCAAGAGTGCTGACTTCACTAACTTCGATCCT 720
Query 541 CGTGGCCTCCTTCTGAATCCTTGGATTACTGGACCTACCCAGGCTCACTGACCACCCCT 600
Sbjct 721 CGTGGCCTCCTTCTGAATCCTTGGATTACTGGACCTACCCAGGCTCACTGACCACCCCT 780
Query 601 CCTCTTCTGGAATGTGTGACCTGGATTGTGCTCAAGGAACCCATCAGCGTCAGCAGCGAG 660
Sbjct 781 CCTCTTCTGGAATGTGTGACCTGGATTGTGCTCAAGGAACCCATCAGCGTCAGCAGCGAG 840
Query 661 CAGGTGTTGAAATCCGTAAACTTAACTTCAATGGGGAGGGTGAACCCGAAGAACTGATG 720
Sbjct 841 CAGGTGTTGAAATCCGTAAACTTAACTTCAATGGGGAGGGTGAACCCGAAGAACTGATG 900
Query 721 GTGGACAACCTGGCGCCAGCTCAGCCACTGAAGAACAGGCAAATCAAAGCTTCCTTCAA 780
Sbjct 901 GTGGACAACCTGGCGCCAGCTCAGCCACTGAAGAACAGGCAAATCAAAGCTTCCTTCAA 960
Query 781 TAA 783
Sbjct 961 TAA 963

```

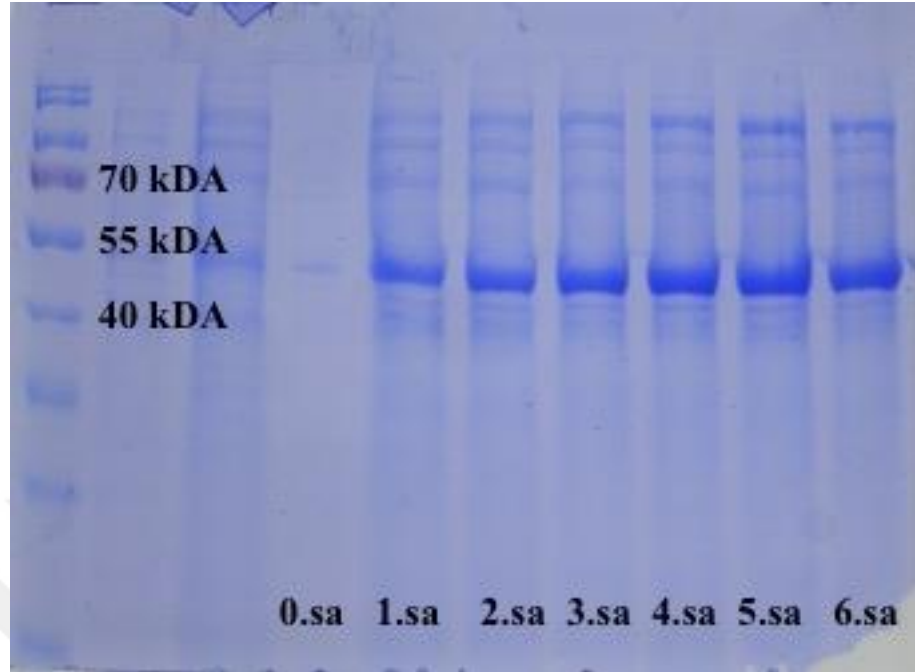
Şekil 4.5. Blastlama sonucu

Rekombinant plazmitin içerisindeki hCA II geninin sekans analizi doğrulandıktan sonra, bu plazmit BL21(DE3) bakterilerine transform edildi ve hCA II enziminin ekspresyonu gerçekleştirilmek üzere transformantlar LB besiyerine aktarıldı ve ön kültür elde edildi. Bu enzimin ekspresyon şartlarını optimize etmek için pilot ekspresyon çalışması yapıldı.

4.9. Deneme (Pilot) Ekspresyon

hCA II enziminin pilot ekspresyon analizi yapılırken elde edilen bir gecelik ön kültür başka sıvı besiyerine inoküle edildi. Ardından kültür iki eşit hacime ayrıldı ve biri IPTG ile indüklenirken diğeri indüklenmedi. İndükleme yapılan kültürün IPTG konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde ayarlandı. İndükleme yapılır yapılmaz kültürden 500 µl alındı ve santrifüj edildi. 6 saat kadar hücre toplamaya devam edildi. Elde edilen hücreler lizozim enzimi ile parçalandı. Lizatlar elde edildi ve IPTG ile indüklenmeyen bakteri lizatları kontrol olarak kullanıldı. Optimum ekspresyon saatini belirlemek için bu lizatların SDS PAGE analizi (Şekil 4.6) yapıldı.

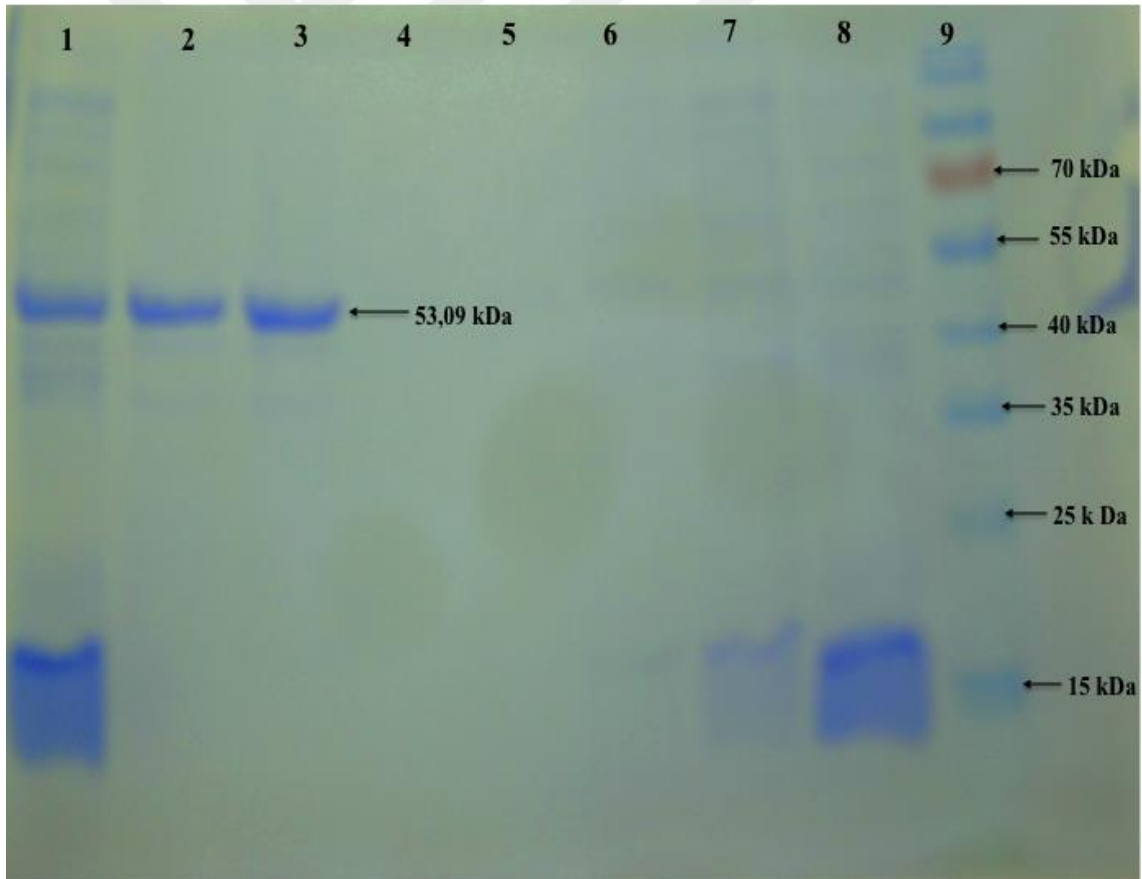
Şekil 4.6. incelendiğinde en iyi ekspresyon saati 5 saat olarak belirlendi. Ayrıca pilot ekspresyon sonucu ekspre olan SUMO hCA II enziminin büyüklüğü SDS PAGE analizyle doğrulandı. Bu füzyon enzimin tam olarak büyüklüğü büyük ölçekli ekspresyon sonucunda elde edilen SDS PAGE görüntüsünden R_f değerleri hesaplanarak belirlendi.



Şekil 4.6. Pilot ekspresyon SDS PAGE sonucu.

Sonuç olarak büyük ölçekli ekspresyon yapmak için 37°C’de 5 saat ve 1mM IPTG ile indüklemenin protein ekspresyonu için en ideal şartlar olduğuna karar verildi. Bu şartlar kullanılarak büyük ölçekli ekspresyon yapıldı. İçerisinde eksprese proteinlerin bulunduğu hücreler elde edildi. Bu hücreler lizozim enzimi kullanılarak parçalandı. Fakat büyük ölçekli ekspresyonda hücre sayısı çok olduğundan enzimin yanı sıra hem sonikasyon hem de sıvı azotla dondur çözündür tekniği kullanılarak lizat elde edildi. Elde edilen lizat doğal şartlar altında hazırlanmış Ni^{+2} reçine kolonuna yüklendi. Reçine ile lizat çalkalamalı olarak +4°C bir saat bekletildi. Reçinede bulunan Ni^{+2} metali ile His kuyruğuna sahip eksprese olan hCA II arasında kompleks oluştu ve bu kompleks oluşumu sayesinde hCA II kolona tutundu. Kolona tutunmayan enzimin ortamda kalıp kalmadığının analizini yapmak için kolona bağlanmayan kısım SDS PAGE jelinde yürütüldü (Şekil 4.7). Herhangi bir bant gözlenmedi. Bu sonuç bize reçinenin tutma kapasitesinin doğru hesaplandığı sonucunu verdi. Ardından yıkama tamponları kullanılarak yıkama gerçekleştirildi ve bu işlem üç kez tekrarlandı. Kolonun tuttuğu histidin kuyruğuna sahip hCA II’nin yıkama ile uzaklaşabilme ihtimali olduğundan yıkama sonucu elde edilen çözeltilerde SDS PAGE jelinde yürütüldü (Şekil 4.7) ve

sonuç olarak herhangi bir bant gözlemlenmedi. Yıkama işlemlerinin ardından kolona tutunmuş hCA II, kolon dik pozisyona getirilerek elüe edildi. Elüsyonların 280 nm’de kalitatif protein analizi yapıldı ve yüksek absorbans değerine sahip elüantlar birleştirildi. Bu elüantlarda kantitatif protein analizi yapıldı ve protein varlığı tespit edildi. Protein varlığı tespit edilirken hazırlanan standart grafikten faydalanıldı (Şekil 4.9.). Ardından bu proteinin eksprese etmek istediğimiz hCA II olup olmadığını anlayabilmek için SDS PAGE analizi ile proteinin kDa değeri belirlendi (Şekil 4.7). Bu elüantlarda 6xHis kuyruğunu içeren rekombinant hCA II enziminin varlığını tespit etmek için, Anti-His (C-term)-HRP antikorunu kullanarak western blot analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar SDS PAGE sonuçlarını desteklemiş oldu (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Safılaştırılan SUMO Füzyon hCA II SDS PAGE fotoğrafı

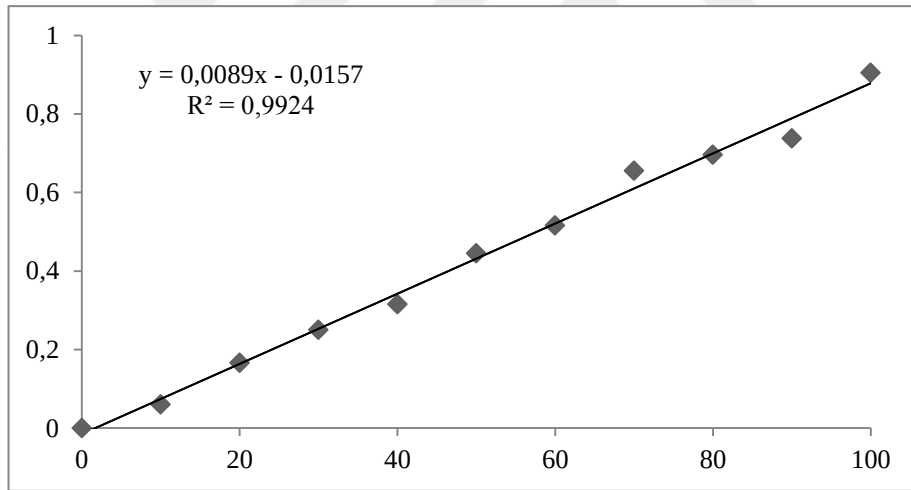
*1 nolu kuyu lizat, 2-3 nolu kuyular elüsyonlar, 4-5-6 nolu kuyular kolona bağlanmayan kısım, 7-8 nolu kuyular yıkama, 9 nolu kuyu markır



Şekil 4.8. Safılaştırılan SUMO Füzyon hCA II western blot sonucu

4.10. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik

Ni^{+2} reçine kolonu vasıtasıyla elde edilen elüantlarda kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemde kullanılmak amacıyla standart grafik hazırlandı (Şekil 4.9) ve bu standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.

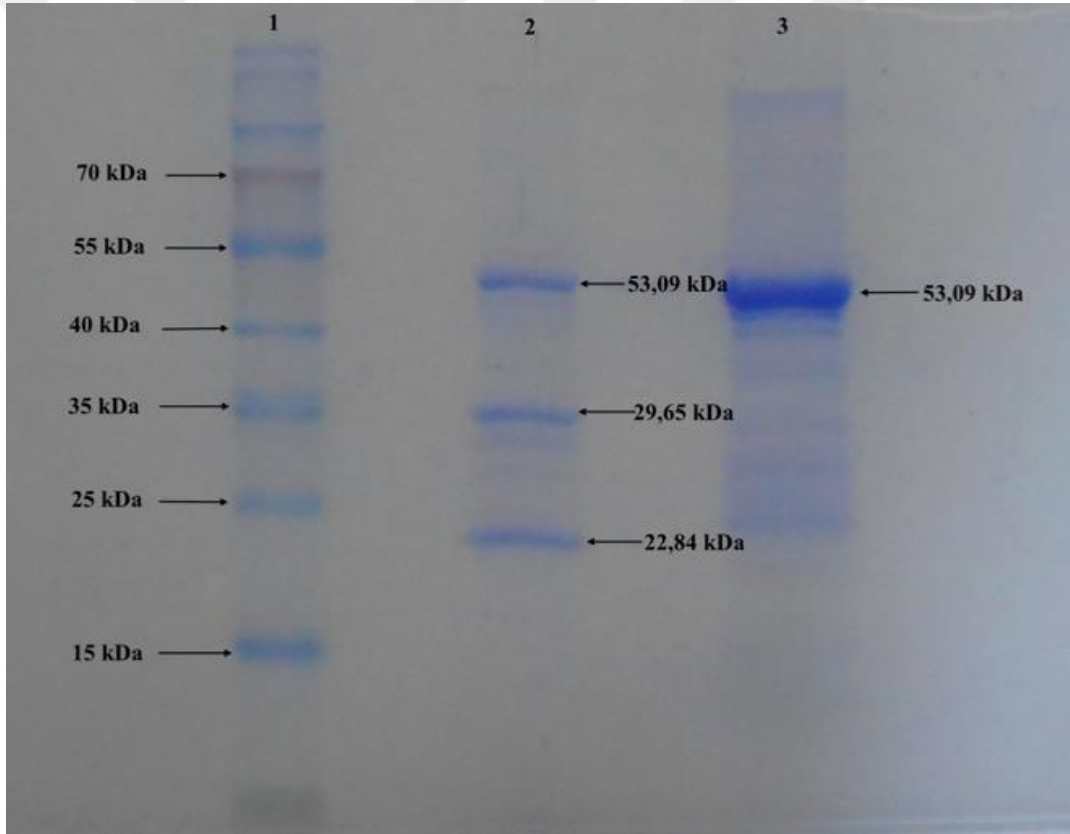


Şekil 4.9. Bradford metotunda kullanılan standart grafik

4.11. SUMO hCA II Füzyon Proteinin SUMO Proteazla Kesim Sonuçları

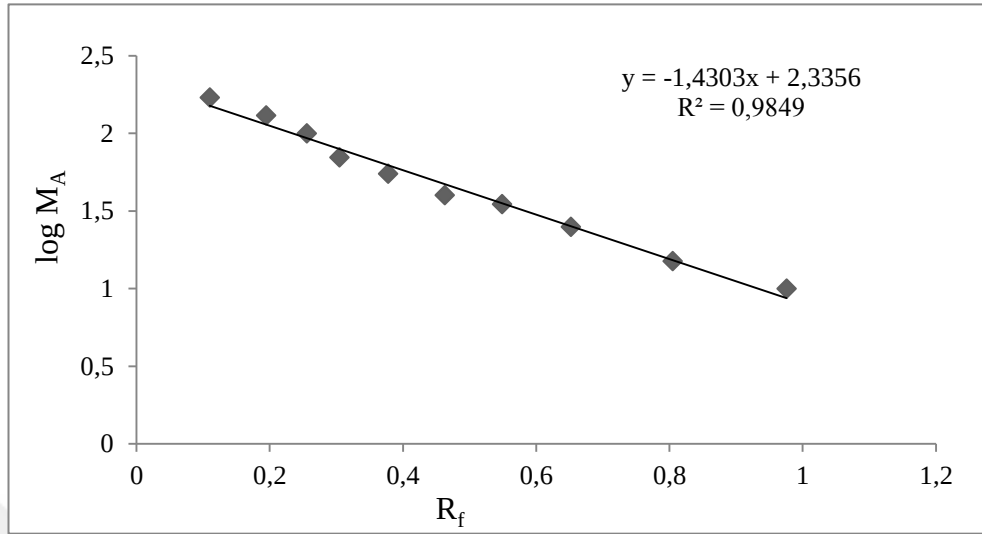
SUMO füzyon ekspresye yöntemi kullanılarak ekspresye olan SUMO hCA II proteinin miktarı Bradford metoduyla hazırlanan standart grafik kullanılarak belirlendi ve SUMO proteazla kesim işlemi füzyon proteinin miktarına kıyasla yapıldı. Bu proteaz enzimine SUMO hCA II füzyon proteini 6 saat maruz bırakıldı ve böylece kesim işlemi gerçekleştirildi. Bu kesim işleminin sonucu oluşan proteinler SDS PAGE analizi ile

gözlemlendi (Şekil 4.10). Bu şekil incelendiğinde SUMO proteinin hCA II enziminden ayrıldığı gözlenmektedir. Fakat ortamda kesilmeden kalan SUMO hCA II füzyon proteinin varlığı belirlendi. Bu sonuç bize SUMO proteaz enziminin ortamdaki bütün füzyon proteini kesmesi için yeterli olmadığını göstermektedir. Çözüm olarak ortama daha fazla SUMO proteaz eklenmelidir. Ayrıca diğer önemli kısım SUMO ve hCA II enzimlerinin ayrı ayrı molekül kütlelerini belirlemektir. Bu amaçla log M_K-R_f grafiği çizildi (Şekil 4.11) ve bu grafikten enzimlerin kDa değerleri hesaplandı. Füzyon hCA II 53,09 kDa iken hCA II izoenzimi 29,65 kDa olarak belirlendi (Çizelge 4.1).



Şekil 4.10. SUMO proteaz ile kesilen füzyon proteinin SDS PAGE fotoğrafı

*1 nolu kuyu markır, 2 nolu kuyu; SUMO proteaz ile kesilmiş füzyon protein, 3 nolu kuyu SUMO hCA II proteini



Şekil 4.11. Safılaştırılan SUMO hCA II füzyonu ve hCA II için log M_K/R_f grafiği

Çizelge 4.1. SUMO hCA II füzyon proteini ile hCA II izoenziminin molekül kütle sonuçları

	Molekül Kütlesi (kDa)
SUMO hCA II füzyon proteini	53,09
hCA II izoenzimi	29,65

4.12. Rekombinant hCA II İzoenziminin Optimum pH Çalışmasının Sonuçları

4.12.1. Tris-SO₄ tamponunda optimum pH çalışma sonuçları

Rekombinant hCA II izoenziminin optimum pH'sı 7,5-9,0 aralığında 50 mM Tris-SO₄ ve pH'sı 5,0-7,5 aralığında 50 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.2-4.3, Şekil 4.12). Yapılan çalışmalar sonucu hCA II izoenzimi için en uygun optimum pH'nın 50 mM Tris-SO₄ pH 7,5 tamponu olduğu tespit edildi.

