



**KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN KOYUN KALP DOKUSUNDAN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE YENİ SENTEZLENEN
SÜLFONAMİD KALKONLARIN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mustafa ORHAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

Doç.Dr.Murat ŞENTÜRK

2017

Her hakkı saklıdır

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN KOYUN KALP DOKUSUNDAN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE YENİ SENTEZLENEN
SÜLFONAMİD KALKONLARIN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

MustafaORHAN

KİMYA ANABİLİM DALI

AĞRI
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN KOYUN KALP DOKUSUNDAN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE YENİ SENTEZLENEN SÜLFONAMİD KALKONLARIN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK danışmanlığında, Mustafa ORHAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 04/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : **Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK**

İmza :

Üye : **Yrd. Doç. Dr. İmdat AYGÜL**

İmza :

Üye : **Yrd. Doç. Dr. Aykut ÖZTEKİN**

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../201.. tarih ve / nolu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TUBİTAK Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu birirmince desteklenmektedir.
Proje No: 115Z078.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN KOYUN KALP DOKUSUNDAN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE YENİ SENTEZLENEN
SÜLFONAMİD KALKONLARIN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Jüri: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Yrd. Doç. Dr. İmdat AYGÜL

Yrd. Doç. Dr. Aykut ÖZTEKİN

Bu çalışmada koyun kalp dokusundan CA enzimi 900 EU/mg spesifik aktivite ve %46,15 verimle ve 51,93 saflaştırma katsayısı ile Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Koyun kalp CA izoenzimi için molekül kütlesi 31 kDa olarak belirlendi. Ayrıca bu enzim için yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimumiyonik şiddet50 mM KH₂PO₄, optimum pH:7,5ve stabil pH:7,5 değerleri belirlendi. Bu tez kapsamında azo grubu içeren yeni sülfonamid kalkonlar sentezlenmiştir. Sentezlenen yeni bileşiklerin karakterizasyonu, NMR, MS, FT- IR, elemental analiz gibi spektroskopik yöntemler ile belirlenerek yapıları aydınlatılmıştır. Sentezi gerçekleştirilen yeni azo sülfonamid kalkonların, koyun kalp CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi gösteren maddeler için IC50 değerleri tespit edilmiştir.

2017, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karbonik anhidraz, enzim, koyun kalp, azosülfonamid

ABSTRACT
MASTER THESIS

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE
ENZYME FROM SHEEP HEART TISSUE AND INVESTIGATION OF THE
EFFECTS OF NEW SYNTHESIZED SULFONAMIDE CHALCONES**

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

Juries: Assoc. Prof. Murat ŞENTÜRK

Assist. Prof. Dr. İmdat AYGÜL

Assist. Prof. Dr. Aykut ÖZTEKİN

In this study, sheep heart tissue was purified using Sepharose-4B-L-tyrosine-sulfanilamide affinity chromatography with a specific activity of 900 EU / mg and a yield of 46.15% and a purification coefficient of 51.93. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed to check the purity of the purified enzyme and a single band was observed. The molecular mass for the isoenzymia of the sheep heart was determined to be 31 kDa. In addition, optimum ionic strength 50 mM KH_2PO_4 , optimum pH: 7.5 and stabilization pH: 7.5 values were determined in the characterization studies performed for this enzyme. In this thesis, new sulfonamide chalcone containing azo group is synthesized. The characterization of the synthesized new compounds was determined by means of spectroscopic methods such as NMR, MS, FT-IR and elemental analysis. IC_{50} values for novel azo sulphonamide chalcone synthesized by the inhibitory effect on sheep heart enzyme were determined.

2017, 53 pages

Keywords : Carbonic anhydrase, enzyme, sheep heart, azosulfonamide

TEŞEKKÜR

Yükseklisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve uygulama Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana rehber olan, sabrını, maddi ve manevi desteğini benden hiç esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında arkadaşlığını ve yardımlarını esirgemeyen kadim dostum Sayın Habip ÇELİK'e ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı Annem'e, Babam'a, Eşim'e, oğlum Ali Yasir'e ve bütün aileme sonsuz teşekkürlerimi ve şükran duygularımı sunarım.

Mustafa ORHAN

Aralık 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi	4
1.2. Karbonik Anhidrazların Katalitik ve İnhibisyon Mekanizması	6
1.3. Sülfonamidler	13
1.4. Çalışmanın Amacı	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	22
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	22
3.1.3. Afinite kolonunda ve PAGE’de kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları	22
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Protein tayini	25
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	25
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini	25
3.2.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini	25
3.2.3. Afinite kromatografisi jelinin hazırlanması	26
3.2.3.a. Afinite kolonunun paketlenmesi	27
3.2.4. Koyun kalp dokusundan CA enziminin saflaştırılması	27
3.2.5. Koyun kalp dokusundan elde edilen enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması	27
3.2.6. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü	278
3.2.7. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için kinetik çalışmalar	28
3.2.7.a. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum iyonik şiddet çalışması	28