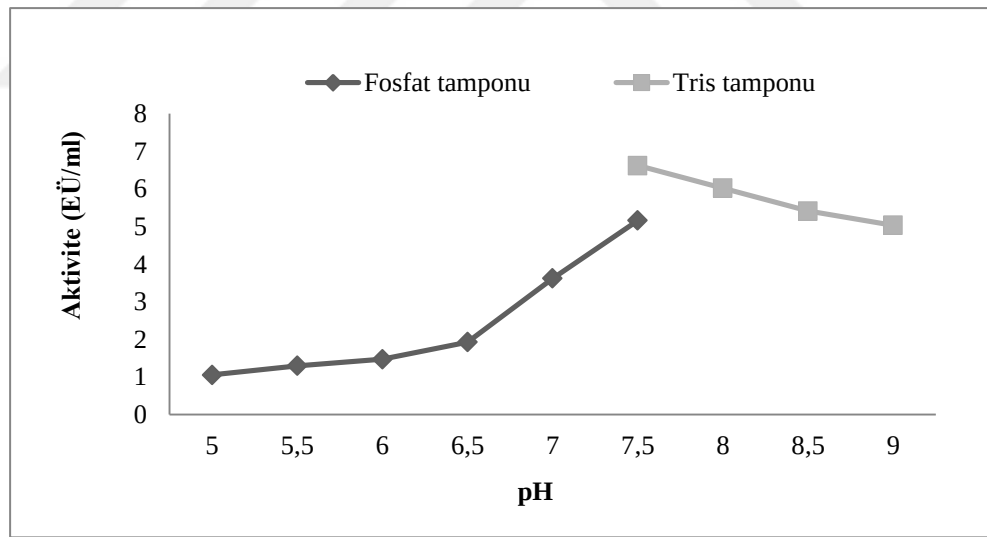
Çizelge 4.2. 50 mM Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak hCA II izoenziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan ölçüm sonuçları

pH	7,5	8	8,5	9
Aktivite (EÜ/ml)	6,6	6,0	5,4	5,0

4.12.2. KH₂PO₄ tamponunda optimum pH çalışması

Çizelge 4.3. 50 mM KH₂PO₄ tampon çözeltisi kullanılarak hCA II izoenziminin optimum pH'sını belirlemek için yapılan ölçüm sonuçları

pH	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
Aktivite (EÜ/ml)	1,1	1,3	1,5	2,0	4,0	5,2



Şekil 4.12. 50 mM KH₂PO₄ ve 50 mM Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak hCA II izoenzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği

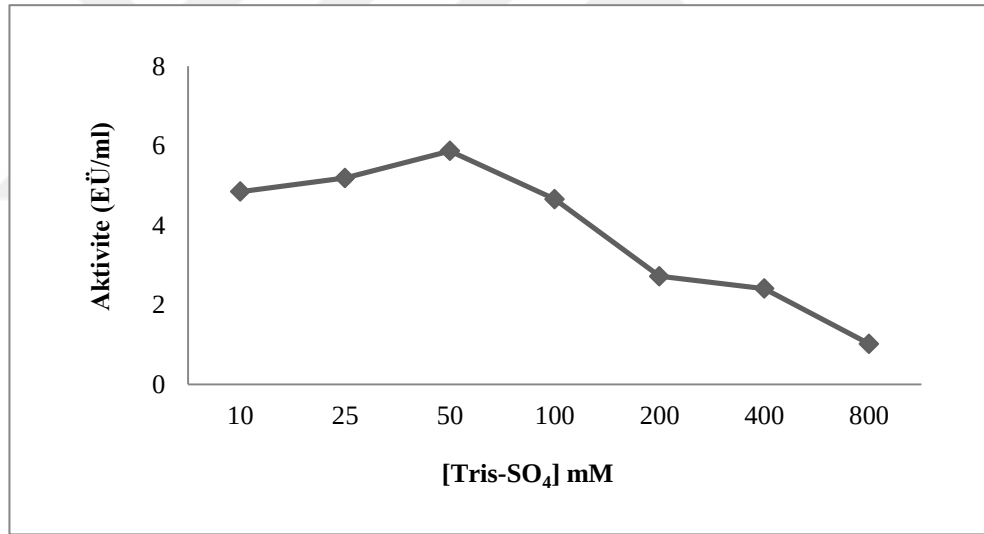
4.13. Rekombinant hCA II İzoenziminin Optimum İyonik Şiddet Çalışmasının Sonuçları

Rekombinant hCA II izoenziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum iyonik şiddeti belirlemek amacıyla Tris-SO₄ tamponunun optimal pH'daki 10, 25, 50, 100,

200, 400 ve 800 mM'lık konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Farklı Tris-SO₄ konsantrasyonlarında esterase aktivite ölçümleri yapılarak Tris-SO₄ konsantrasyonuna karşı aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi (Çizelge 4.4, Şekil 4.13). Yapılan çalışmalar sonucu hCA II izoenzimi için en uygun optimum iyonik şiddetin 50 mM Tris-SO₄ pH 7,5 tamponu olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.4. hCA II izoenziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-SO ₄ derişimi (mM)	10	25	50	100	200	400	800
Aktivite (EÜ/ml)	4,9	5,2	5,9	4,6	2,7	2,4	1,0



Şekil 4.13. hCA II izoenzimi için optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği

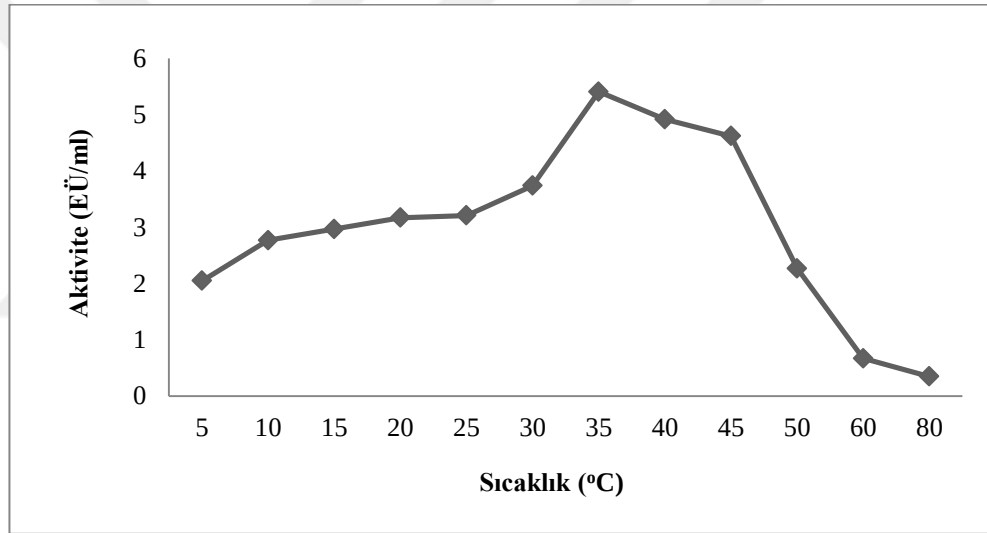
4.14. Rekombinant hCA II İzoenziminin Optimum Sıcaklık Çalışmasının Sonuçları

Rekombinant hCA II enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip tampon çözeltisi kullanıldı. 5°C ile 80°C arasında sıcaklık ortamları oluşturularak enzimin optimum pH'sında spektrofotometrik olarak esterase

aktivitesi ölçümleri yapıldı (Çizelge 4.5) (Şekil 4.14). Yapılan çalışmalar sonucu hCA II izoenzimi için en uygun optimum sıcaklığın 35°C olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.5. hCA II izoenziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan ölçüm sonuçları

Sıcaklık	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	80
Aktivite (EÜ/ml)	2,1	2,8	3,0	3,2	3,2	3,7	5,4	4,9	4,6	2,3	0,7	0,4



Şekil 4.14. Rekombinant hCA II izoenziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

4.15. Doğal Tip ve Mutant (W209I, TW209L, W209P ve W209V) hCA II Enzimlerinin Spesifik Aktivite Değerleri

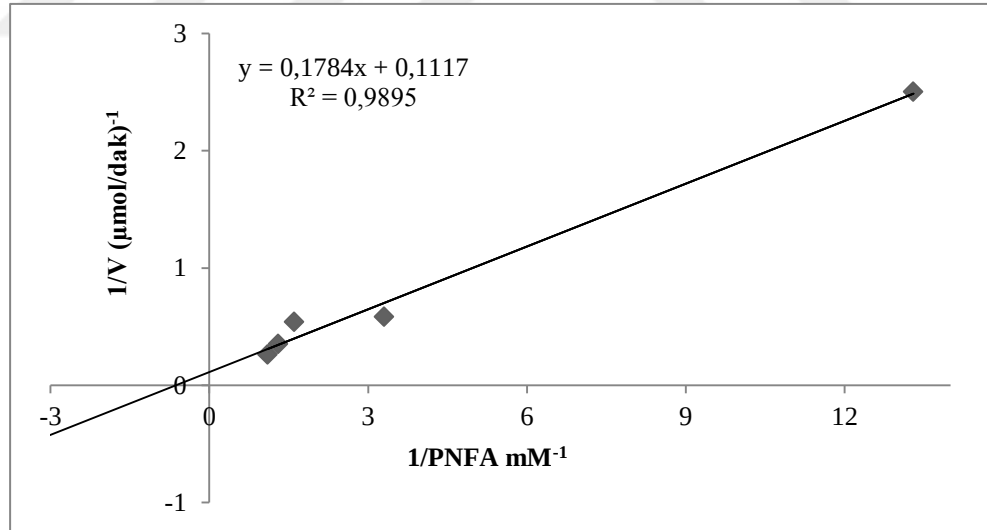
Rekombinant doğal tip ve mutant (W209I, W209L, W209P ve W209V) hCA II enzimlerin saflaştırılması sonucu elde edilen elüsyonların toplam aktiviteleri, p-nitrofenilasetat substratı kullanılarak esteraz aktivite ölçüm yöntemiyle elde edildi. Ayrıca Bradford yöntemi kullanılarak toplam protein miktarları belirlendi ve elde edilen bu veriler birbirine oranlanarak spesifik aktivite değerleri belirlendi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Doğal tip ve mutant enzimlerin spesifik aktivite değerleri

Spesifik Aktivite (EÜ/mg)				
hCA II	W209P	W209L	W209I	W209V
2,48	1,04	1,80	2,00	2,44

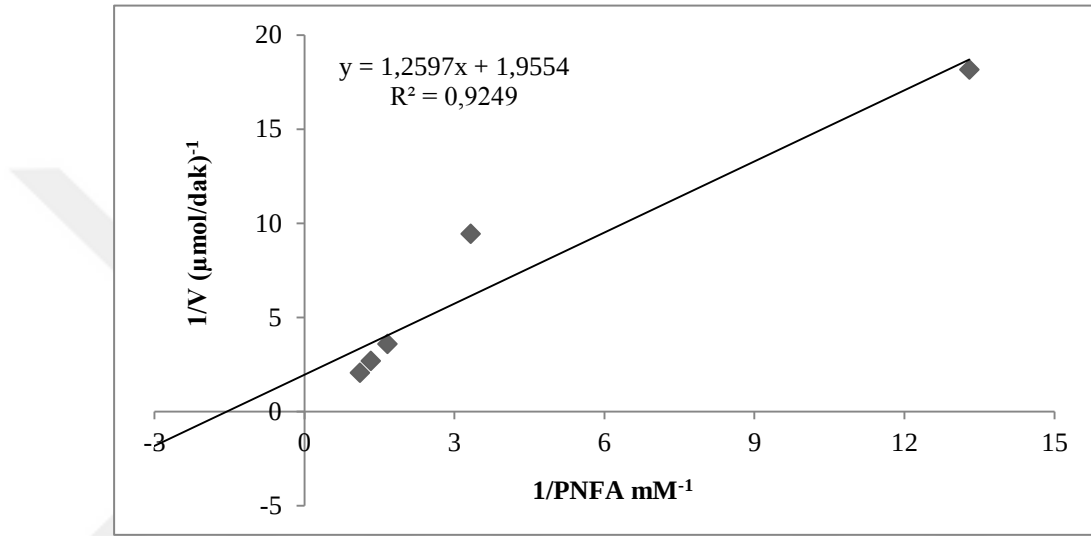
4.16. Doğal tip ve Mutant (W209I, TW209L, W209P ve W209V) hCA II Enzimlerinin K_M , V_{max} ve k_{cat} Değerleri

p-Nitrofenilasetat substratı için rekombinant doğal tip hCA II ve mutant (Trp209I, Trp209L, Trp209P Trp209V) enzimlerin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.7-4.11).

**Şekil 4.15.** Doğal tip hCA II izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.7. hCA II izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , V_{max} ve k_{cat} çalışma sonuçları

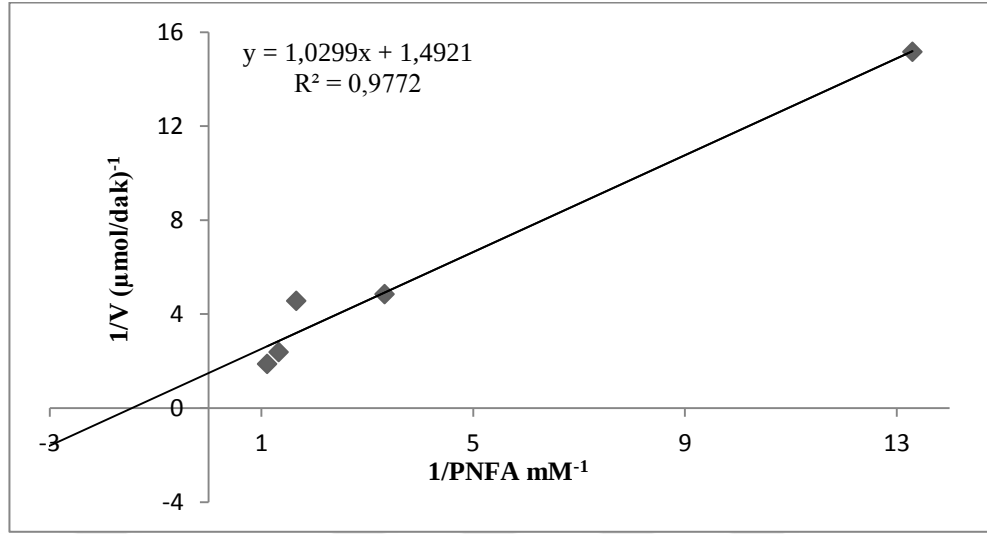
Enzim	Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)	k_{cat}
Doğal tip hCA II	p-nitrofenil asetat	1,61	9,0	3,30



Şekil 4.16. Mutant (W209I) hCA II izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.8. Mutant (W209I) hCA II izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , V_{max} ve k_{cat} çalışma sonuçları

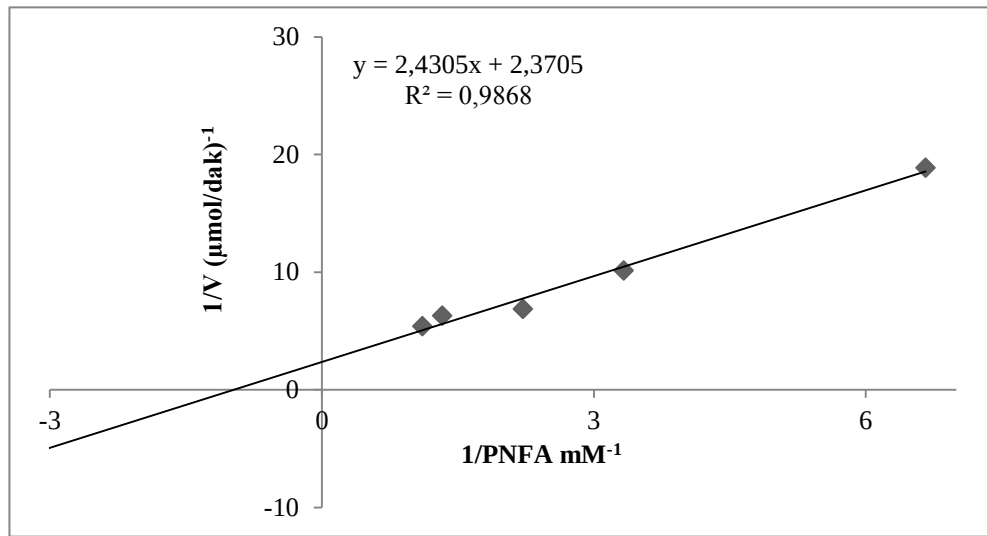
Enzim	Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)	k_{cat}
W209I hCA II	p-nitrofenil asetat	0,50	0,51	0,90



Şekil 4.17. Mutant (W209L) hCA II izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.9. Mutant (W209L) hCA II izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , $V_{\max}$ ve k_{cat} çalışma sonuçları

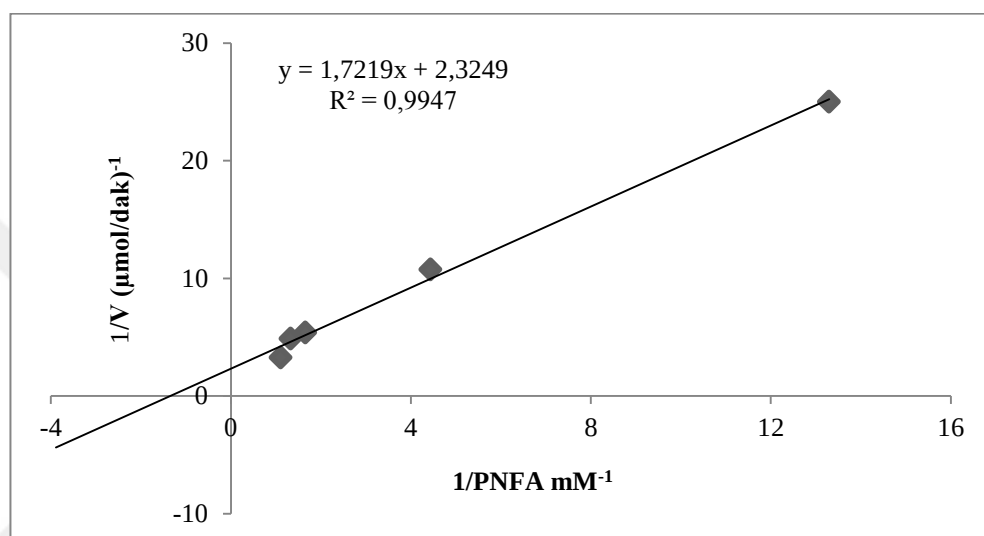
Enzim	Substrat	K_M (mM)	$V_{\max}$ (EÜ/ml)	k_{cat}
W209L hCA II	p-nitrofenil asetat	0,75	0,67	1,81



Şekil 4.18. Mutant (W209P) hCA II izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.10. Mutant (W209P) hCA II izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , V_{max} ve k_{cat} çalışma sonuçları

Enzim	Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)	k_{cat}
W209P hCA II	p-nitrofenil asetat	1,02	0,4	0,35



Şekil 4.19. Mutant (W209V) hCA II izoenzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

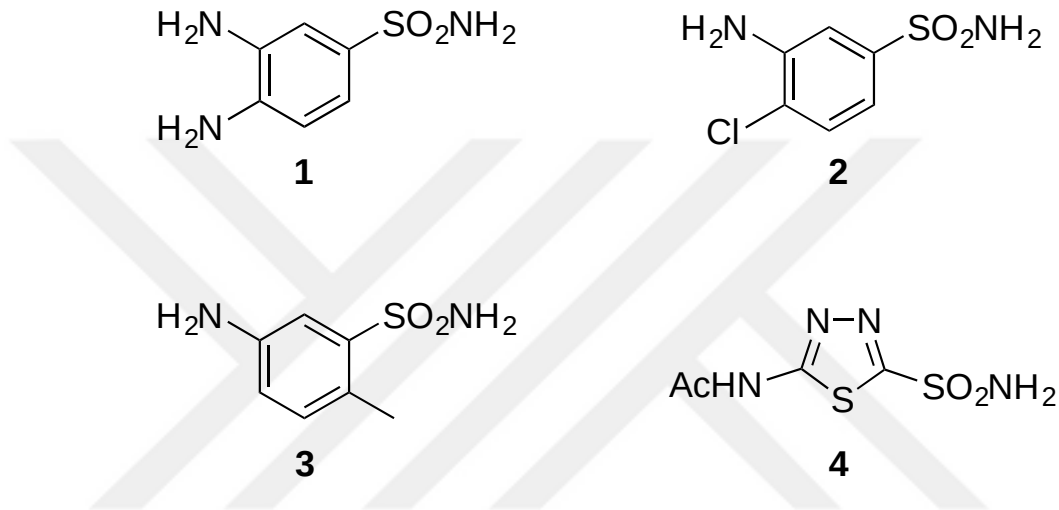
Çizelge 4.11. Mutant (W209V) hCA II izoenzimi için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , V_{max} ve k_{cat} çalışma sonuçları

Enzim	Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)	k_{cat}
W209V hCA II	p-nitrofenilasetat	0,74	0,40	2.80

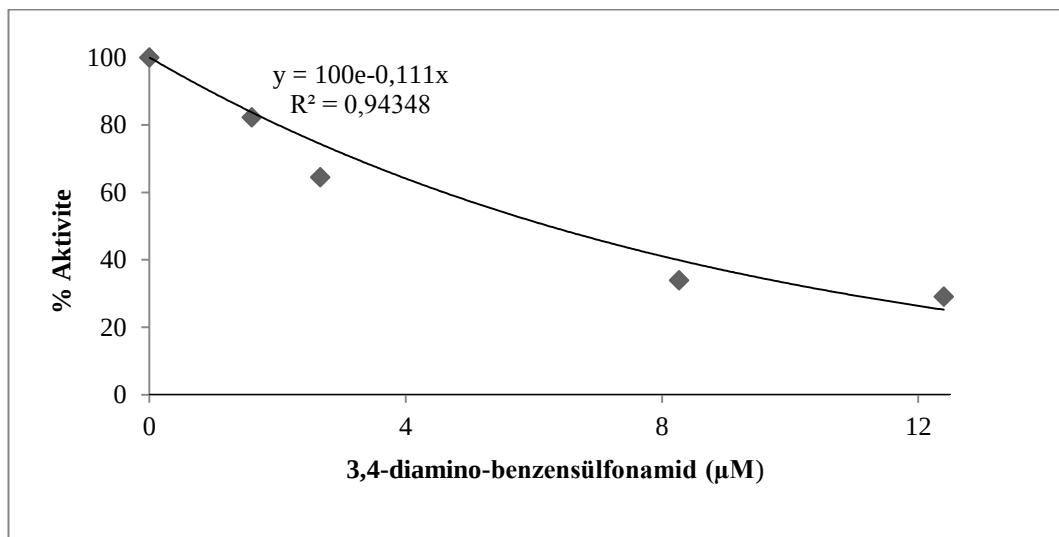
4.17. Doğal Tip ve Mutant (W209V, W209L, W209I ve W209P) hCA II Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bazı Benzenesülfonamid Türevlerinin İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

Enzimin aktivitesini inhibe eden 3,4-diamino-benzenesülfonamid **(1)**, 3-Amino-4-klorobenzenesülfonamid **(2)**, 5-Amino-2-metilbenzenesülfonamid **(3)** ve AZA (asetazolamid) **(4)** kimyasal maddeleri (Şekil 4.20) için sabit substrat

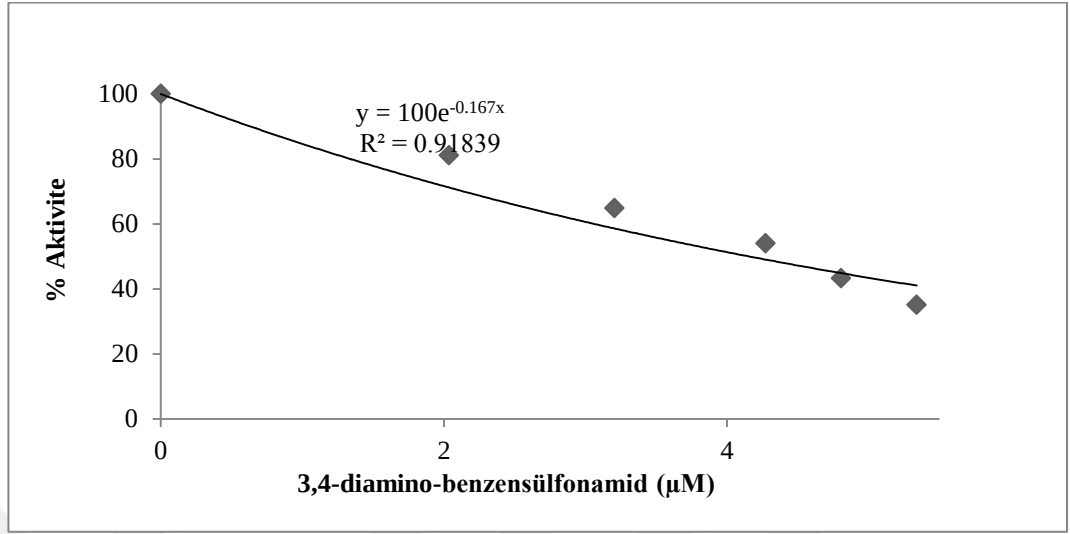
konsantrasyonunda inhibitörsüz ortamda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda IC_{50} değerleri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) % aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi (Şekil 4.21-4.40). Ayrıca herbir bileşiğin doğal ve mutant enzimlere olan ilgisini gösteren K_i değerleri Cheng-Prusoff eşitliğinden faydalanılarak belirlendi (Çizelge 4.12) (Scott *et al.* 2009).



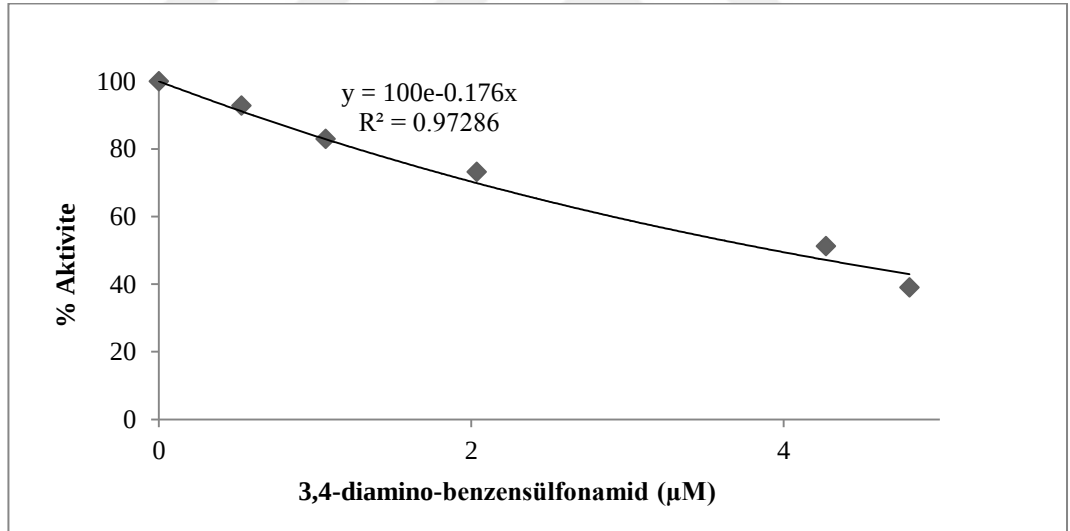
Şekil 4.20. Çalışmada kullanılan inhibitörler; 3,4-diamino-benzenesülfonamid (**1**), 3-Amino-4-klorobenzenesülfonamid (**2**), 5-Amino-2-metilbenzenesülfonamid (**3**) ve AZA (asetazolamid) (**4**)



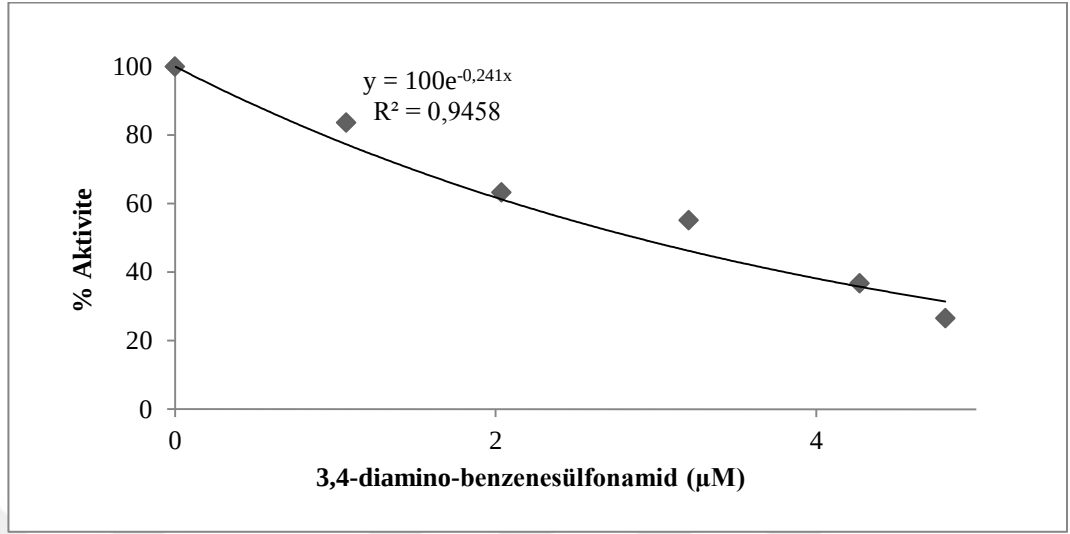
Şekil 4.21. Doğal tip hCA II izoenziminin aktivitesi için % aktivite-[3,4-diamino-benzensülfonamid (μM)] grafiği



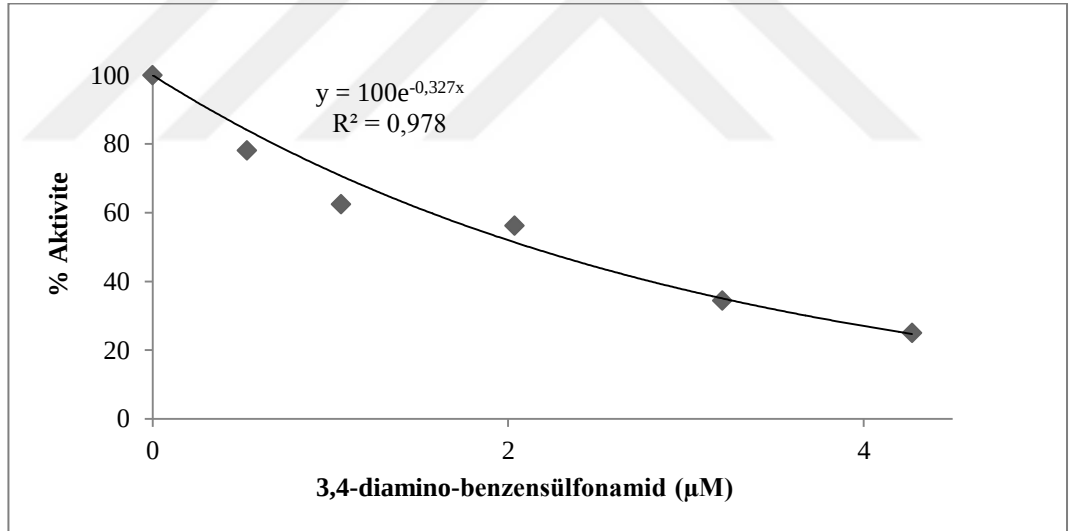
Şekil 4.22. Mutant W209P hCA II enziminin % aktivite-[3,4-diamino-benzensulfonamid (μM)] grafiği



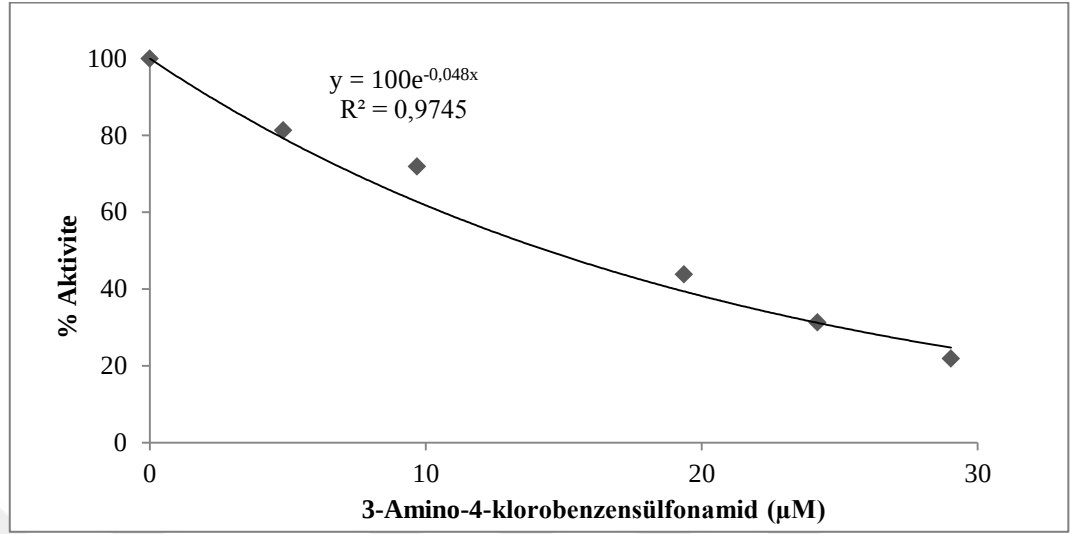
Şekil 4.23. Mutant W209L hCA II enziminin % aktivite-[3,4-diamino-benzensulfonamid (μM)] grafiği



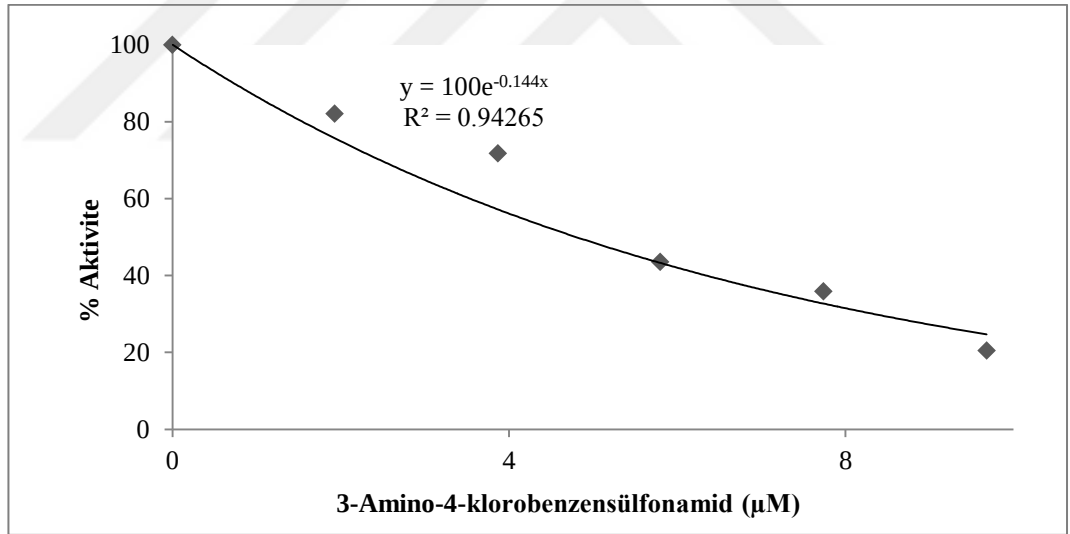
Şekil 4.24. Mutant W209I hCA II enziminin % aktivite-[3,4-diamino-benzensulfonamid (μM)] grafiği



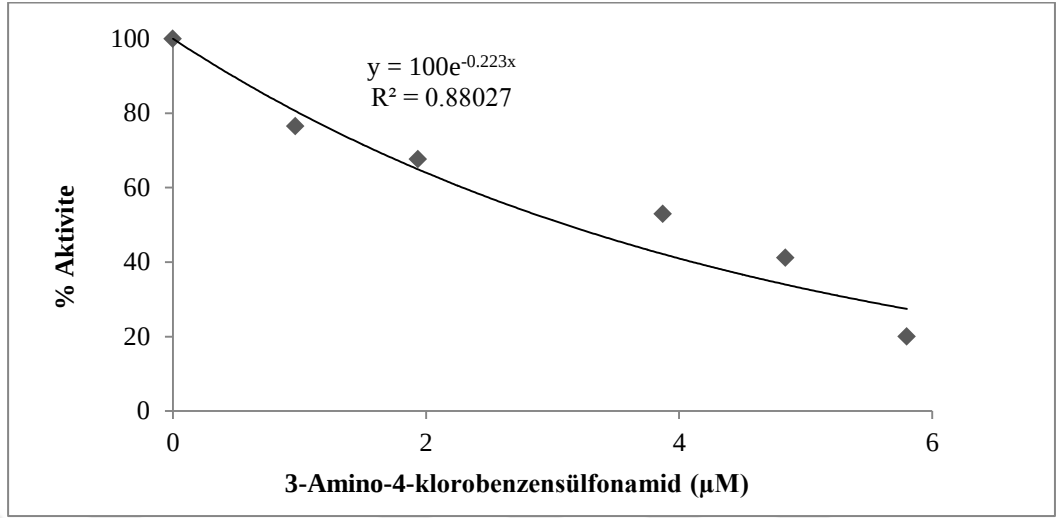
Şekil 4.25. Mutant W209V hCA II enziminin % aktivite-[3,4-diamino-benzensulfonamid (μM)] grafiği



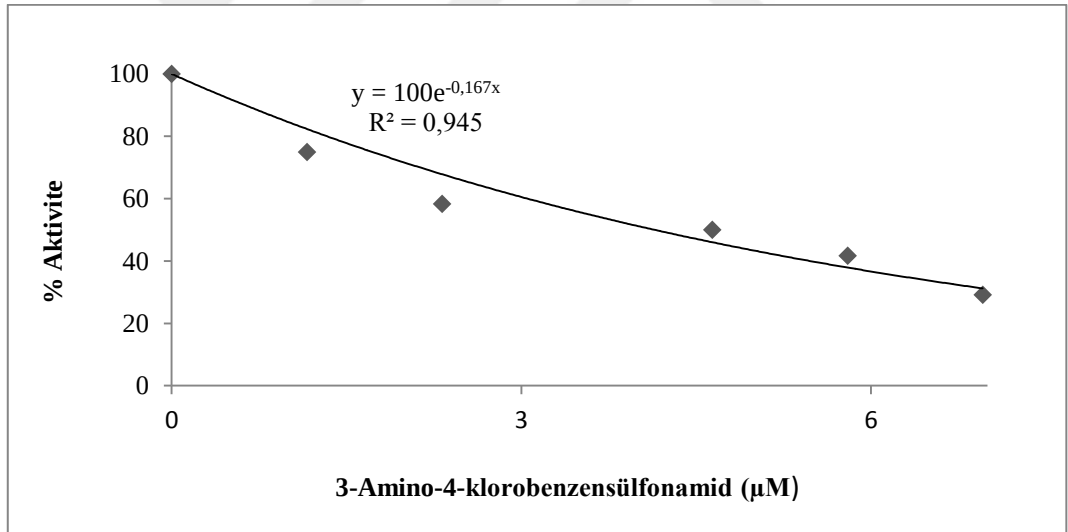
Şekil 4.26. Doğal tip hCA II enziminin % aktivite-[3-Amino-4-klorobenzensulfonamid (μM)] grafiği



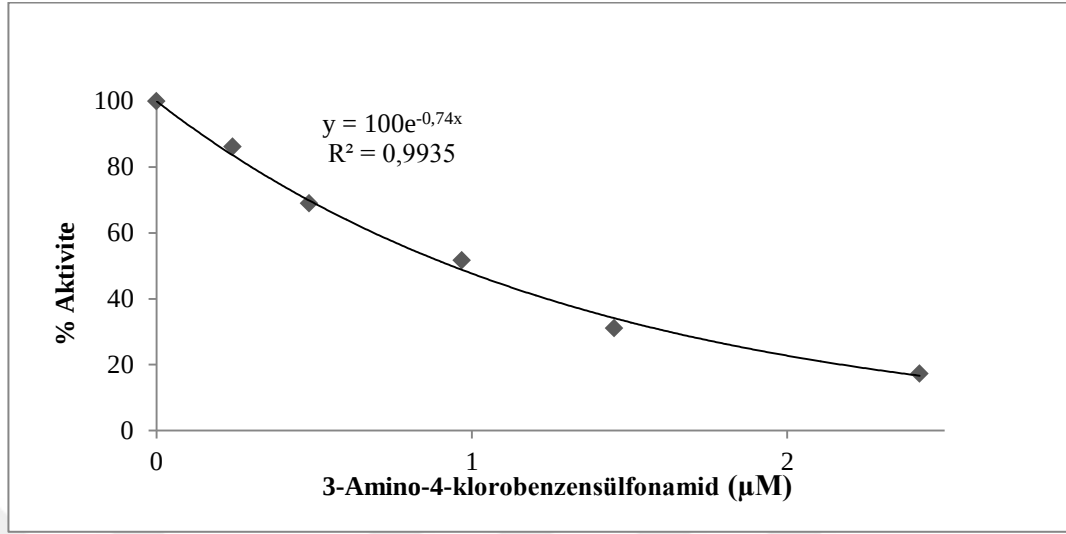
Şekil 4.27. Mutant W209P hCA II enziminin % aktivite-[3-Amino-4-klorobenzensulfonamid (μM)] grafiği



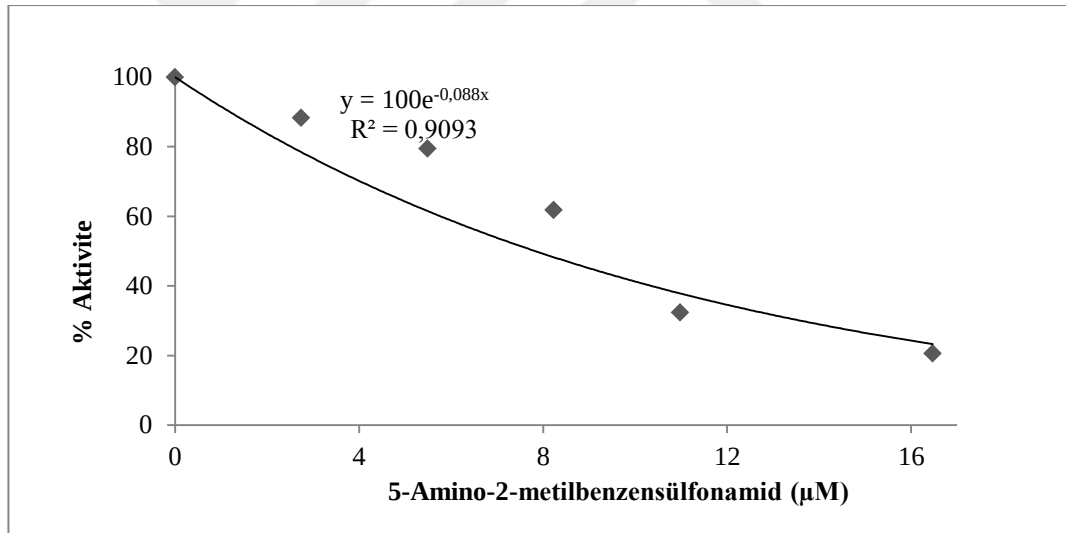
Şekil 4.28. Mutant W209L hCA II enziminin % aktivite-[3-Amino-4-klorobenzensulfonamid (μM)] grafiği



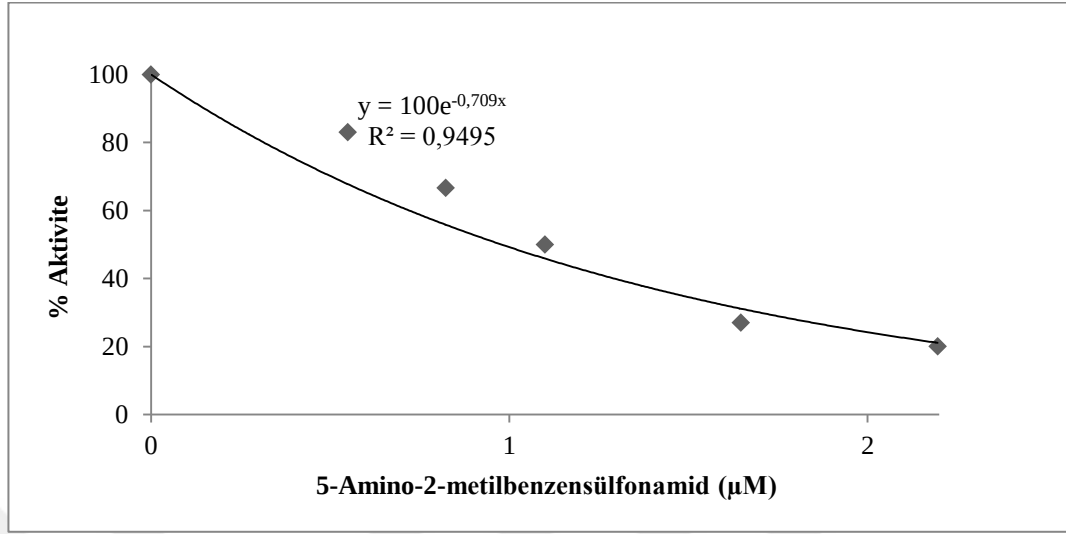
Şekil 4.29. Mutant W209I hCA II enziminin % aktivite-[3-Amino-4-klorobenzensulfonamid (μM)] grafiği



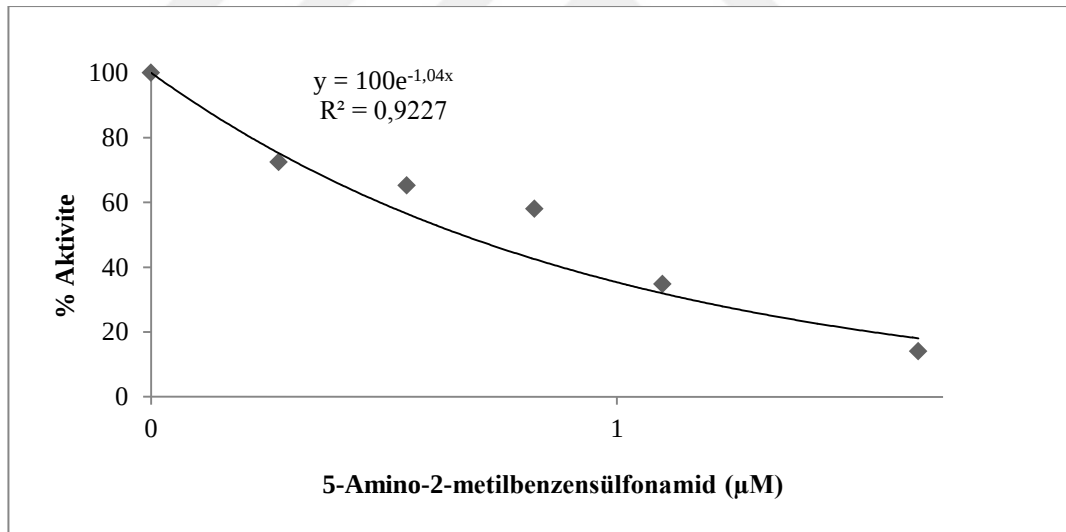
Şekil 4.30. Mutant W209V hCA II enziminin % aktivite-[3-Amino-4-klorobenzensülfonamid (μM)] grafiği



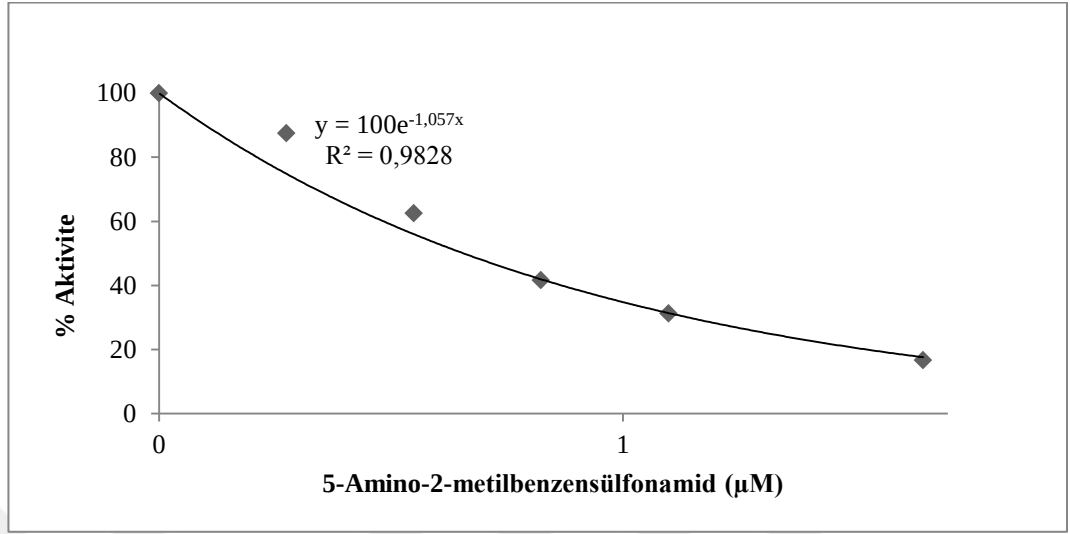
Şekil 4.31. Doğal tip hCA II enziminin % aktivite-[5-Amino-2-metilbenzensülfonamid (μM)] grafiği



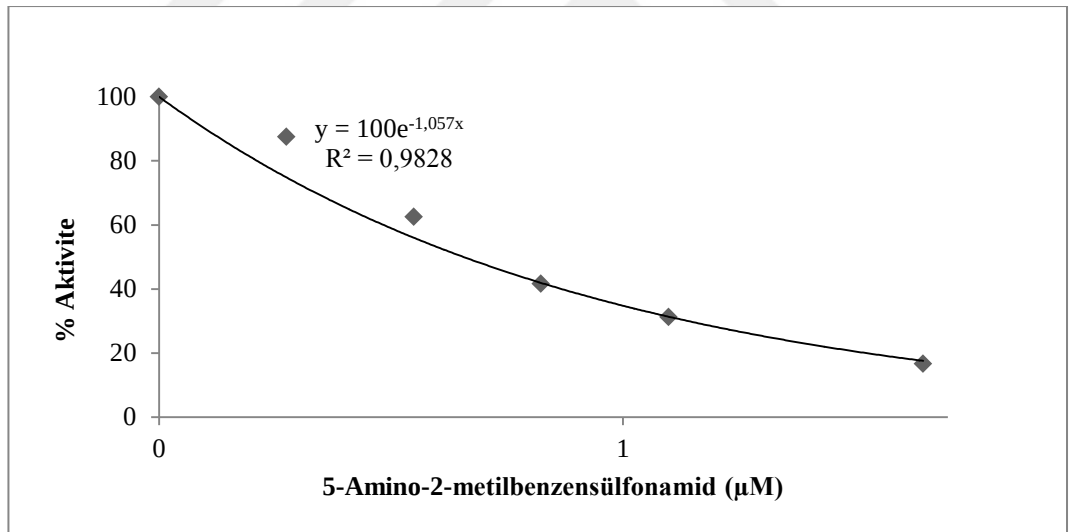
Şekil 4.32. Mutant W209P hCA II enziminin % aktivite-[5-Amino-2-metilbenzensülfonamid (µM)] grafiği



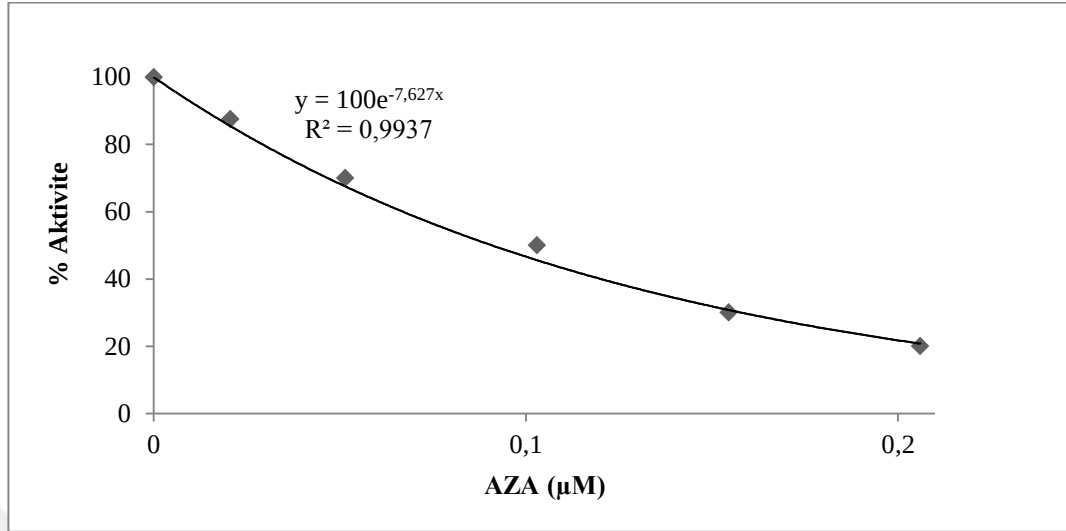
Şekil 4.33. Mutant W209L hCA II enziminin % aktivite-[5-Amino-2-metilbenzensülfonamid (µM)] grafiği



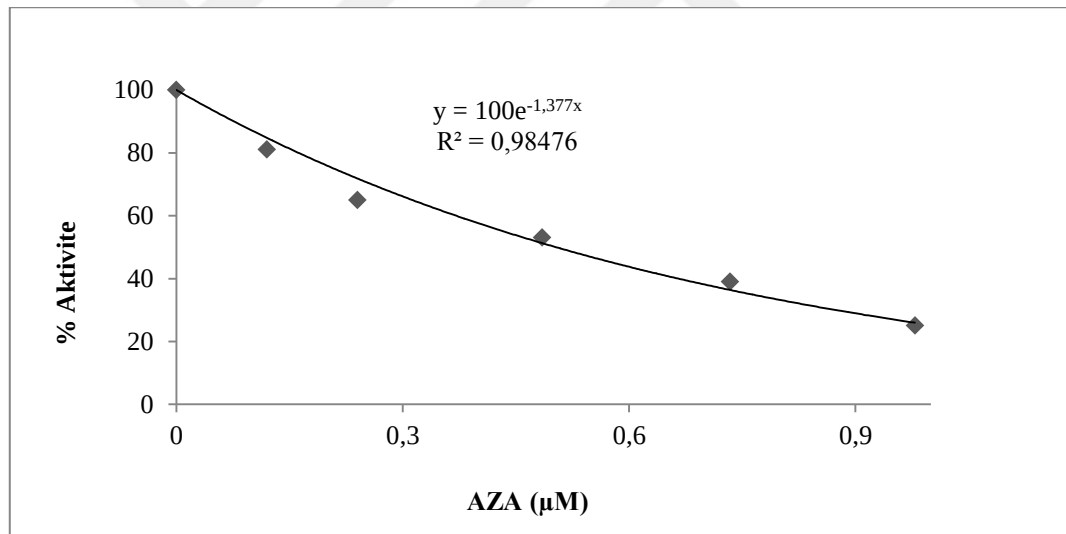
Şekil 4.34. Mutant W209I hCA II enziminin % aktivite-[5-Amino-2-metilbenzensülfonamid (µM)] grafiği



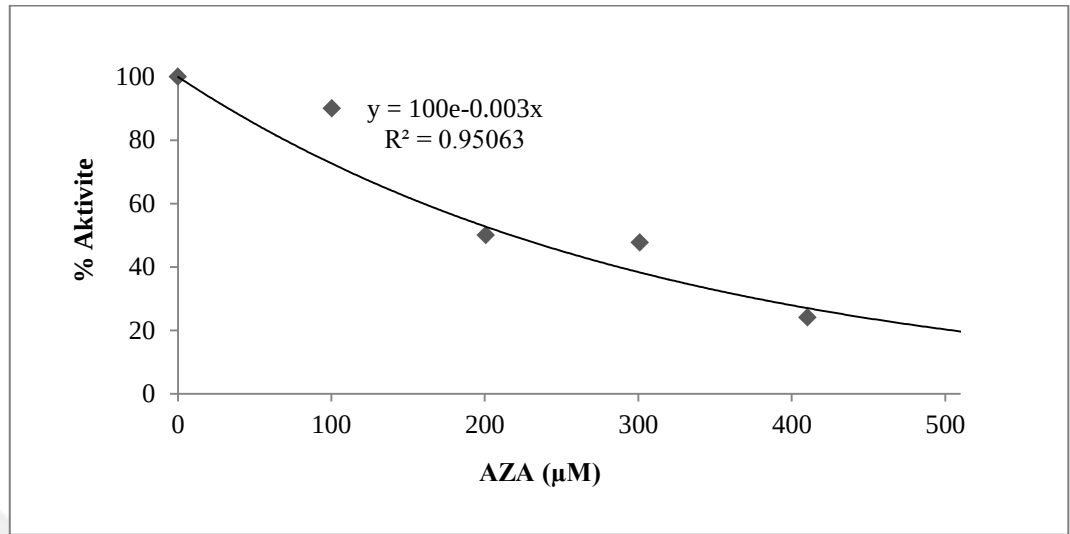
Şekil 4.35. Mutant W209V hCA II enziminin % aktivite-[5-Amino-2-metilbenzensülfonamid (µM)] grafiği



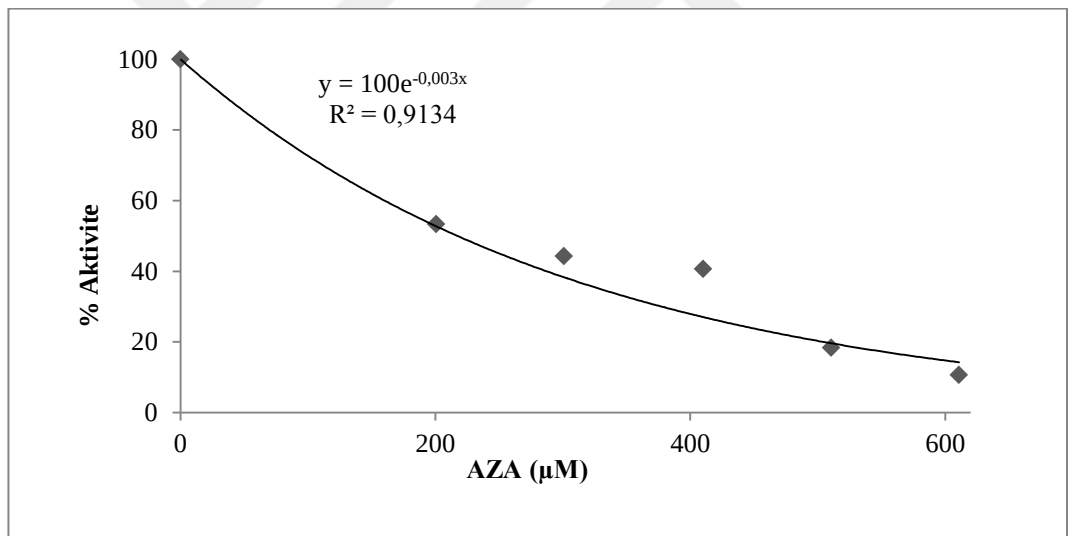
Şekil 4.36. Doğal tip hCA II enziminin % aktivite-[AZA (μM)] grafiği



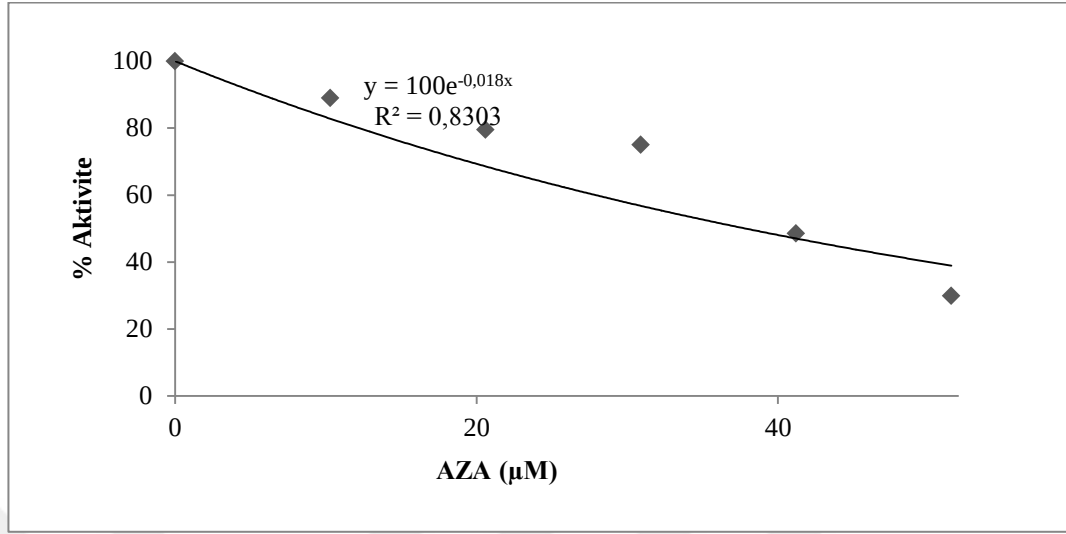
Şekil 4.37. Mutant W209P hCA II enziminin % aktivite-[AZA (mM)] grafiği



Şekil 4.38. Mutant W209L hCA II enziminin % aktivite-[AZA (μM)] grafiği



Şekil 4.39. Mutant W209I hCA II enziminin % aktivite-[AZA (μM)] grafiği



Şekil 4.40. Mutant W209V hCA II enziminin % aktivite-[AZA (μM)] grafiği

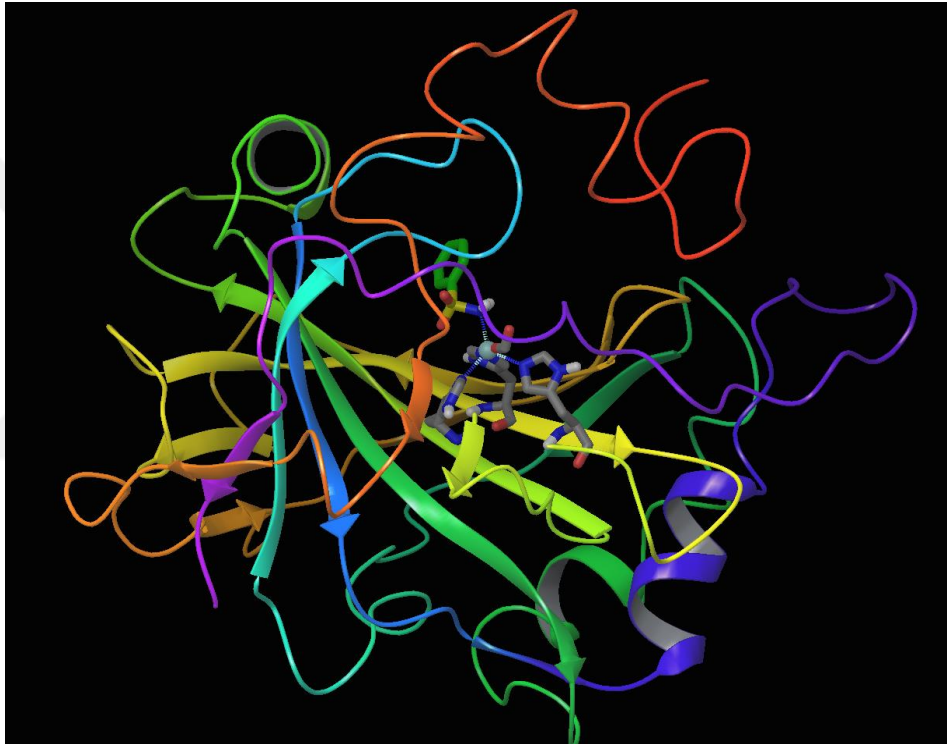
Çizelge 4.12. Doğal tip ve mutant enzimlerin K_i değerleri

Bileşikler	K_i (μM)				
	hCA II	W209P	W209L	W209I	W209V
1	2,03±0,12	969±17	734±6	671±10	541±9
2	9,05±0,11	1209±23	635±6	540±4	242±6
3	2,80±0,02	252±7	125±5	131±7	121±5
4 (AZA)	0,052±0,004	125±4	40,8±3,1	30,3±1,8	8,2±0,8

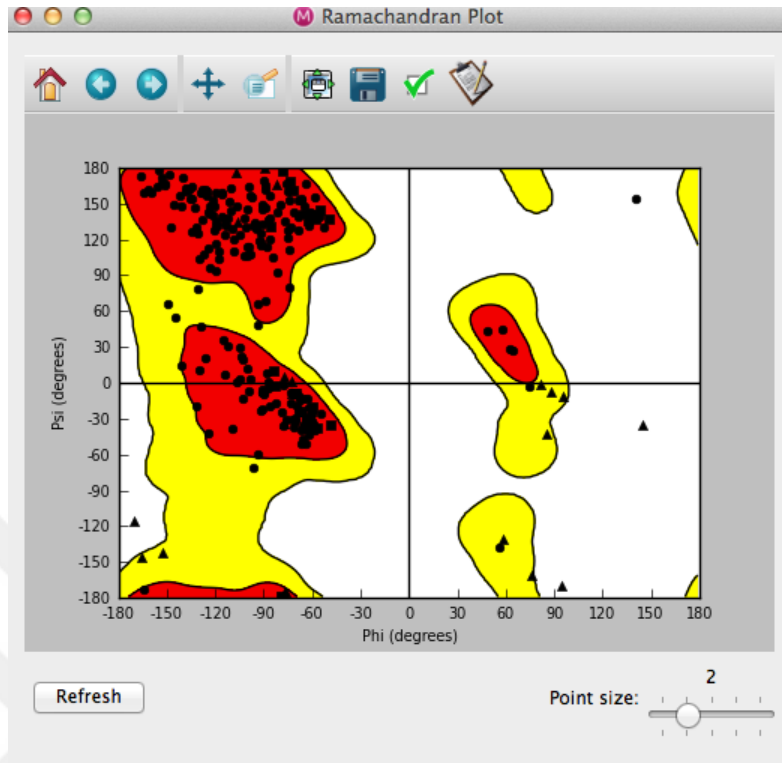
4.18. Hesaplamalı Mutagenез Sonuçları

Maestro Schrödinger programının protein hazırlama sihirbazı kullanılarak PDB ID: 2WEJ yapısı hazırlandı (Şekil 4.41). Hazırlanan bu hCA II proteinin Ramachandran blat grafiği (Şekil 4.42)'de gösterilmiştir. Bu grafikte üçgenler glisin proteinlerini, kareler prolin proteinlerini ve daireler ise diğer residülerin tamamını simgelemektedir. Ayrıca diyagram üzerindeki kırmızı bölgeler sterik uyumsuzlukların olmadığı bölgelerdeki yapılarla ilişkilidir.

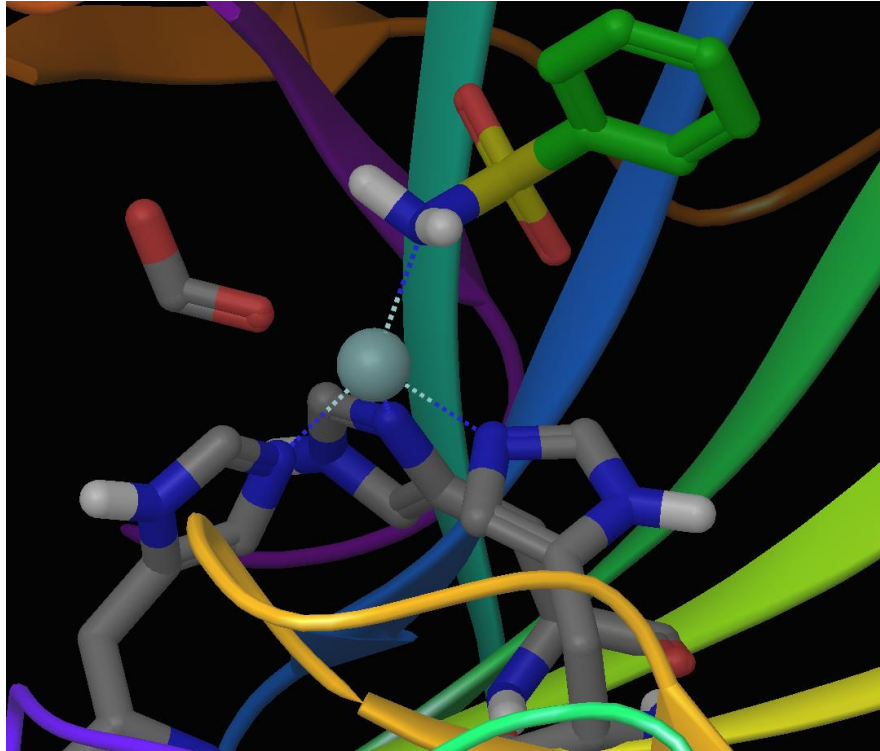
Şekil 4.43.'de ise hazırlanan hCA II yapısının katalitik bölgesi gösterildi. Bu bölgede Zn meteline bağlı üç histidin rezidüsü ve su molekülü bulunmaktadır. Histidin rezidülerinin karbon atomları gri, azot atomları mavi ve hidrojen atomları beyaz olarak gösterildi. Ayrıca katalitik bölgede hCA II'nin inhibitörü olan benzensülfonamid bileşiği gözlemlendi. Bu bileşiğin karbon atomları yeşil olarak gösterilirken, oksijen atomları kırmızı, azot atomları mavi ve kükürt atomları sarı olarak gösterildi.



Şekil 4.41. Hazırlanmış hCAII proteinin genel yapısı



Şekil 4.42. hCA II proteinin Ramachandran blatı



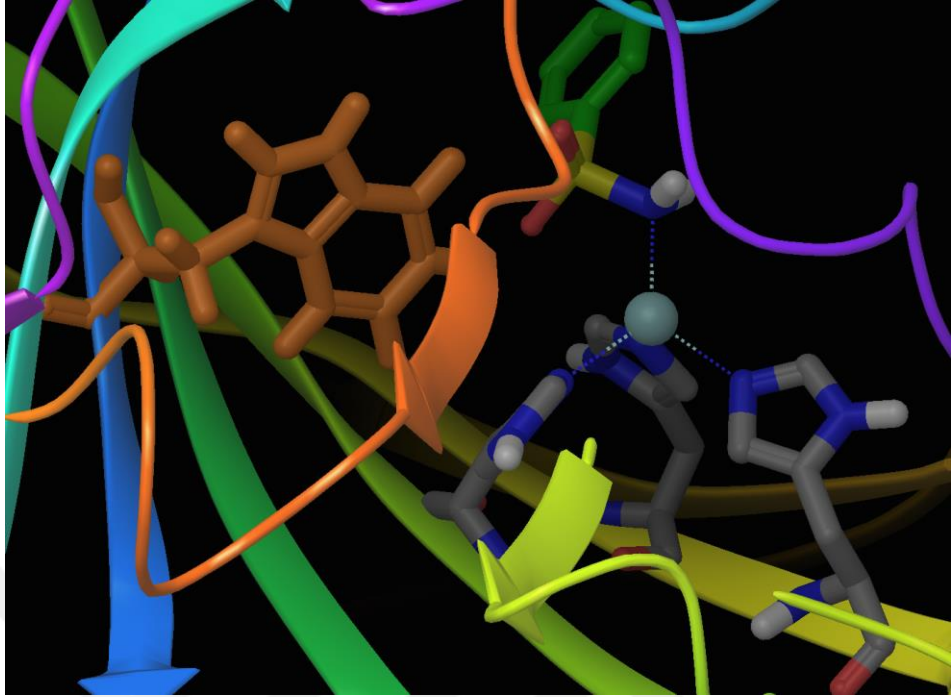
Şekil 4.43. Hazırlanmış hCAII proteinin katalitik bölgesi

4.18.1. Mutant hCA II'lerin hazırlanması

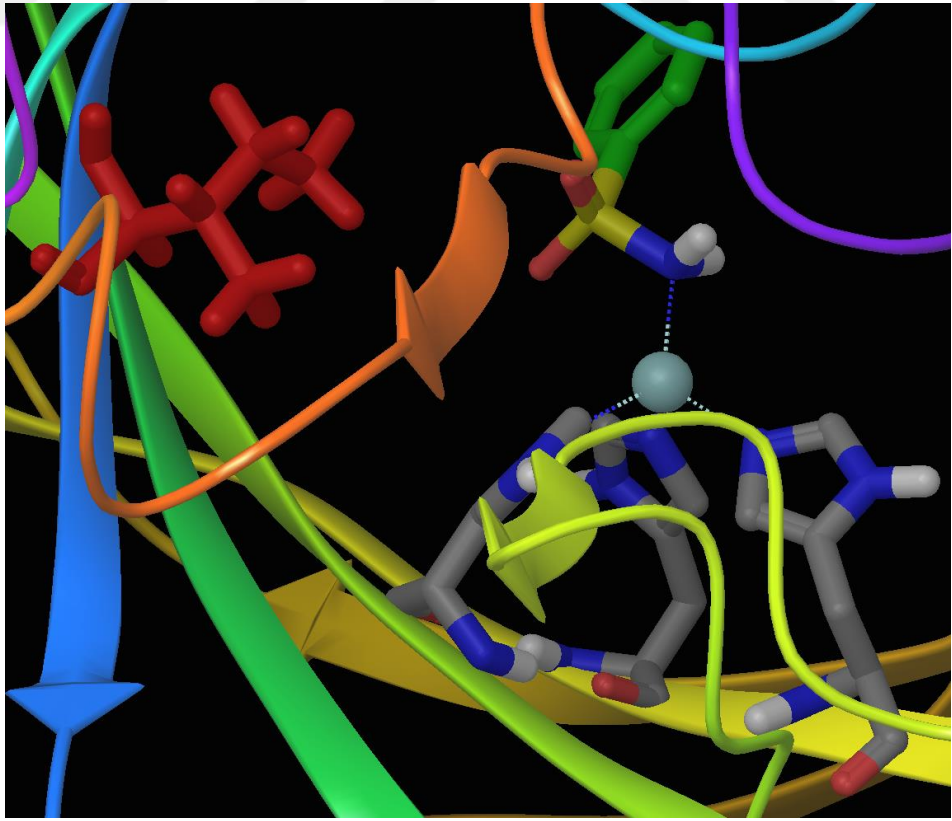
İnsan karbonik anhidraz II'nin PDB ID: 2WEJ (Jones 2009) protein kristal yapısı protein data bankasından indirildi. Maestro Schrodinger programının protein hazırlama sihirbazı kullanılarak protein yapısı hazırlandı. Bu hazırlama sihirbazı sayesinde bağ düzeni oluşturuldu, hidrojenler eklendi, atomların eksik olduğu yan zincirler ve looplar inşa edildi, optimize edilmiş hidrojen bağ ağının iyonlaşabilir rezidüleri için en iyi protonlanma durumları belirlendi ve minimizasyon gerçekleştirildi.

Literatür araştırmaları sonucu hCA II'nin birçok aminoasitin mutasyon çalışmasının yapıldığı fakat aktif bölgeye ve inhibitör bağlanma bölgesine yakın bir bölgede bulunan Triptofan 209 (Trp209) aminoasitin bazı mutasyon çalışmalarının yapılmadığı gözlemlendi. Trp 209 aminoasitin mutasyonu öncelikle bilgisayar programı kullanılarak yapıldı daha sonra deneysel olarak yapıldı.

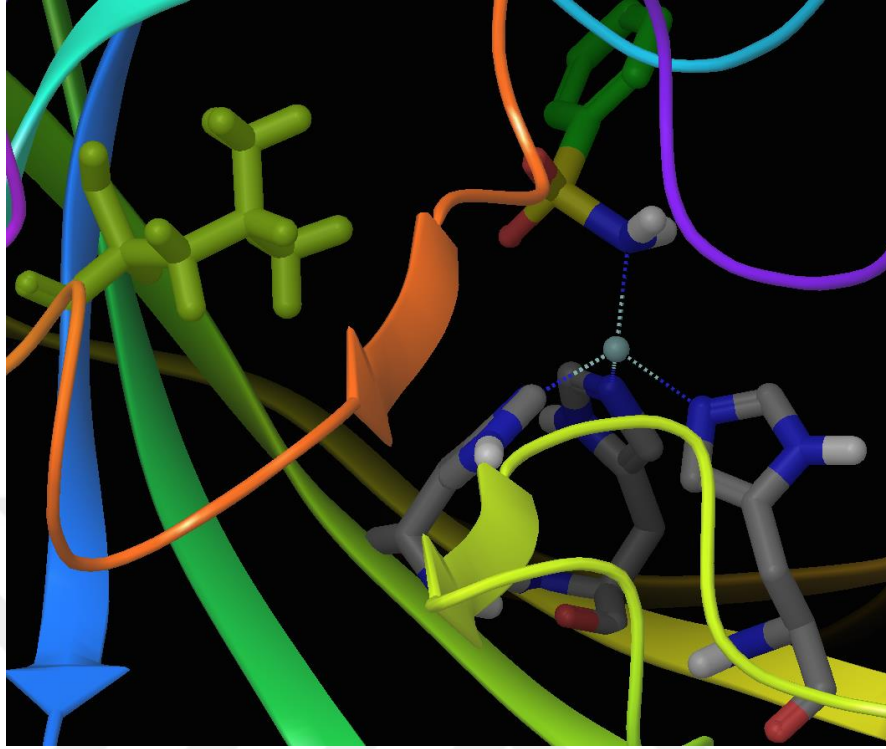
Hesaplamalı mutagenез, kullanım izni alınan Maestro Schrödinger programı kullanılarak gerçekleştirildi. Trp209Val, Trp209Leu, Trp209Ile ve Trp209Pro tek nokta mutasyonları, Maestro Schrödinger programının rezidü tarama modülü kullanılarak üretildi. Mutagenезden sonra, her protein optimize edildi ve OPLS_2005 kuvvet alanı kullanılarak enerji minimizasyonu gerçekleştirildi. Tek nokta mutagenезi gerçekleştirilen Trp209 rezidüsü üç boyutlu turuncu olarak Şekil 4.44'de gösterildi. Trp209Ile mutantının üç boyutlu pozunda Ile aminositi kırmızı ile Şekil 4.45'de, Trp209Leu mutantının üç boyutlu pozunda Leu aminoasiti yeşil olarak Şekil 4.46'da, Trp209Pro mutantının üç boyutlu pozunda Pro aminoasiti gri olarak Şekil 4.47'de, Trp209Val mutantının üç boyutlu pozunda Val aminoasiti koyu pembe olarak Şekil 4.48'de gösterildi.



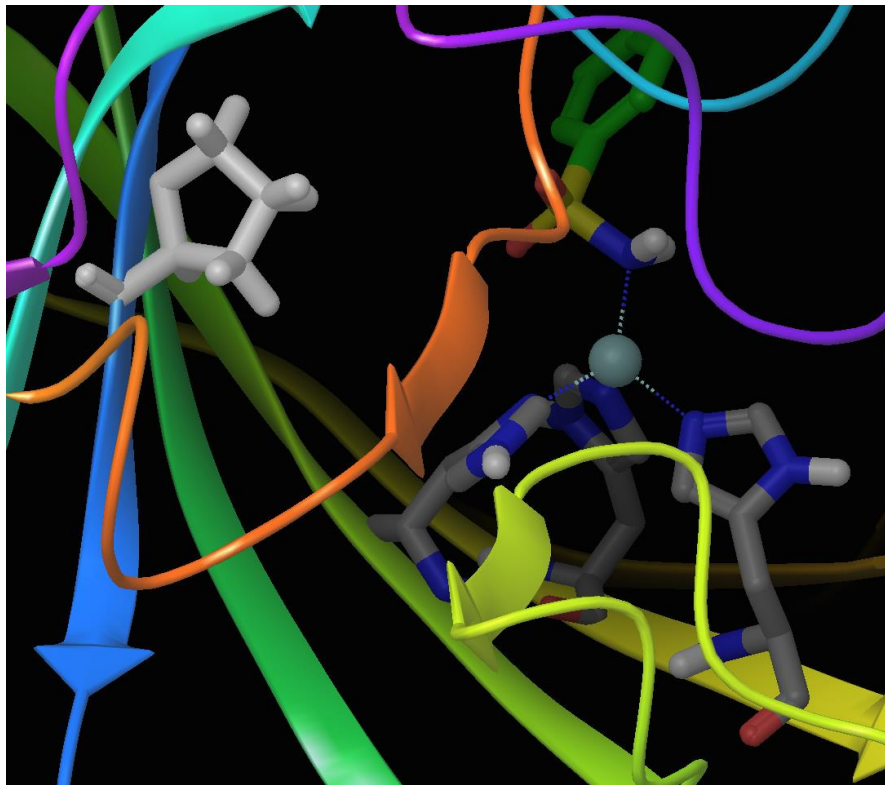
Şekil 4.44. Trp 209'un gösterimi



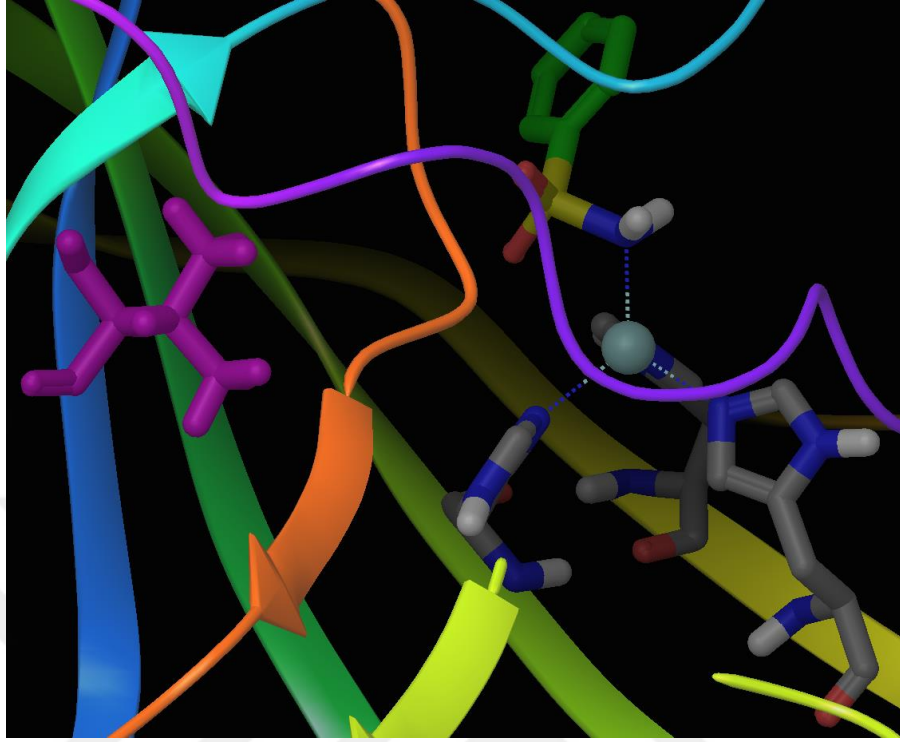
Şekil 4.45. Trp209Ile 3D gösterimi



Şekil 4.46. Trp209Leu 3D gösterimi

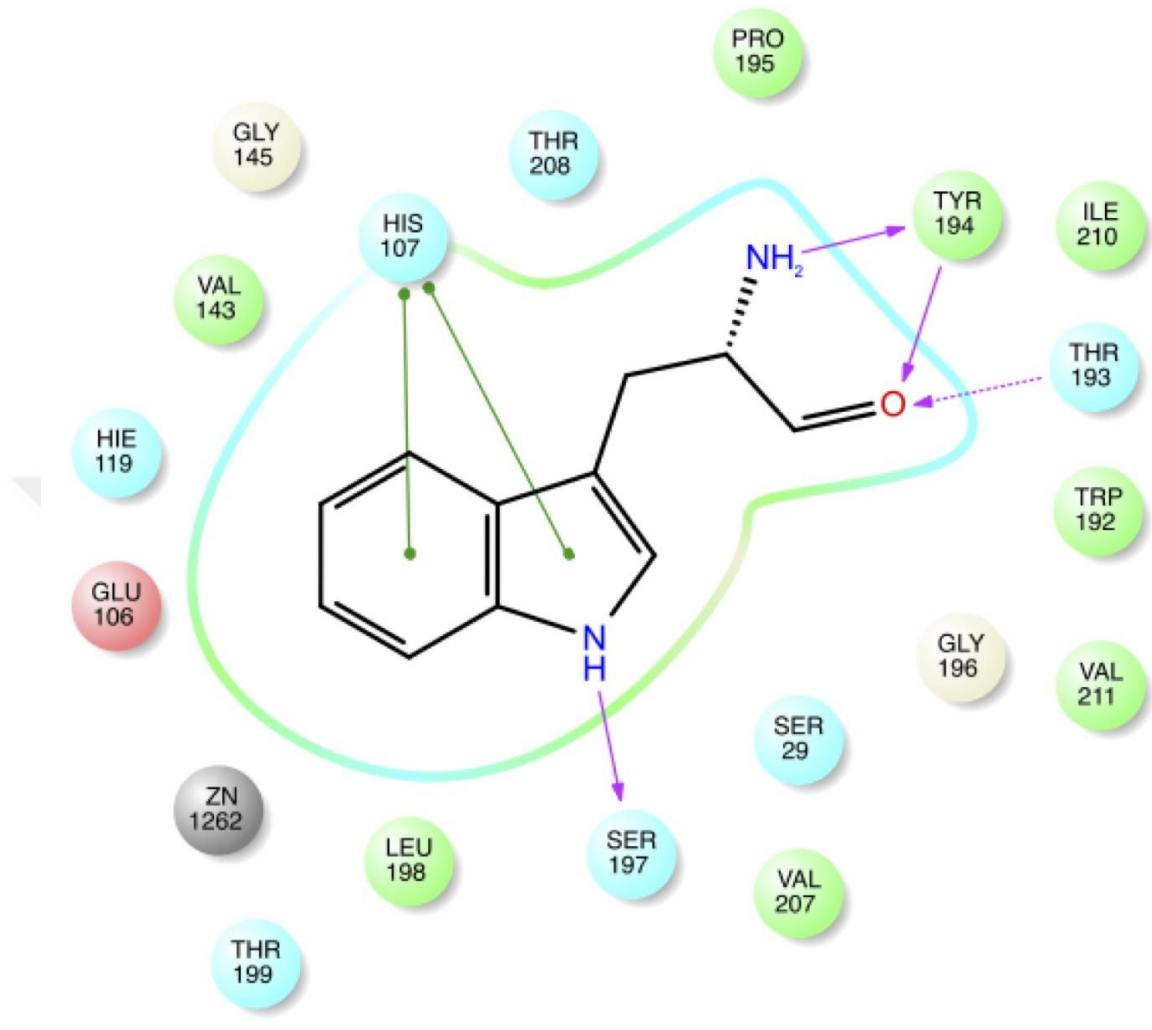


Şekil 4.47. Trp209Pro 3D gösterimi



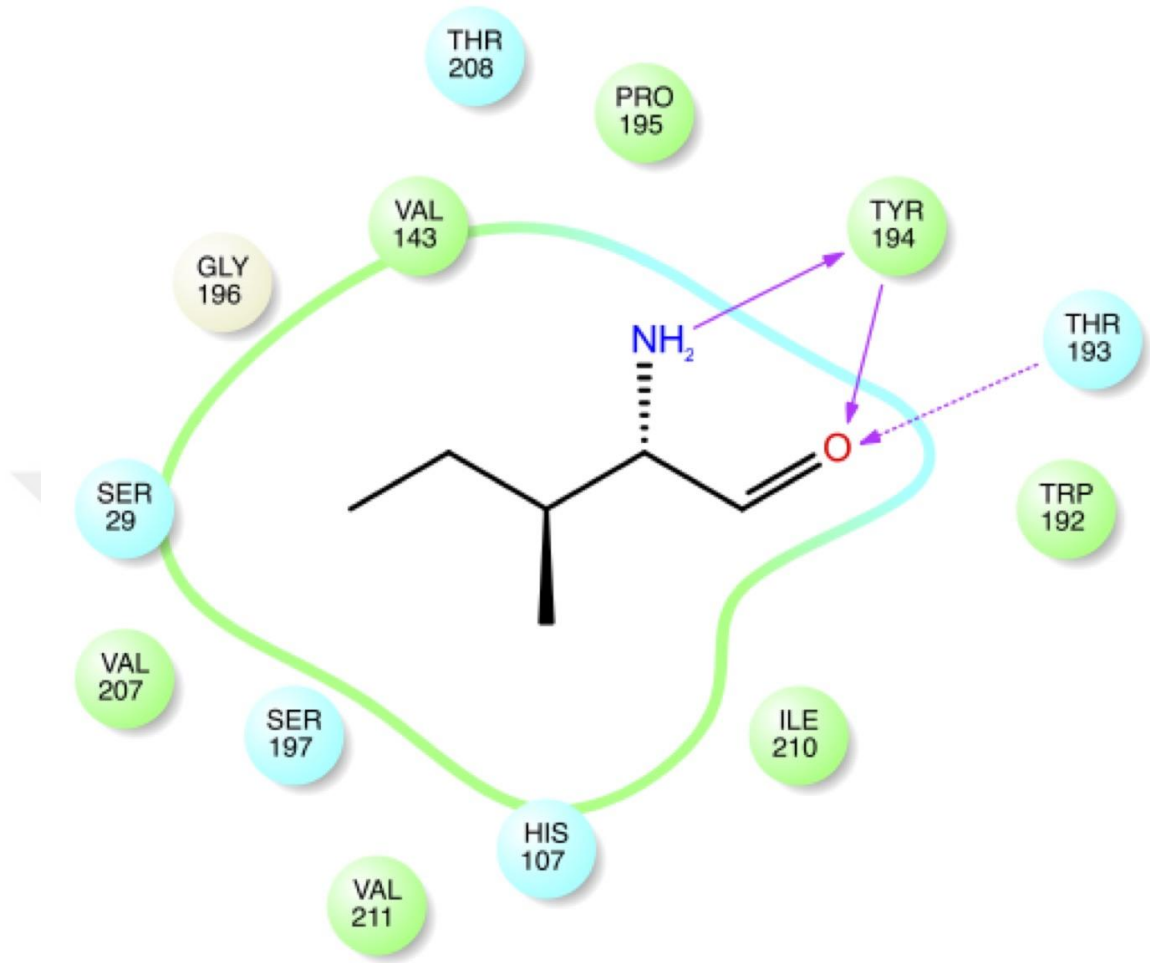
Şekil 4.48. Trp209Val 3D gösterimi

Trp209 rezidüsünün ve mutantlarının etrafındaki aminoasitler ile etkileşimleri iki boyutlu olarak incelenmesi amacıyla 2D pozları elde edildi (Şekil 4.49-4.53). Şekil 4.49’da Trp209 aminoasitinin 2D gösterimi incelendiğinde bu rezidünün His107 ile pi-pi etkileşimi, Ser197’nin ana zinciri ile hidrojen bağı, Tyr194’ün ana zinciri ile iki hidrojen bağı ve Thr193’ün yan zinciri ile bir hidrojen bağı yaptığı belirlendi. Şekil 4.50’de Trp209Ile rezidüsünün 2D gösterimi incelendiğinde bu rezidünün Tyr194 ana zinciri ile iki hidrojen bağı, Thr193’ün yan zinciri ile bir hidrojen bağı yaptığı belirlendi. Şekil 4.51’de Trp209Leu rezidüsünün 2D gösterimi incelendiğinde bu rezidünün Tyr194 ana zinciri ile bir hidrojen bağı, Thr193’ün yan zinciri ile bir hidrojen bağı yaptığı belirlendi. Şekil 4.52’de Trp209Pro rezidüsünün 2D gösterimi incelendiğinde bu rezidünün Thr193’ün yan zinciri ile bir hidrojen bağı yaptığı belirlendi. Şekil 4.53’de Trp209Val rezidüsünün 2D gösterimi incelendiğinde bu rezidünün Tyr194 ana zinciri ile iki hidrojen bağı, Thr193’ün yan zinciri ile bir hidrojen bağı yaptığı belirlendi.



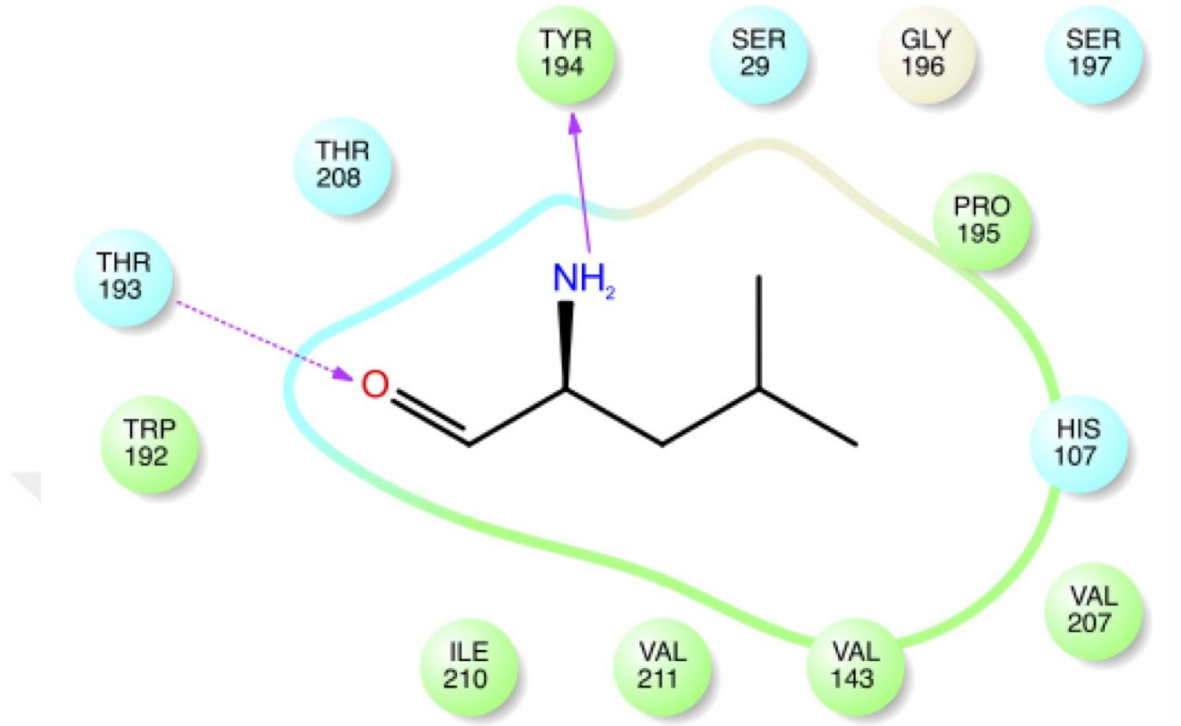
Şekil 4.49. Trp209 aminoasitinin 2D gösterimi

Kırmızı asidik, mor bazik, yeşil hidrofobik, mavi polar, koyu gri metal atomları, açık gri diğerleri; etkileşimlerde ise yeşil pi-pi etkileşim, turuncu pi-kasyon etkileşimi, düz pembe oklar ana zincir ile yapılan bağlar, noktalı pembe oklar yan zincir ile yapılan bağlar



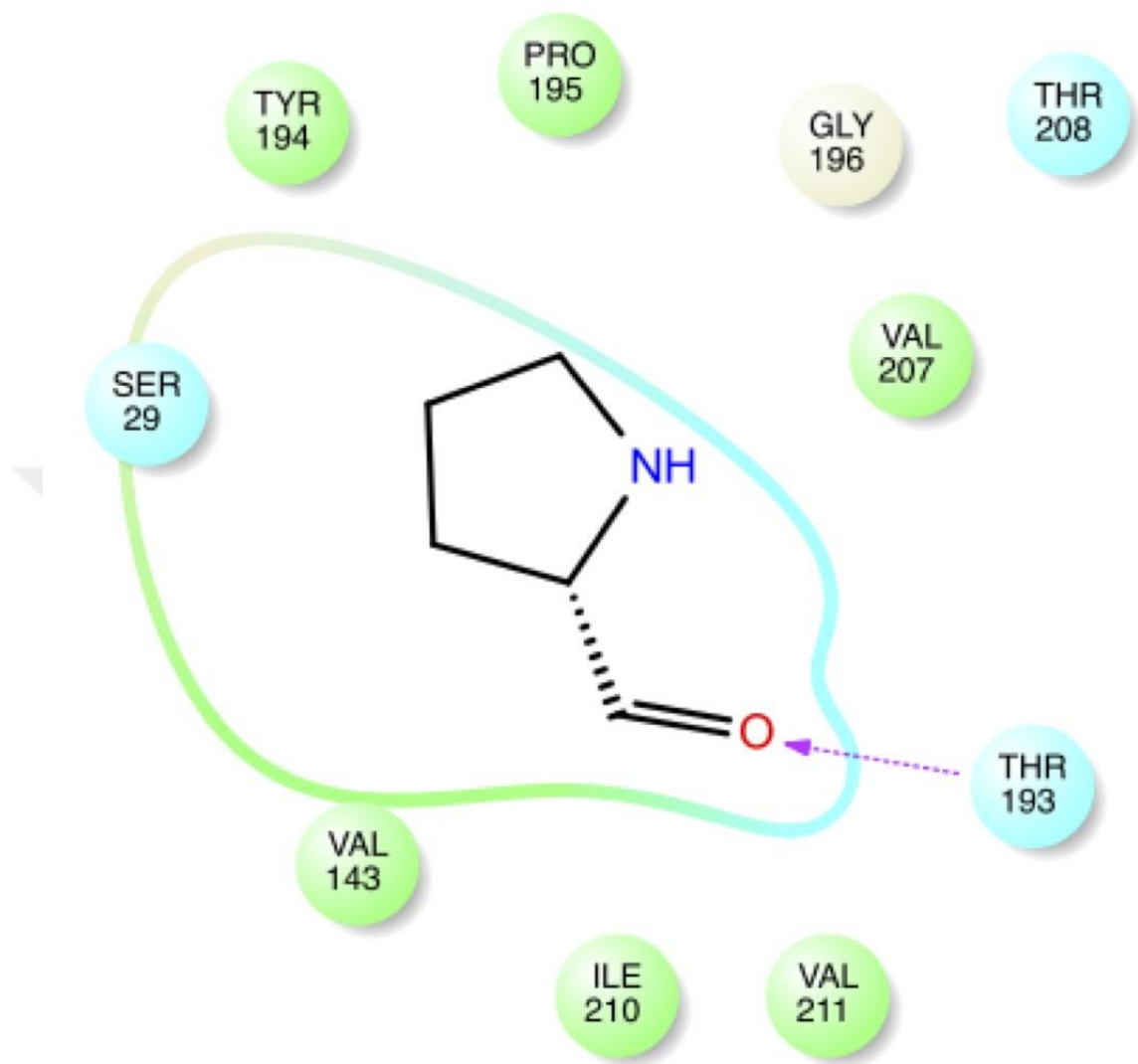
Şekil 4.50. Trp209 ile 2D gösterimi

Kırmızı asidik, mor bazik, yeşil hidrofobik, mavi polar, koyu gri metal atomları, açık gri diğerleri; etkileşimlerde ise yeşil pi-pi etkileşim, turuncu pi-kasyon etkileşimi, düz pembe oklar ana zincir ile yapılan bağlar, noktalı pembe oklar yan zincir ile yapılan bağlar



Şekil 4.51. Trp209Leu 2D gösterimi

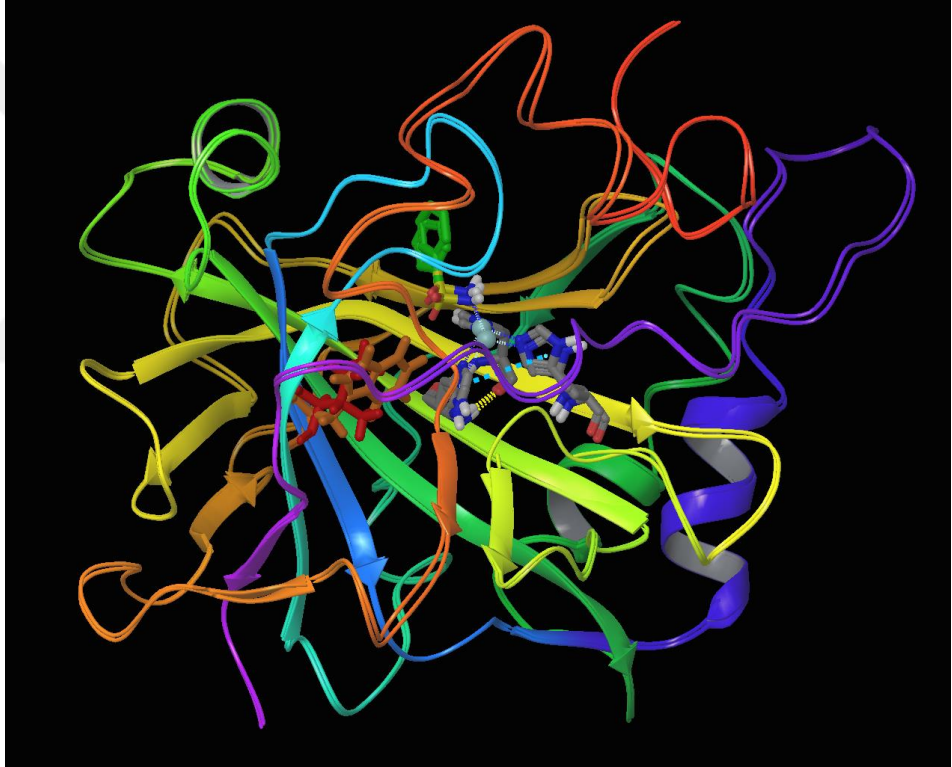
Kırmızı asidik, mor bazik, yeşil hidrofobik, mavi polar, koyu gri metal atomları, açık gri diğerleri; etkileşimlerde ise yeşil pi-pi etkileşim, turuncu pi-kasyon etkileşimi, düz pembe oklar ana zincir ile yapılan bağlar, noktalı pembe oklar yan zincir ile yapılan bağlar



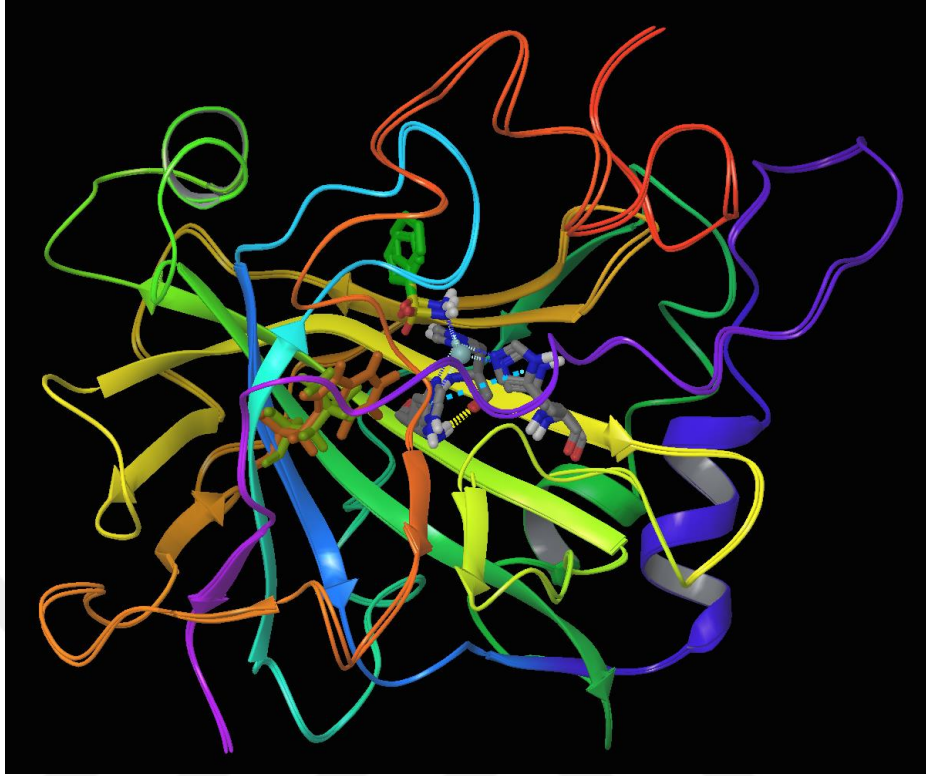
Şekil 4.52. Trp209Pro 2D gösterimi

Kırmızı asidik, mor bazik, yeşil hidrofobik, mavi polar, koyu gri metal atomları, açık gri diğerleri; etkileşimlerde ise yeşil pi-pi etkileşim, turuncu pi-kasyon etkileşimi, düz pembe oklar ana zincir ile yapılan bağlar, noktalı pembe oklar yan zincir ile yapılan bağlar

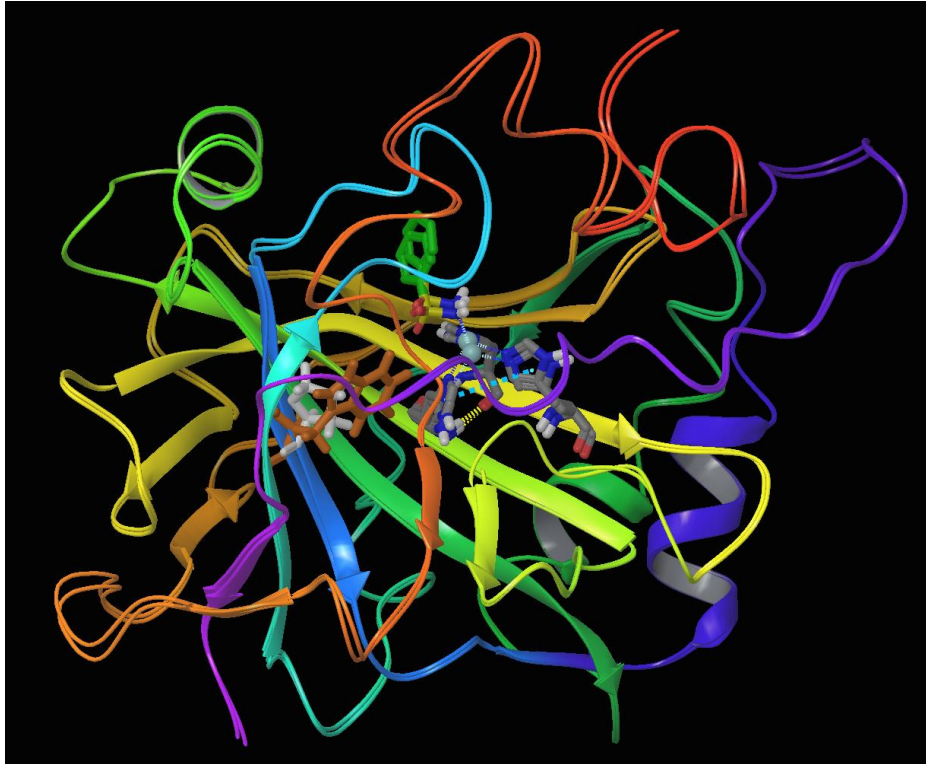
gözlemlendi. W209P mutant protein zinciri ile doğal tip zincirin üstüste çakışma pozu Şekil 4.56 incelendiğinde ise doğal tip zinciri ile çakışma oranının çok az olduğu gözlemlendi. Böylece zincirde en fazla değişikliğe bu mutantın sebep olduğu belirlendi. W209V mutant protein zinciri ile doğal tip zincirin üstüste çakışma pozu Şekil 4.57’de ise doğal tip zinciri ile çakışma oranının çok fazla olduğu gözlemlendi. Yani zincirde en az değişikliğe bu mutantın sebep olduğu belirlendi. Ayrıca enzimin katalitik bölgedeki değişimini incelemek için bu mutantların aktif bölge rezidüleri doğal tip ile üst üste karşılaştırıldı (Şekil 4.58-4.61).



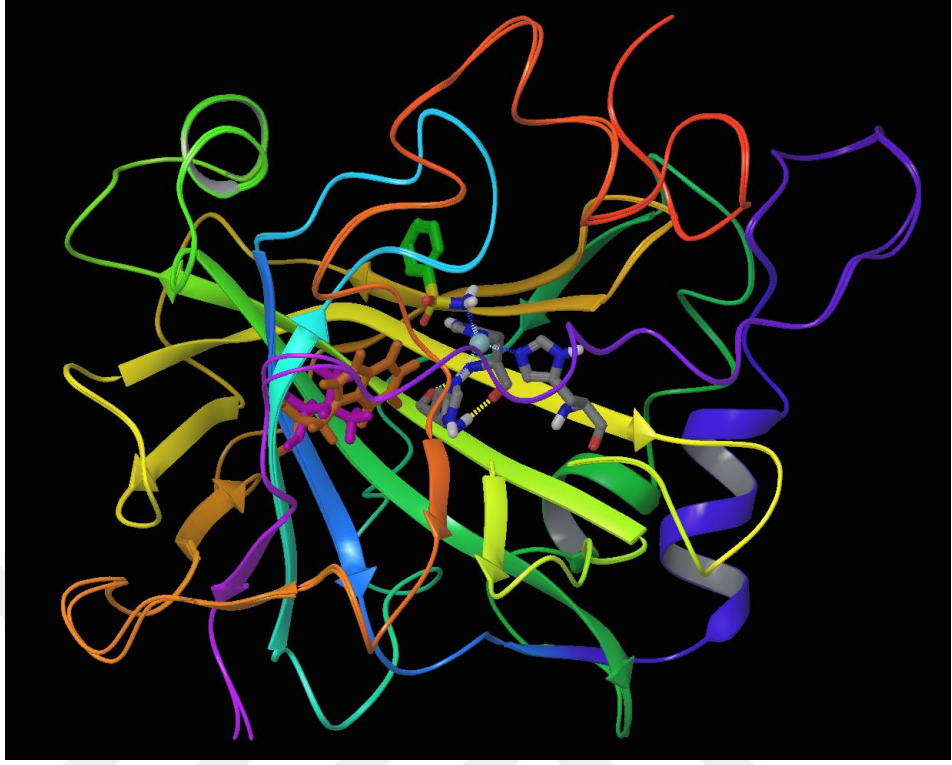
Şekil 4.54. W209I mutant protein zinciri ile doğal tip zincirin üstüste çakışma pozu



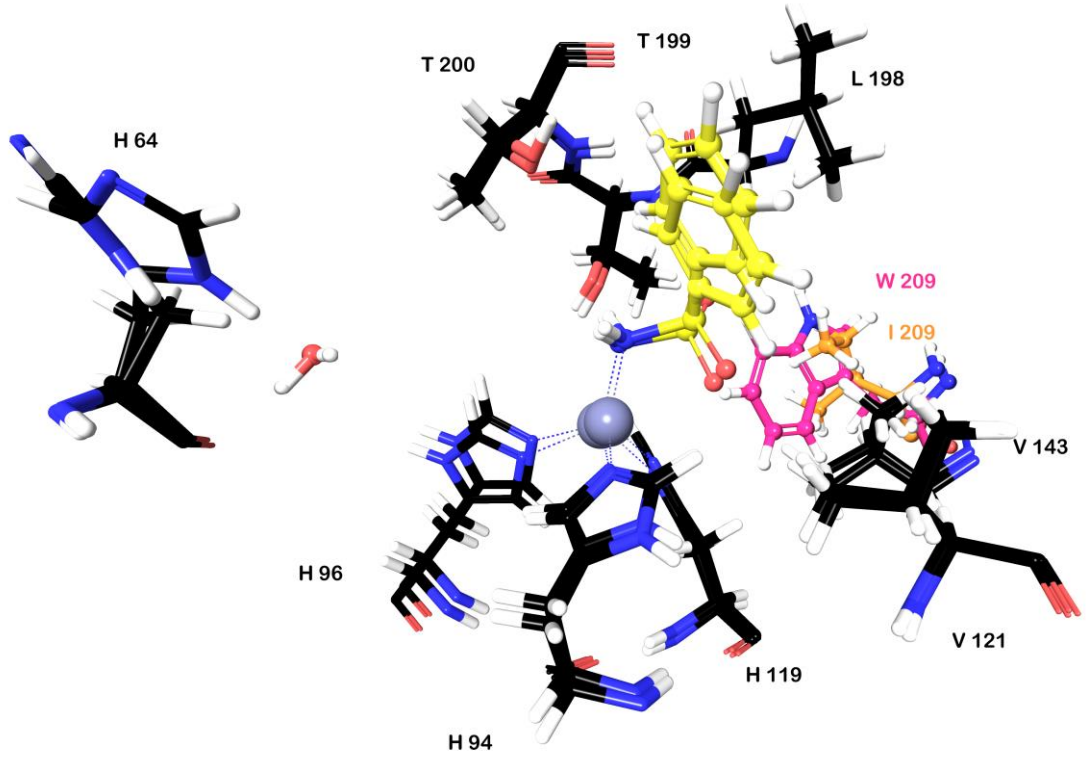
Şekil 4.55. W209L mutant protein zinciri ile doğal tip zincirin üstüste çakışma pozu



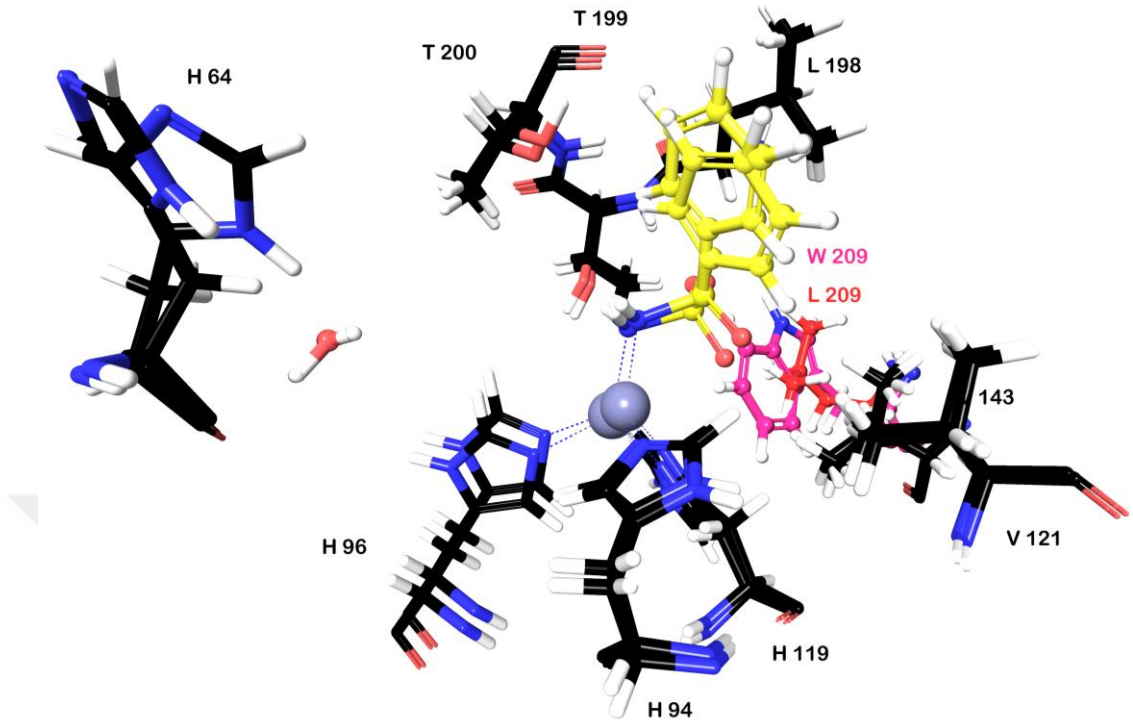
Şekil 4.56. W209P mutant protein zinciri ile doğal tip zincirin üstüste çakışma pozu



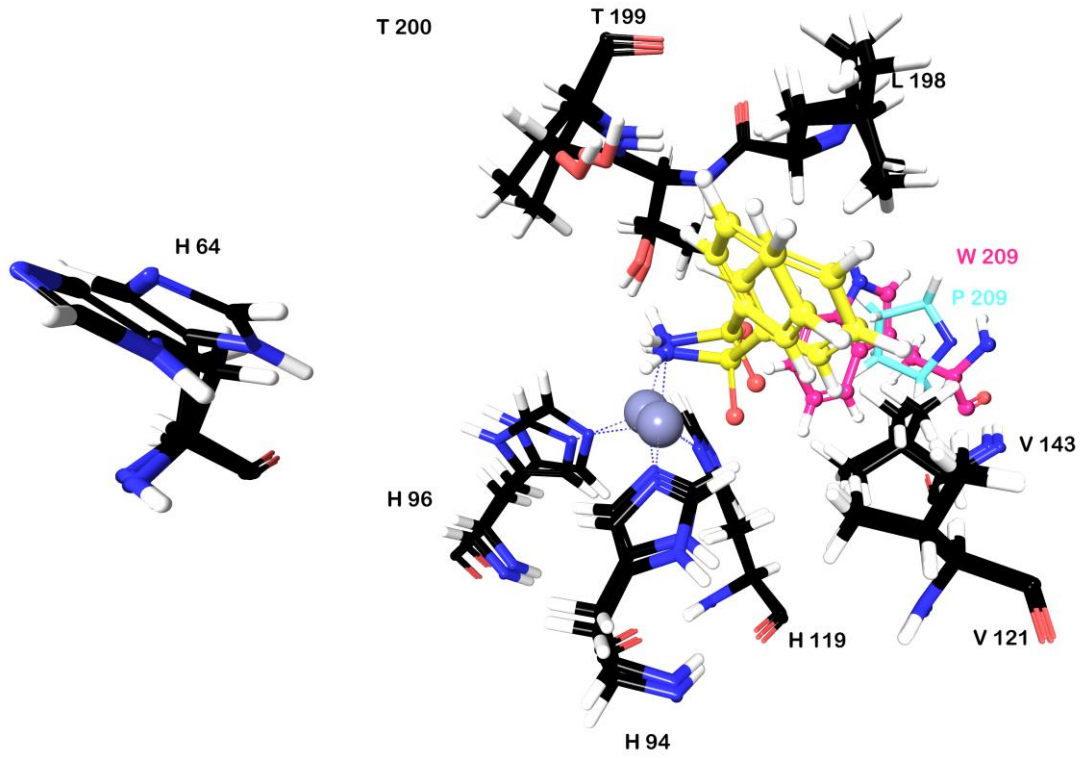
Şekil 4.57. W209V mutant protein zinciri ile doğal tip zincirin üstüste çakışma pozu



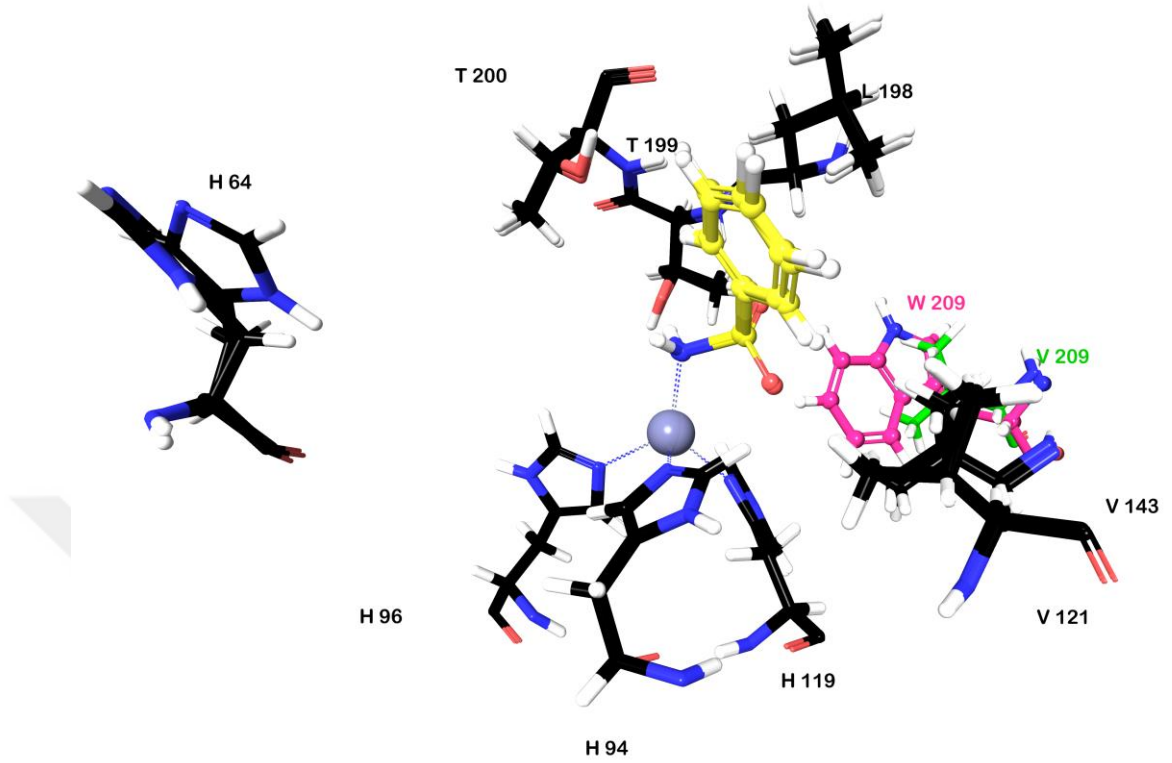
Şekil 4.58. W209I mutant proteinin doğal tip ile aktif bölge rezidülerinin üstüste çakışması



Şekil 4.59. W209L mutant proteinin doğal tip ile aktif bölge rezidülerinin üstüste çakışması



Şekil 4.60. W209P mutant proteinin doğal tip ile aktif bölge rezidülerinin üstüste çakışması



Şekil 4.61. W209V mutant proteinin doğal tip ile aktif bölge rezidülerinin üstüste çakışması

Residünün hidrofobikliğindeki değişimler 1.4 Å^0 luk yarı çapa sahip su probu kullanılarak belirlenen çözücü-erişebilir yüzey alanı (SASA) ile tahmin edildi. Mutasyonlardan dolayı bütün yüzey alanında ($\Delta \text{SASA total}$), polar atomların yüzey alanında ($\Delta \text{SASA polar}$), nonpolar atomların yüzey alanındaki değişimler ve stabilitedeki değişimler BioLuminate programı kullanılarak belirlendi (BioLuminate, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2015). Bireysel mutasyonların mutant yapıların enerjilerindeki ve stabilitesindeki değişimlere katkıları analiz edildi. Δ Stabilitate, doğal tipin mutanta dönüşümü sırasında yapıdaki stabilizasyonu sağlayabilmesi için aldığı enerjidir. Çizelge 4.13 incelendiğinde çözücü erişebilir yüzey alanlarındaki değişiklikler sırasıyla W209P, W209V, W209I ve W209L şeklinde sıralandığı belirlendi. Hidrofobik, hidrofilik ve total çözücü erişebilir yüzey alanındaki değişikliklerin hepsi için bu sıralamanın aynı olduğu gözlemlendi. Mutantların çözünme stabilitesindeki değişiklikleri sırasıyla W209P, W209V, W209I ve W209L iken, kovalent stabilitesindeki değişiklikler W209P, W209I W209L ve W209V şeklindedir. Çizelge 4.14’de mutagenез sonucu bağların stabilitesindeki değişim değerleri verildi.

Mutantların Van der waals bağlarının stabilitesindeki değişiklikler sırasıyla W209P, W209V, W209I ve W209L şeklinde olduğu belirlendi. Hidrojen bağlarının stabilitesindeki değişiklikler ise sırasıyla W209P, W209L, W209V ve W209I şeklindedir. Ayrıca W209V, W209I değerleri birbirine eşittir.

Çizelge 4.13. Hesaplamalı mutagenез sonuçları

Mutasyonlar	Çözücü Erişebilir Yüzey Alanındaki Değişiklikler (nm/S ² /N)			Δ Stabilite (Çözünme)	Δ Stabilite (Kovalent)
	Total	Hidrofobik	Hidrofilik	kcal/mol	kcal/mol
W209P	25,7	12,03	12,32	50,07	26,79
W209I	7,99	3,72	3,98	11,35	12,18
W209L	1,67	0,86	0,79	6,84	4,37
W209V	15,56	7,33	7,66	12,81	2,17

Çizelge 4.14. Mutagenез sonucu bağların stabilitesindeki değişimler

Mutasyonlar	Δ Stabilite vdW	Δ Stabilite H bond
	kcal/mol	kcal/mol
W209P	28,94	0,52
W209I	13,36	0,27
W209L	11,17	0,28
W209V	14,56	0,27

4.19. Bölge Yönelimli Mutagenез Sonuçları

Hesaplamalı olarak yapılan çalışmaların ardından “Quick Change Lighting Site Directed Mutagenesis” kiti kullanılarak PCR aracılığı ile yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları yapıldı. Mutasyonlar (Trp209Leu, Trp209Ile, Trp209Pro ve Trp209Val) hCA II enziminin aktif bölge oyuğunda; spesifik baz değişimine sahip oligonükleotidler ve kalıp olarak pET SUMO hCA II plazmiti kullanılarak gerçekleştirildi. Mutagenез primerleri hazırlanırken T_m sıcaklığının 80°C’nin üzerinde olmamasına, mutagenез oluşturulacak bölgenin primerin ortasında olmasına özen gösterildi. Ayrıca % GC

içeriği göz önüne alınarak dizayn edildi. Bu kriterlere dikkat edilerek dizayn edilen primerler Çizelge 4.15 verildi. Tasarlanan primer çiftleri Methabion şirketinden temin edildi.

Çizelge 4.15. Mutagenez primerleri

PRİMERLERİN ADI	T _m	UZUNLUK (bp)	PRİMER DİZİSİ (5'-3')
W209V F	79,10°C	40	gggttccttgagcacaatcacggtcacacattccagaaga
W209V R	79,10°C	40	tcttctggaatgtgtgaccgtgattgtgctcaaggaaccc
W209I F	78,97°C	45	gatgggttccttgagcacaattatggtcacacattccagaagagg
W209I R	78,97°C	45	cctcttctggaatgtgtgaccataattgtgctcaaggaacccatc
W209L F	78,1°C	35	gttccttgagcacaatcaaggtcacacattccaga
W209L R	78,1°C	35	tctggaatgtgtgaccttgattgtgctcaaggaac
W209P F	78,97°C	38	gggttccttgagcacaatcggggtcacacattccagaag
W209P R	78,97°C	38	cttctggaatgtgtgaccccgattgtgctcaaggaacc

4.19.1. Mutant DNA'ların eldesi

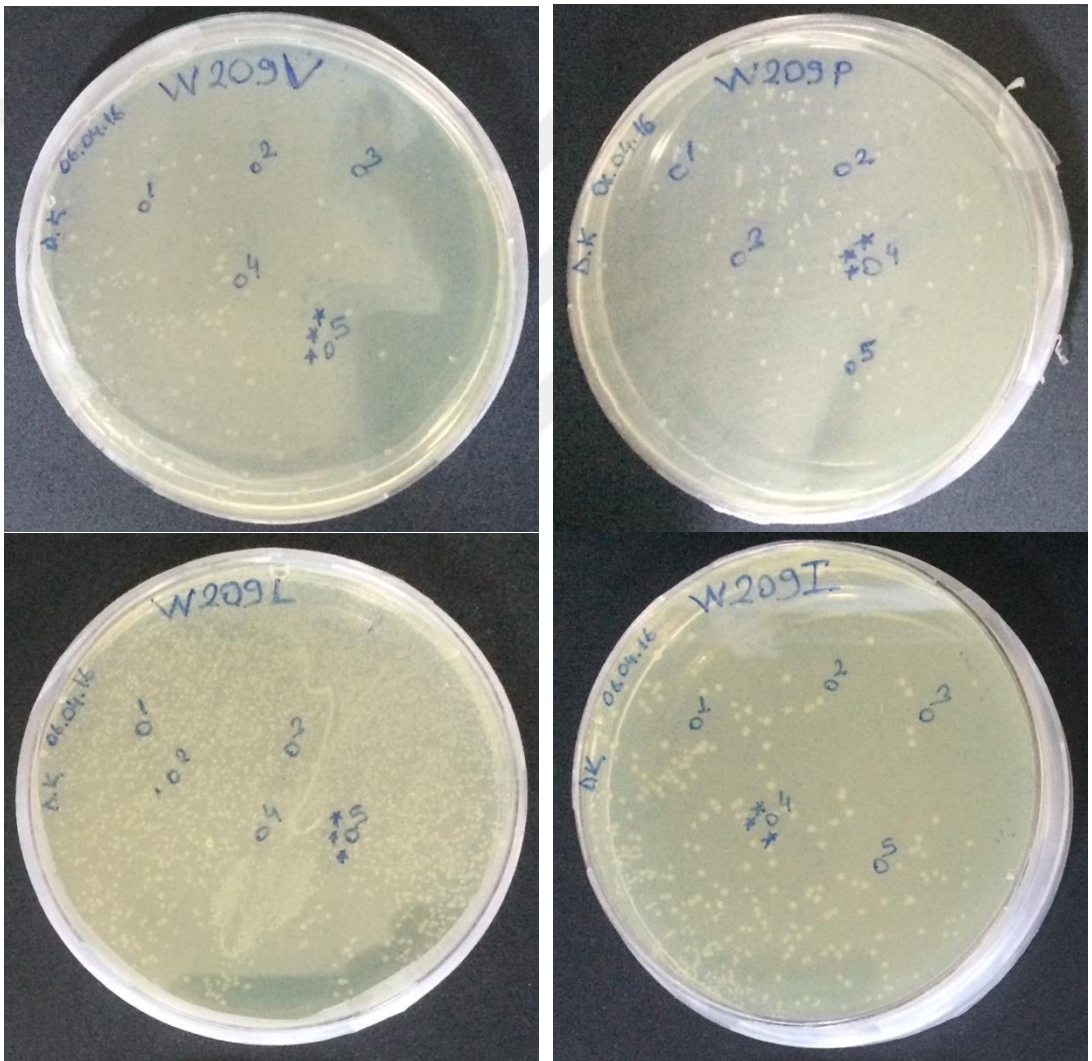
Hazırlanan mutagenez primerleri kullanılarak Çizelge 3.5'de verilen protokole göre mutant DNA sentez reaksiyonları kuruldu. Daha sonra her bir reaksiyon, Çizelge 3.6'da verilen PCR koşulları kullanılarak amplifiye edildi.

4.19.2. Amplifikasyon ürünlerinin Dpn I restriksiyon enzimi ile kesimi

PCR reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra örnekler metillenmiş ve hemimetillenmiş DNA için spesifik bir restriksiyon enzimi olan Dpn I enzimi ile muamele edildi. Bu enzim vasıtasıyla parental DNA'nın (mutasyona uğramamış) kesimi gerçekleştirildi. Böylece mutasyonu içeren DNA'nın ortamda kalması sağlandı.

4.19.3. XL1- Blue Süperkompetant hücrelere aktarım sonucu

Mutant DNA'ların çoğaltılması için XL1-Blue süperkompetant hücreleri kullanıldı. Bu hücrelere aktarım ısı-şok yöntemi ile gerçekleştirildi. Transformasyon işlemi tamamlandıktan sonra örnek karışımlar LB kanamisin içeren agar plaklara ekildi ve 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı ve Şekil 4.62'de verilen koloniler elde edildi.



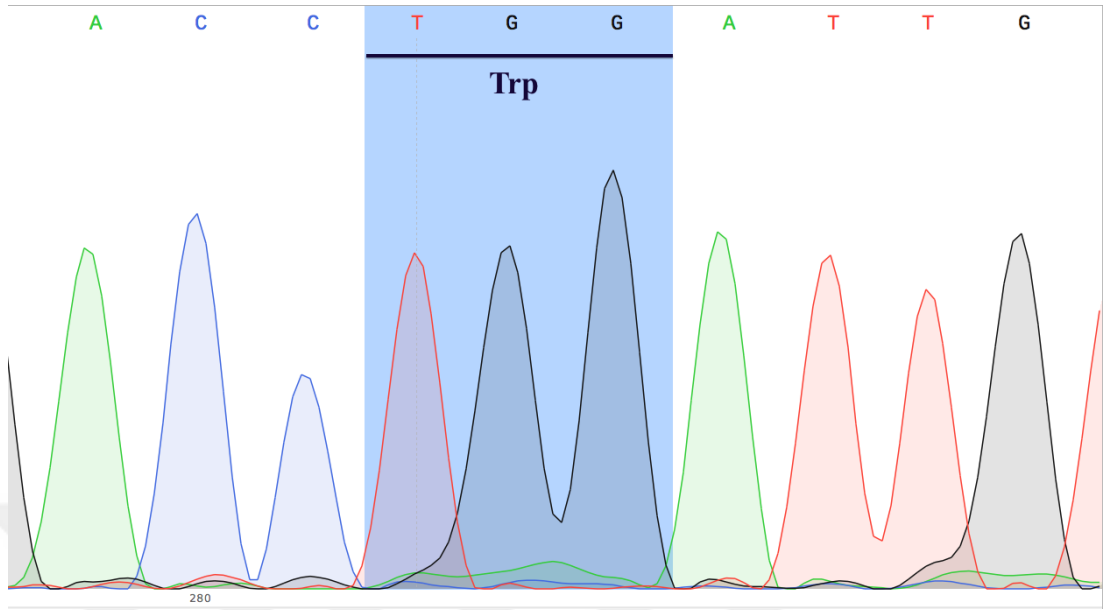
Şekil 4.62. LB-Agar fotoğrafı XL1-blue süperkompetant

4.19.4. Mutasyonların dizi analizi sonuçları

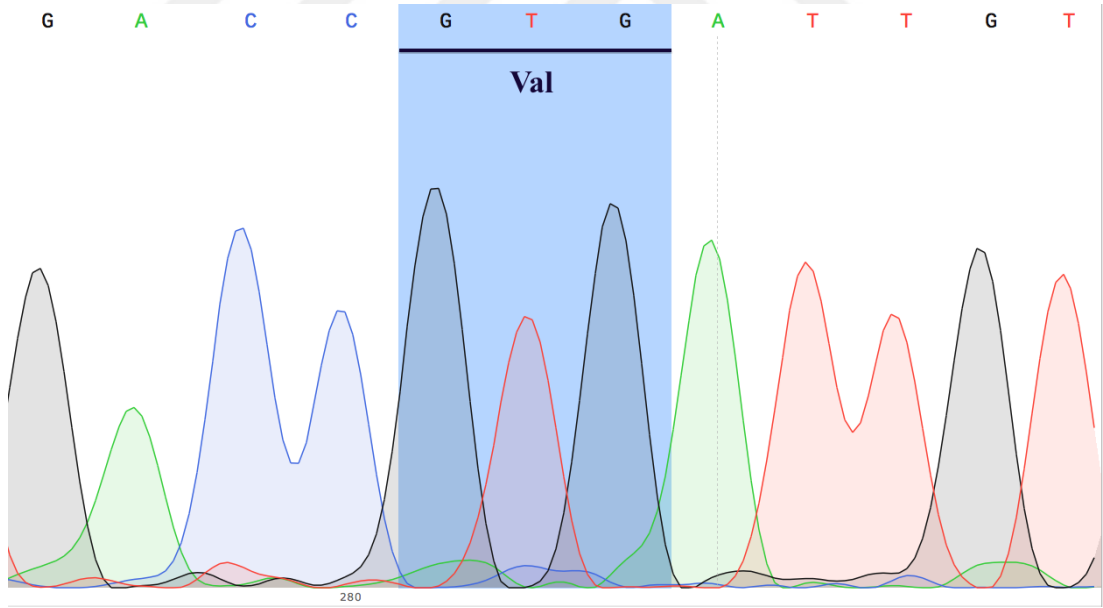
Elde edilen kolonilerdeki plazmitlerin sekans analizini yapmak için 3 adet koloni seçildi, 50 µg/ml ampisilin içeren LB sıvı besiyerine aktarıldı ve çalkalayıcı inkübatör içerisinde 37°C 225 rpm’de 16 saat inkübe edildi. Çoğaltılan mutant plazmit DNA’ları, XL1-blue süperkompetant bakterilerden miniprep kiti kullanılarak saflaştırıldı. Daha sonra hedeflenen mutasyonların varlığını doğrulamak için DNA dizi analizi yapıldı. Doğal tip ve mutant hCA II dizi analiz sonuçları Şekil 4.63-4.67’de verildi. Ayrıca elde edilen dizi analiz sonuçları hizalandı (Şekil 4.68) ve doğal tip hCA II’nin 209. pozisyonundaki mutasyonlar bu şekilde tekrar gösterildi. Aynı zamanda bu sekans sonuçlarının hizalaması ile mutagenез çalışma sırasında istenmeyen rezidülerde mutasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği hakkında bilgi elde edildi. Ayrıca bazı memeli hCA II sekanslarının hizalaması yapıldı (Şekil 4.69). Bazı memeli CA’ların sekanslarının hizalanması. Bu hizalama sonucunda CA II’lerin 209. pozisyonundaki triptofan rezidüsünün tümünde korunduğu gözlemlendi. Doğal tip ve mutant hCA II plazmit DNA’larının dizi analizleri Çizelge 4.16’da verilen primerler kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 4.16. DNA dizi analizi için kullanılan primerler

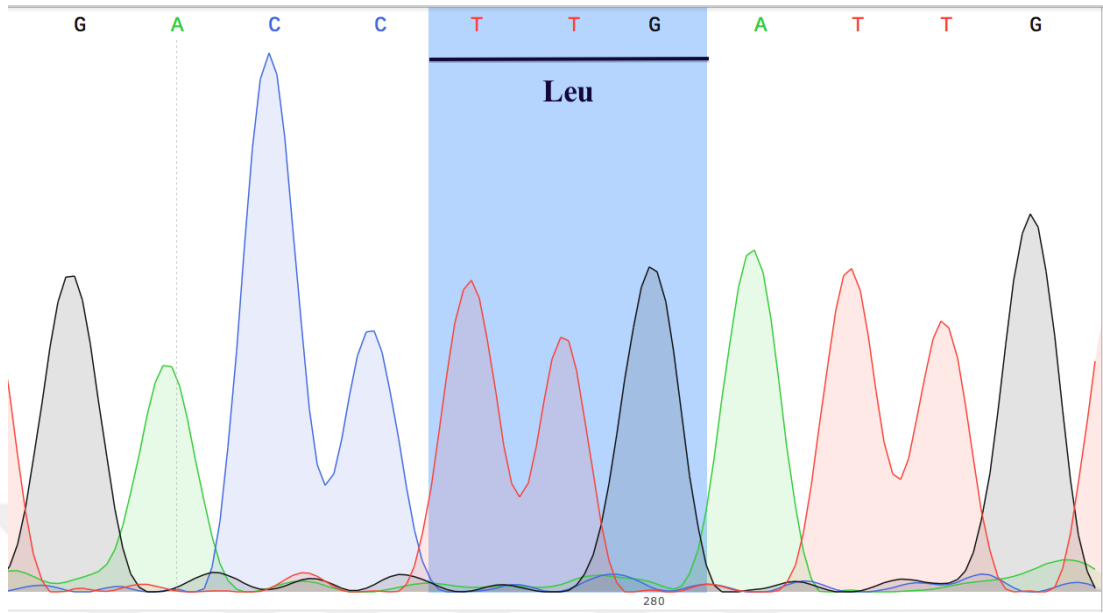
SUMO forward	5’-AGATTCTTGACGACGGTATTAG-3’
T7 revers	5’-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3’



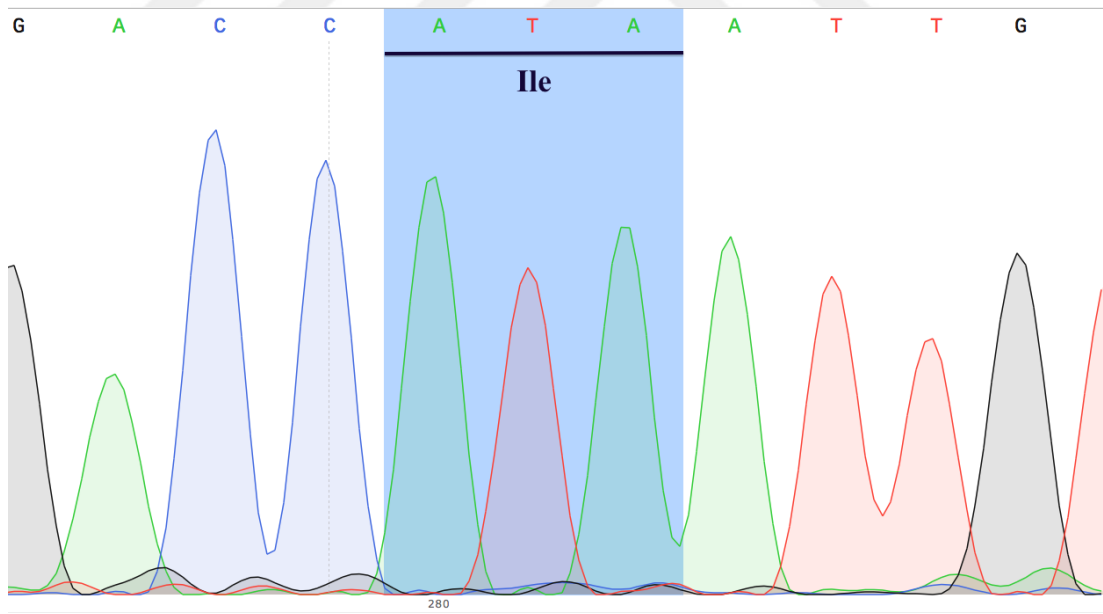
Şekil 4.63. Doğal tip hCA II'nin dizi analiz sonucu



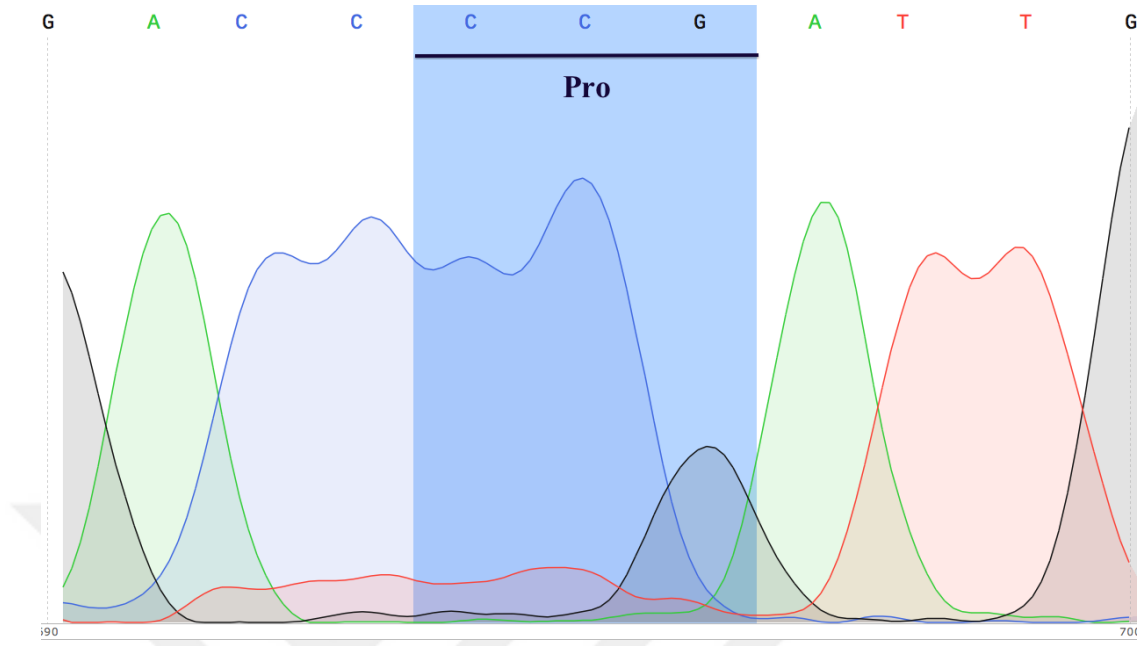
Şekil 4.64. Trp209Val hCA II'nin dizi analiz sonucu



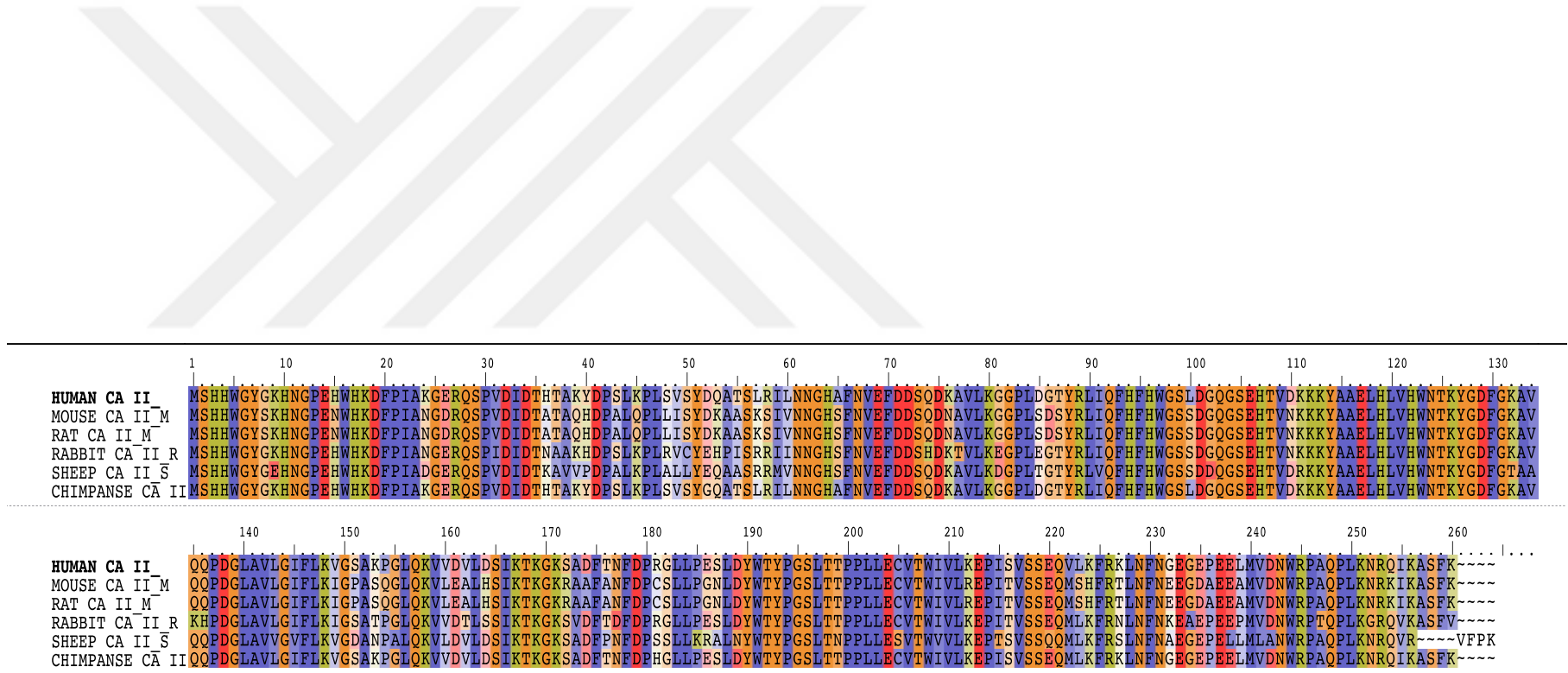
Şekil 4.65. Trp209Leu hCA II'nin dizi analiz sonucu



Şekil 4.66. Trp209Ile hCA II'nin dizi analiz sonucu



Şekil 4.67. Trp209Pro hCA II'nin dizi analiz sonucu



Şekil 4.69. Bazı memeli CA'ların sekanslarının hizalanması

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidraz II izoenziminin aktif bölgesi Val 121, Val 143, Leu 198 ve Trp 209 aminoasitlerden oluşan hidrofobik bir kısım içerir. Bu kısım karbondioksitin hidratasyon reaksiyonunu katalizlemesinin yanı sıra inhibitor ve substratın bağlanması ile ilişkilidir (Alexander *et al.* 1991; Domsic *et al.* 2008; West *et al.* 2012).

Bu çalışmamızda hCA II izoenziminin hidrofobik kısmının fonksiyonel önemini ve Trp209 rezidüsünün katalitik fonksiyonunu açıklamak için çeşitli hidrofobikliğe ve boyuta sahip aminoasitler ile yer değişimi gerçekleştirildi. İnsan karbonik anhidrazın 209 pozisyonunda triptofan aminoasiti yer alırken bazı diğer memeli canlılarda (fare, sıçan, şempaze ve tavşan) bu pozisyonun içerdiği aminoasitleri tespit etmek amacıyla hizalama yapıldı (Şekil 4.69). Hizalama sonucu incelendiğinde 209 pozisyonundaki triptofan aminoasiti, sekansları hizalanan diğer canlılarda korunmaktadır. Bu sonuca dayanarak bu rezidünün içerdiği triptofanın enzimin üç boyutlu yapıyı kazanmasında veya katalizleme reaksiyonunda önem arz ettiği kanısına varıldı. Daha sonra elde edilen kinetik bilgilerin kombinasyonu, bu rezidünün katalizlemedeki fonksiyonunun kapsamlı mekanizmasının anlaşılmasına olanak sağladı. Çalışmamızda Trp209 aminoasiti dört hidrofobik rezidü ile yer değiştirdi ve deneysel olarak Trp209Ile, Trp209Leu, Trp209Val ve Trp209Pro mutant enzimleri üretildi. Ayrıca Trp209 rezidüsünün Maestro programı kullanılarak bilgisayar ortamında mutagenез çalışması yapıldı (Maestro, version 10.5. New York, NY: Schrödinger, LLC; 2015). Mutagenез sonuçları (Çizelge 4.13-4.14)'de gösterilirken, hCA II izoenziminin polipeptid zincirindeki Trp209'un pozisyonu Şekil 4.44'de ve mutant rezidüler Şekil 4.45-4.48'de gösterildi.

Karbonik anhidraz I-II izoenzimlerinin doğal tipleri üzerine yapılan birçok mutagenез çalışması kaydedildi. Bu çalışmaların bazılarında enzimin aktivitesini belirlemek için hidrataz kullanılırken bazılarında esteraz aktivite yöntemi kullanılmıştır (Nair *et al.* 1991; Nair and Christianson 1993; Fisher *et al.* 2005; Jiang *et al.* 2008; Kockar *et al.* 2010; Mikulski *et al.* 2011a; Mikulski *et al.* 2011b; Wu *et al.* 2011; Fisher *et al.* 2012; Turkoglu *et al.* 2012; Halder and Taraphder 2013).

İnsan karbonik anhidraz II izoenziminin mutagenesi ile ilgili yapılan eski çalışmalarda, CO₂'in bağlandığı hidrofobik kısımdaki spesifik aminoasitlerin yer değiştirmesi enzimin katalitik hızındaki değişikliklerle ilişkilendirildi (Fierke *et al.* 1991; Krebs *et al.* 1993; Host and Jonsson 2008). Bu izoenzimin substratı olan CO₂'in bağlanma bölgesindeki Val143 aminoasitinin yer değiştirilmesi ile enzimin protein yapısı ve katalitik aktivitesi önemli ölçüde değişmiştir (Fierke *et al.* 1991).

Karbonik anhidraz II izoenziminin sahip olduğu triptofan aminoasitlerinin (W5F, W16F, W97C, W123C, W192F, W209F ve W245C) mutantları elde edilmiş ve bireysel olarak spektral etkileri araştırılmıştır. Ayrıca W209G ve W209S mutagenes çalışmaları yapılmıştır (Krebs and Fierke 1993; Freskgard *et al.* 1994).

Bu çalışmada gerçekleştirilen hCA II'nin Trp 209 rezidüsündeki değişiklikler aktif bölge oyuğunun sterik hacminde modifikasyonlara neden oldu. Doğal tip içerisindeki Trp209 ve mutantlarının yan zincir hacimleri Trp (229 Å³), Ile (167 Å³), Leu (167 Å³), Val (140 Å³) ve Pro (113 Å³)'dur. Bu değerlere bakıldığında elde edilen mutantların aktif bölge oyuğunda sterik hacmin azalışı yönünde etki gösterdiği anlaşılmaktadır. W209I, W209L, W209V ve W209P hCA II mutantlarının aktif bölge oyuğunun hacmindeki azalış genellikle aktivitedeki azalışı tetiklemektedir. W209V mutant doğal tip ile karşılaştırıldığında benzer spesifik aktivite gösterirken, aksine W209P, W209L ve W209I doğal tipe göre 60%, 30% ve 20% daha az aktiftir. Hidrofobik yoğunluğundaki en fazla kayıp W209P hCA II de olduğundan diğer mutantlar ile karşılaştırıldığında spesifik aktivitedeki en büyük azalış W209P hCA II de görüldü.

Bu yer değiştirmeler proton transfer yolunu etkilememesine rağmen, çözelti ve aktif bölge arasındaki proton transferine katkıları içeren hız sabitinde (k_{cat}) değişiklikler vardı. Çizelge 4.7-4.11'de görüldüğü gibi k_{cat} değerleri doğal tip ile karşılaştırıldığında W209L, W209I ve W209P mutantları sırasıyla 2-, 3-, ve 10- kat azalırken W209V mutantın k_{cat} değeri ise çok benzerdi.

İzoenzimin katalizleme olayında His64'den çinkoya bağlı hidroksite bir proton transferi için hız sabiti k_{cat} 3.3 s^{-1} 'dir. W209V mutantı diğer varyantlar ile karşılaştırıldığında en hızlı olarak belirlendi. Bu mutantın k_{cat} değeri ise 2.8 s^{-1} 'dir. hCA II varyantlarındaki aktif bölge oyuğu arttığı için k_{cat} değerindeki azalış bu sebebe dayandırılabilir. Muhtemelen mutantlarda aktif bölge oyuğu arttığından substratın çinko bağlı çözücüye uzaklığı doğal tipe kıyasla artmıştır. Bunu sonucu olarak Zn-OH ve CO₂'in eşleşmemiş elektron çiftleri arasındaki etkileşim azalmıştır. Çizelge 4.7-4.11'de görüldüğü gibi mutant enzimlerin k_{cat} ve K_M değerleri doğal tip ile kıyaslandığında farklıdır. K_M değeri doğal tip için 1,60 iken mutantların biri için bu değer 0,5'e kadar azalış gösterdi.

Trp209 rezidüsündeki değişikliklerin enzimin inhibitör özelliğini nasıl etkileyeceğini değerlendirmek için 3 benzensülfonamid ve 1 sülfonamitten oluşan küçük bir kütüphane (bileşikler 1-4) oluşturuldu ve bu bileşiklerin doğal tip ve dört mutant hCA II izoenzimleri üzerine inhibitör özellikleri araştırıldı. 1-3 bileşikleri basit aromatik ve heterosiklik benzenesülfonamid türevleridir, 4 nolu bileşik ise asetazolamittir. Bu bileşik antiglukoma hastalığı için ilaç olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda CA izoenzimlerinin inhibisyon çalışmaları tıptaki uygulamalarından dolayı önemli ölçüde dikkat çekmeye başladı (Innocenti *et al.* 2004; Senturk *et al.* 2011). Benzensülfonamid türevleri yaygın olarak CA izoenzimlerinin inhibisyon çalışmalarında rol aldılar ve sitozolik hCA II'e karşı güçlü inhibitör etkisi gösterdiler (Casini *et al.* 2000; Cecchi *et al.* 2004; Innocenti *et al.* 2004; Alp *et al.* 2012; Mete *et al.* 2016; Yaseen *et al.* 2016).

Bileşikler (1-4) için inhibisyon sabitleri belirlendi ve mutant hCA II'lerin inhibisyon sabitlerinin doğal tip ile kıyaslandığında önemli ölçüde yüksek olduğu gözlemlendi. Bu bileşiklerin inhibisyon etkisinin doğal tipe kıyasla mutantlar için daha az olduğu sonucuna varıldı. Bu bileşiklerin mutant Trp209Pro hCA II'ye karşı inhibisyon sabitleri 125–1200 μM arasında iken, Trp209Leu hCA II 40–735 μM , Trp209Ile hCA II 30–670 μM ve Trp209Val 8–540 μM arasında değerler almıştır.

Bileşiklerin (1-4) inhibitör gücündeki en yüksek azalış doğal tip ile kıyaslandığında Trp209Pro mutantında belirlendi, ardından Trp209Ile ve Trp209Leu mutantları takip etti, en az kayıp ise Trp209Val mutantında gözlemlendi (3. bileşik hariç).

İnhibitör gücündeki azalışın aktif bölge oyuğundaki artış ile direkt ilişkili olduğu etkin bir şekilde gözlenmektedir. Bu etki şöyle açıklanabilir; aktif bölge oyuğundaki bir aminoasitin dahil olduğu hidrojen bağı, vander Waals etkileşimi ve polar etkileşimlerin bozulması sonucu önemli yapısal değişikliklerin meydana gelmesidir.

Residünün hidrofobikliğindeki değişimler 1.4 Å'luk yarı çapa sahip su probu kullanılarak belirlenen çözücü-erişebilir yüzey alanı (SASA) ile tahmin edildi. Mutasyonlardan dolayı bütün yüzey alanında (Δ SASA total), polar atomların yüzey alanında (Δ SASA polar) ve nonpolar atomların yüzey alanındaki değişimler BioLuminate programı kullanılarak belirlendi (BioLuminate, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2015).

Mutasyonlardan dolayı protein stabilitesindeki değişimler Prime enerji fonksiyonu kullanılarak hesaplandı (Çizelge 4.13). Bu mutantlar içerisinde yüzey alanındaki en büyük değişim doğal tip ile karşılaştırıldığında Trp209Pro mutantında iken diğerleri de sırasıyla Trp209Val, Trp209Ile ve Trp209Leu'dir. Mutasyondan dolayı kovalent protein stabilitesindeki en az değişim Trp209Val mutantında belirlendi. Bu sonuçlara bakıldığında proteinin kovalent stabilitesindeki değişim ile deneysel olarak belirlenen enzim aktivitesindeki değişimlerin paralel olduğu kanısına varıldı. Üst üste karşılaştırılmış yapılar incelendiğinde, doğal tip ve Trp209Val'in Zn metalleri, rezidüleri (His94, His96 ve His119) benzer koordinatlarda üst üste çakıştıkları ancak diğer mutant yapıların doğal tip ile çakışmadığı görülmüştür. Aynı zamanda Şekil 4.61'ye bakıldığında Trp209Val ve doğal tipin protein iskeletlerinin çok benzer yapıya sahip olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak fizyolojik açıdan önemli ve bol bulunan bu enzim aktif bölgesinde substratın bağlanmasına katılan amino asit kalıntısı (Trp209) farklı hidrofobiklik ve

boyuta sahip rezidülerle değiştirilmiştir. W209V mutanđı, wt ile benzer spesifik aktivite değerlerine sahipken, W209P, W209L ve W209I mutanđları, sırasıyla wt'ye kıyasla, esteraz analizinde % 60, % 30 ve % 20 civarında daha az aktiviteye sahip olduğu bulundu. Ayrıca elde edilen mutant enzimlere bazı benzensülfonamidlerin afinitesi araştırılmıştır. 1-4 nolu bileşiklerin mutant enzimlere karşı ilgisi doğal tip ile kıyaslandığında ilginin önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Bu çalışma enzimin aktif bölgesindeki hidrofobik kısımda bulunan Trp 209 aminoasitinin fonksiyonunu anlamamıza olanak sağladı. Trp209Val mutanđı diğer mutanđlar ile kıyaslandığında en iyi katalik özelliğe ve benzensülfonamidlere karşı en yüksek ilgiye sahip olduğu gözlemlendi. Bilindiği üzere, aktif bölgenin hidrofobik kısmı birden fazla valin rezidüsü içermektedir. Bunlar Val 121, Val 143'dür. Bu doğrultuda bu enzimin hidrofobik kısmının valin rezidüsü ile uyumlu olduğu kanısına varıldı. Ayrıca deneysel çalışma verileri ile hesaplamalı mutagenez sonuçlarının paralel olduğu gözlemlendi.

KAYNAKLAR

- Abuladze, N., Lee, I., Newman, D., Hwang, J., Boorer, K., Pushkin, A. and Kurtz, I., 1998. Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (28), 17689-17695.
- Aggarwal, M., Kondeti, B., Tu, C.K., Maupin, C.M., Silverman, D.N. and McKenna, R., 2014. Structural insight into activity enhancement and inhibition of H64A carbonic anhydrase II by imidazoles. *Iucrj*, 1, 129-135.
- Alexander, R.S., Nair, S.K. and Christianson, D.W., 1991. Engineering the Hydrophobic Pocket of Carbonic Anhydrase-II. *Biochemistry*, 30 (46), 11064-11072.
- Alp, C., Ozsoy, S., Alp, N.A., Erdem, D., Gultekin, M.S., Kufrevioglu, O.I., Senturk, M. and Supuran, C.T., 2012. Sulfapyridine-like benzenesulfonamide derivatives as inhibitors of carbonic anhydrase isoenzymes I, II and VI. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27 (6), 818-824.
- An, H.Q., Tu, C.K., Duda, D., Montanez-Clemente, I., Math, K., Laipis, P.J., McKenna, R. and Silverman, D.N., 2002. Chemical rescue in catalysis by human carbonic anhydrases II and III. *Biochemistry*, 41 (9), 3235-3242.
- Arslan, O., ‘Glaucoma Tedavisinde Kullanmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması’, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- Bayram, T., “Köpek Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamidlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- Behravan, G., Jonasson, P., Jonsson, B.H. and Lindskog, S., 1991. Structural and Functional Differences between Carbonic-Anhydrase Isoenzyme-I and Isoenzyme-II as Studied by Site-Directed Mutagenesis. *European Journal of Biochemistry*, 198 (3), 589-592.
- Bhatt, D., Fisher, S.Z., Tu, C., McKenna, R. and Silverman, D.N., 2007. Location of binding sites in small molecule rescue of human carbonic anhydrase II. *Biophysical Journal*, 92 (2), 562-570.
- BioLuminate, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2015)
- Boone, C.D., Gill, S., Tu, C.K., Silverman, D.N. and McKenna, R., 2013. Structural, catalytic and stabilizing consequences of aromatic cluster variants in human carbonic anhydrase II. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 539 (1), 31-37.
- Boone, C.D., Rasi, V., Tu, C. and McKenna, R., 2015. Structural and catalytic effects of proline substitution and surface loop deletion in the extended active site of human carbonic anhydrase II. *Febs Journal*, 282 (8), 1445-1457.
- Casini, A., Scozzafava, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Ilies, M.A. and Supuran, C.T., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors: Water-soluble 4-sulfamoylphenylthioureas as topical intraocular pressure-lowering agents with long-lasting effects. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (25), 4884-4892.

- Cecchi, A., Winum, J.Y., Innocenti, A., Vullo, D., Montero, J.L., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2004. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides derived from 4-isothiocyanato-benzolamide. *Bioorg Med Chem Lett*, 14 (23), 5775-80.
- Chen, K.K., Liu, S., Ma, J.L., Zhang, D.X., Shi, Z.P., Du, G.C. and Chen, J., 2012. Deletion combined with saturation mutagenesis of N-terminal residues in transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* results in enhanced activity and thermostability. *Process Biochemistry*, 47 (12), 2329-2334.
- Chen, R.D., 2001. Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *Trends in Biotechnology*, 19 (1), 13-14.
- Chica, R.A., Doucet, N. and Pelletier, J.N., 2005. Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr Opin Biotechnol*, 16 (4), 378-84.
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A. and Domingues, L., 2014. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol*, 5, 63.
- Crabtree, R.H., 1994. Principles of Bioinorganic Chemistry - Lippard, S.J., Berg, J.M. Science, 266 (5190), 1591-1592.
- Domsic, J.F., Avvaru, B.S., Kim, C.U., Gruner, S.M., Agbandje-McKenna, M., Silverman, D.N. and McKenna, R., 2008. Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase II. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (45), 30766-71.
- Elleby, B., Sjoblom, B. and Lindskog, S., 1999. Changing the efficiency and specificity of the esterase activity of human carbonic anhydrase II by site-specific mutagenesis. *Eur J Biochem*, 262 (2), 516-21.
- Elleby, B., Sjoblom, B., Tu, C.K., Silverman, D.N. and Lindskog, S., 2000. Enhancement of catalytic efficiency by the combination of site-specific mutations in a carbonic anhydrase-related protein. *European Journal of Biochemistry*, 267 (19), 5908-5915.
- Engstrand, C., Forsman, C., Liang, Z.W. and Lindskog, S., 1992. Proton-Transfer Roles of Lysine-64 and Glutamic Acid-64 Replacing Histidine-64 in the Active-Site of Human Carbonic Anhydrase-II. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1122 (3), 321-326.
- Eriksson, I., Berggren, L. and Hallgren, S., 1986. CO₂ production and breathing pattern during invasive and non-invasive respiratory monitoring. *Acta Anaesthesiol Scand*, 30 (6), 438-43.
- Fierke, C.A., Calderone, T.L. and Krebs, J.F., 1991. Functional consequences of engineering the hydrophobic pocket of carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, 30 (46), 11054-63.
- Fisher, S.Z., Tu, C., Bhatt, D., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., McKenna, R. and Silverman, D.N., 2007. Speeding up proton transfer in a fast enzyme: Kinetic and crystallographic studies on the effect of hydrophobic amino acid substitutions in the active site of human carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, 46 (12), 3803-3813.
- Fisher, Z., Boone, C.D., Biswas, S.M., Venkatakrishnan, B., Aggarwal, M., Tu, C., Agbandje-McKenna, M., Silverman, D. and McKenna, R., 2012. Kinetic and

- structural characterization of thermostabilized mutants of human carbonic anhydrase II. *Protein Engineering Design & Selection*, 25 (7), 347-355.
- Fisher, Z., Prada, J.A.H., Tu, C., Duda, D., Yoshioka, C., An, H.Q., Govindasamy, L., Silverman, D.N. and McKenna, R., 2005. Structural and kinetic characterization of active-site histidine as a proton shuttle in catalysis by human carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, 44 (4), 1097-1105.
- Forsman, C., Behravan, G., Jonsson, B.H., Liang, Z.W., Lindskog, S., Ren, X.L., Sandstrom, J. and Wallgren, K., 1988. Histidine-64 Is Not Required for High Co2 Hydration Activity of Human Carbonic Anhydrase-Ii. *Febs Letters*, 229 (2), 360-362.
- Frazier, M.L., Lilly, B.J., Wu, E.F., Ota, T. and Hewettemmett, D., 1990. Carbonic Anhydrase-Ii Gene-Expression in Cell-Lines from Human Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas*, 5 (5), 507-514.
- Freskgard, P.O., Martensson, L.G., Jonasson, P., Jonsson, B.H. and Carlsson, U., 1994. Assignment of the Contribution of the Tryptophan Residues to the Circular-Dichroism Spectrum of Human Carbonic-Anhydrase .2. *Biochemistry*, 33 (47), 14281-14288.
- Genis, C., Sippel, K.H., Case, N., Cao, W.G., Avvaru, B.S., Tartaglia, L.J., Govindasamy, L., Tu, C., Agbandje-McKenna, M., Silverman, D.N., Rosser, C.J. and McKenna, R., 2009. Design of a Carbonic Anhydrase IX Active-Site Mimic To Screen Inhibitors for Possible Anticancer Properties. *Biochemistry*, 48 (6), 1322-1331.
- Gumulya, Y., Sanchis, J. and Reetz, M.T., 2012. Many Pathways in Laboratory Evolution Can Lead to Improved Enzymes: How to Escape from Local Minima. *Chembiochem*, 13 (7), 1060-1066.
- Halder, P. and Taraphder, S., 2013. Modeling the structure and proton transfer pathways of the mutant His-107-Tyr of human carbonic anhydrase II. *Journal of Molecular Modeling*, 19 (1), 289-298.
- Hilvo, M., "Expression studies on carbonic anhydrase IX", Master's thesis, Institute of Medical Technology, University of Tampere, April 2005.
- Host, G., Martensson, L.G. and Jonsson, B.H., 2006. Redesign of human carbonic anhydrase II for increased esterase activity and specificity towards esters with long acyl chains. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1764 (10), 1601-1606.
- Host, G.E. and Jonsson, B.H., 2008. Converting human carbonic anhydrase II into a benzoate ester hydrolase through rational redesign. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1784 (5), 811-815.
- Host, G.E., Razkin, J., Baltzer, L. and Jonsson, B.H., 2007. Combined enzyme and substrate design: Grafting of a cooperative two-histidine catalytic motif into a protein targeted at the scissile bond in a designed ester substrate. *Chembiochem*, 8 (13), 1570-1576.
- Hunt, J.A. and Fierke, C.A., 1997. Selection of carbonic anhydrase variants displayed on phage - Aromatic residues in zinc binding site enhance metal affinity and equilibration kinetics. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (33), 20364-20372.
- Innocenti, A., Casini, A., Alcaro, M.C., Papini, A.M., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2004. Carbonic anhydrase inhibitors: The first on-resin screening of a 4-

- sulfamoylphenylthiourea library. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (21), 5224-5229.
- Jewell, D.A., Tu, C.K., Paranawithana, S.R., Tanhauser, S.M., Lograsso, P.V., Laipis, P.J. and Silverman, D.N., 1991. Enhancement of the Catalytic Properties of Human Carbonic Anhydrase-Iii by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry*, 30 (6), 1484-1490.
- Jiang, Y., Su, J.T., Zhang, J., Wei, X., Yan, Y.B. and Zhou, H.M., 2008. Reshaping the folding energy landscape of human carbonic anhydrase II by a single point genetic mutation Pro237His. *Int J Biochem Cell Biol*, 40 (4), 776-88.
- Jones, L.H., 2009. Thermodynamic optimization of carbonic anhydrase fragment inhibitors. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 238.
- Kockar, F., Maresca, A., Aydin, M., Isik, S., Turkoglu, S., Sinan, S., Arslan, O., Guler, O.O., Turan, Y. and Supuran, C.T., 2010. Mutation of Phe91 to Asn in human carbonic anhydrase I unexpectedly enhanced both catalytic activity and affinity for sulfonamide inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18 (15), 5498-5503.
- Krebs, J.F. and Fierke, C.A., 1993. Determinants of Catalytic Activity and Stability of Carbonic Anhydrase-Ii as Revealed by Random Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (2), 948-954.
- Krebs, J.F., Rana, F., Dluhy, R.A. and Fierke, C.A., 1993. Kinetic and spectroscopic studies of hydrophilic amino acid substitutions in the hydrophobic pocket of human carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, 32 (17), 4496-505.
- Krishnamurthy, V.M., Kaufman, G.K., Urbach, A.R., Gitlin, I., Gudiksen, K.L., Weibel, D.B. and Whitesides, G.M., 2008. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chemical Reviews*, 108 (3), 946-1051.
- Kumpulainen, T. and Jalovaara, P., 1981. Immunohistochemical Localization of Carbonic-Anhydrase Isoenzymes in the Human-Pancreas. *Gastroenterology*, 80 (4), 796-799.
- Leppilampi, M., "Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX", Master's thesis, Faculty of Medicine, University of Oulu, February 2006.
- Lindskog, S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics*, 74 (1), 1-20.
- Marino, C.R., Jeanes, V., Boron, W.F. and Schmitt, B.M., 1999. Expression and distribution of the $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter in human pancreas. *Am J Physiol*, 277 (2 Pt 1), G487-94.
- Martensson, L.G., Jonsson, B.H., Andersson, M., Kihlgren, A., Bergenheim, N. and Carlsson, U., 1992. Role of an Evolutionarily Invariant Serine for the Stability of Human Carbonic Anhydrase-Ii. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1118 (2), 179-186.
- Martensson, L.G., Jonsson, B.H., Freskgard, P.O., Kihlgren, A., Svensson, M. and Carlsson, U., 1993. Characterization of Folding Intermediates of Human Carbonic-Anhydrase .2. Probing Substructure by Chemical Labeling of Sh-Groups Introduced by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry*, 32 (1), 224-231.

- Mete, E., Comez, B., Inci Gul, H., Gulcin, I. and Supuran, C.T., 2016. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory activities of new thienyl-substituted pyrazoline benzenesulfonamides. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 1-5.
- Mikulski, R., Avvaru, B.S., Tu, C., Case, N., McKenna, R. and Silverman, D.N., 2011a. Kinetic and crystallographic studies of the role of tyrosine 7 in the active site of human carbonic anhydrase II. *Arch Biochem Biophys*, 506 (2), 181-7.
- Mikulski, R., Avvaru, B.S., Tu, C.K., Case, N., McKenna, R. and Silverman, D.N., 2011b. Kinetic and crystallographic studies of the role of tyrosine 7 in the active site human carbonic anhydrase II. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 506 (2), 181-187.
- Mikulski, R., Domsic, J.F., Ling, G., Tu, C.K., Robbins, A.H., Silverman, D.N. and McKenna, R., 2011c. Structure and catalysis by carbonic anhydrase II: Role of active-site tryptophan 5. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 516 (2), 97-102.
- Mikulski, R., West, D., Sippel, K.H., Avvaru, B.S., Aggarwal, M., Tu, C., McKenna, R. and Silverman, D.N., 2013. Water Networks in Fast Proton Transfer during Catalysis by Human Carbonic Anhydrase II. *Biochemistry*, 52 (1), 125-131.
- Nair, S.K., Calderone, T.L., Christianson, D.W. and Fierke, C.A., 1991. Altering the Mouth of a Hydrophobic Pocket - Structure and Kinetics of Human Carbonic Anhydrase-II Mutants at Residue Val-121. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (26), 17320-17325.
- Nair, S.K. and Christianson, D.W., 1993. Structural consequences of hydrophilic amino acid substitutions in the hydrophobic pocket of human carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, 32 (17), 4506-14.
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L.F., Schildkraut, I. and Aggarwal, A.K., 1994. Structure of Restriction-Endonuclease BamHI and Its Relationship to EcoRI. *Nature*, 368 (6472), 660-664.
- Nishimori, I., FujikawaAdachi, K., Onishi, S. and Hollingsworth, M.A., 1999. Carbonic anhydrase in human pancreas: hypotheses for the pathophysiological roles of CA isozymes. *Ann N Y Acad Sci*, 880, 5-16.
- Parkkila, S., Parkkila, A.K., Juvonen, T. and Rajaniemi, H., 1994. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut*, 35 (5), 646-50.
- Pinard, M.A., Boone, C.D., Rife, B.D., Supuran, C.T. and McKenna, R., 2013. Structural study of interaction between brinzolamide and dorzolamide inhibition of human carbonic anhydrases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21 (22), 7210-7215.
- Raeder, M.G., 1992. The Origin of and Subcellular Mechanisms Causing Pancreatic Bicarbonate Secretion. *Gastroenterology*, 103 (5), 1674-1684.
- Sağdıç, C. 2015. Q102R And Q203I Double Mutant Effects On Substrate Specificity And Activator Requirement In BslDH Enzyme M.Sc. Thesis. Istanbul Technical University
- Sastry, G.M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. and Sherman, W., 2013. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27 (3), 221-234.
- Schrödinger Suite 2017-2 Protein Preparation Wizard

- Schueler, C., Becker, H.M., McKenna, R. and Deitmer, J.W., 2011. Transport Activity of the Sodium Bicarbonate Cotransporter NBCe1 Is Enhanced by Different Isoforms of Carbonic Anhydrase. *Plos One*, 6 (11).
- Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2001. Carbonic anhydrase and matrix metalloproteinase inhibitors: Sulfonylated amino acid hydroxamates with MMP inhibitory properties act as efficient inhibitors of CA isozymes I, II, and IV, and N-hydroxysulfonamides inhibit both these zinc enzymes (vol 43, pg 3680, 2000). *Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (6), 1016-1016.
- Senturk, M., Gulcin, I., Beydemir, S., Kufrevioglu, O.I. and Supuran, C.T., 2011. In Vitro inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chem Biol Drug Des*, 77 (6), 494-9.
- Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995. Human Carbonic-Anhydrases and Carbonic-Anhydrase Deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 375-401.
- Stryjewska, A., Kiepusa, K., Librowski, T. and Lochynski, S., 2013. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacological Reports*, 65 (5), 1075-1085.
- Supuran, C.T., 2011. Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Molecular Diversity*, 15 (2), 305-316.
- Tavousi, P., Behandish, M., Ilieş, H.T and Kazerounian, K. 2016. Prototfold II:Enhanced Model and Implementation for Kinetostatic Protein Folding. *J. Nanotechnol. Eng. Med* 6(3), 034601.
- Tschammer, N. 2007. Helical Packing Regulates Structural Transitions In Bax. *phD Thesis*, University of Central Florida, Florida.
- Tu, C.K., Silverman, D.N., Forsman, C., Jonsson, B.H. and Lindskog, S., 1989. Role of Histidine-64 in the Catalytic Mechanism of Human Carbonic Anhydrase-II Studied with a Site-Specific Mutant. *Biochemistry*, 28 (19), 7913-7918.
- Turkoglu, S., Maresca, A., Alper, M., Kockar, F., Isik, S., Sinan, S., Ozensoy, O., Arslan, O. and Supuran, C.T., 2012. Mutation of active site residues Asn67 to Ile, Gln92 to Val and Leu204 to Ser in human carbonic anhydrase II: Influences on the catalytic activity and affinity for inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20 (7), 2208-2213.
- Waugh, D.S., 2005. Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology*, 23 (6), 316-320.
- West, D., Kim, C.U., Tu, C.K., Robbins, A.H., Gruner, S.M., Silverman, D.N. and McKenna, R., 2012. Structural and Kinetic Effects on Changes in the CO₂ Binding Pocket of Human Carbonic Anhydrase II. *Biochemistry*, 51 (45), 9156-9163.
- Wu, M.J., Jiang, Y. and Yan, Y.B., 2011. Impact of the 237th residue on the folding of human carbonic anhydrase II. *Int J Mol Sci*, 12 (5), 2797-807.
- Yamamoto, I., Saiki, T., Liu, S.M. and Ljungdahl, L.G., 1983. Purification and Properties of NADP-Dependent Formate Dehydrogenase from *Clostridium-Thermoaceticum*, a Tungsten-Selenium-Iron Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 258 (3), 1826-1832.
- Yang, H., Li, J., Shin, H.D., Du, G., Liu, L. and Chen, J., 2014. Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98 (1), 23-9.

- Yaseen, R., Ekinci, D., Senturk, M., Hameed, A.D., Ovais, S., Rathore, P., Samim, M., Javed, K. and Supuran, C.T., 2016. Pyridazinone substituted benzenesulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26 (4), 1337-1341.
- Zheng, J.Y., Avvaru, B.S., Tu, C., McKenna, R. and Silverman, D.N., 2008. Role of Hydrophilic Residues in Proton Transfer during Catalysis by Human Carbonic Anhydrase II. *Biochemistry*, 47 (46), 12028-12036.



ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2005 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldu. 2009 yılında başladığı yüksek lisans öğrenimini 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda tamamlayarak aynı yıl, aynı birimde doktora eğitimine başladı. 2010 yılında Aksaray Üniversitesine ÖYP araştırma görevlisi olarak atandı. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak görevlendirildi.