3.2.7.b. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum pH çalışması.....	29
3.2.7.c. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için stabil pH çalışması	29
3.2.7.d. Koyunkalp dokusundan saflaştırılan CA enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi	29
4. ARAşTIRMA BULGULARI	30
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik	30
4.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü	31
4.3. Koyun Kalp Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar	32
4.3.1. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	32
4.3.2. Koyun kalbinden saflaştırılan CA enzimi için optimum pH çalışması.....	33
4.3.2.a. KH_2PO_4 tamponu için optimum pH çalışması	33
4.3.2.b. Tris- SO_4 için optimum pH çalışması.....	35
4.3.3. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için stabil pH çalışması.....	36
4.3.4. Azosülfon Amidlerin Sentezi	37
4.3.4.1. (E)-4-((5-asetil-2-hidroksifenil)diazenil)benzensülfonamid (4).....	37
4.3.4.2. Azo sülfonamid kalkonların (5a-g) sentezi için genel yöntem	38
4.3.5 Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi Üzerine Bazı Anyonların Esteraz Metodu ile Belirlenmesi	39
5. TARTIşMA ve SONUÇ	44
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİş	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CA	: Karbonik anhidraz enzimi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E	: Enzim
E.C.	: Enzim kod numarası
E.Ü.	: Enzim Ünitesi
EI	: Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	: Enzim-substrat kompleksi
ESI	: Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
I	: İnhibitör
I ₅₀	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	: Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
M _A	: Molekül kütlesi
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
S	: Substrat
SCA	: Koyun karbonik anhidraz IV izoenzimi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
V	: Hacim
V _{max}	: Maksimum hız
λ	: Dalga boyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Karbonik anhidraz enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi.....	7
Şekil 1.2. CA ların eritrositlerdeki rolü.....	12
Şekil 1.3. Sülfonamidlerin genel yapısı ..	14
Şekil 1.4. Klinikte kullanılan birincil sülfonamid ilaçları - CA inhibitörleri...	15
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik...	30
Şekil 4.2. SDS- PAGE fotoğrafı 1 numaralı kuyu: Standart proteinler (66 kda, 45 kda, 29 kda) ve 2 numaralı kuyu: (koyun kalbinden saflaştırılan CA).	31
Şekil 4.3. 50 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak koyun kalp CA enziminin optimum iyonik şiddeti için değişim grafiği.....	33
Şekil 4.4. 50 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak koyun kalp CA enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği.....	34
Şekil 4.5. 20 mM Tris-SO ₄ Tampon çözeltileri kullanılarak koyun kalbi CA enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği.....	35
Şekil 4.6. Değişik pH'lardaki 50 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak koyun kalp CA enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	36
Şekil 4.7. Değişik pH'lardaki 20 mM Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak koyun kalp CA enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	37
Şekil 4.8. <i>o</i> -hidroksiazo bileşiği (4) sentezlenmiş olup reaksiyona ait genel reaksiyon denklemi	38
Şekil 4.9. 5a-5g kodlu bileşiklerin genel molekül şekli.....	39
Şekil 4.10. Koyun kalp CA enzimi üzerine 5a numaralı sülfonamidin etkisi	39
Şekil 4.11. Koyun kalp CA enzimi üzerine 5b numaralı sülfonamidin etkisi	40
Şekil 4.12. Koyun kalp CA enzimi üzerine 5c numaralı sülfonamidin etkisi	40
Şekil 4.13. Koyun kalp CA enzimi üzerine 5d numaralı sülfonamidin etkisi	41
Şekil 4.14. Koyun kalp CA enzimi üzerine 5e numaralı sülfonamidin etkisi	41
Şekil 4.15. Koyun kalp CA enzimi üzerine 5f numaralı sülfonamidin etkisi	42
Şekil 4.16. Koyun kalp CA enzimi üzerine 5g numaralı sülfonamidin etkisi	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. CA izoenzimlerinin katalitik aktiviteleri, sülfanamidlere ilgileri ve hücre içinde bulunma yerleri.....	8
Çizelge 4.1. Koyun kalbinden CA enziminin sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma sonuçları.....	31
Çizelge 4.2. Koyun kalbi CA enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	33
Çizelge 4.3. 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun kalp CA enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	34
Çizelge 4.4. 20 mM Tris- SO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun kalp CA enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	35
Çizelge 4.5. Koyun kalp CA enziminin stabil pH'sı için 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	36
Çizelge 4.6. Koyun kalp CA enziminin stabil pH'sı için 20 mM Tris- SO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	37
Çizelge 4.7. Koyun kalp CA enzimleri için bulunan IC_{50} değerleri.....	43

1. GİRİŞ

Laboratuvarlar birçok önemli kimyasal reaksiyonların kimyagerler tarafından gerçekleştirildiği ve buradan çıkan sonuçların insanlığa sunulduğu önemli merkezlerdir. Bunun gibi her canlı vücudunda da milyonlarca laboratuvarın varlığı dikkatlerden kaçmamalıdır. Hücre ve hücrelerden oluşmuş canlılar durup dinlenmeden reaksiyonlar gerçekleştiren kimyasal laboratuvarlardır. Bu laboratuvarlarda iş gören kimyagerler ise enzim olarak adlandırılan biyo-makromoleküllerdir. Biyokimya tarihinde en fazla yer kaplayan çalışmalar enzimler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Lehninger 2005).

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmadan %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve özelleşmiş grubunu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu 2007).

Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa veya altbirimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle yok olur (Lehninger 2005).

Enzimler diğer proteinler gibi yaklaşık 12000'den 1 milyona kadar değişen molekül kütlesine sahiptir. Bazı enzimler amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara gereksinim duymaz. Diğerleri **kofaktör** olarak adlandırılan Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} veya Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya **koenzim** olarak adlandırılan kompleks organik ve metalloorganik moleküllere gereksinir. Bazı enzimler aktivite için hem koenzime hem de bir ya da birden fazla metal iyonuna gereksinir. Enzim proteinine çok sıkı olarak veya hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu bir **prostetik grup** olarak adlandırılır. Metal iyonlarıyla ve/veya koenzimleriyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim **holoenzim** olarak adlandırılır. Bu gibi enzimlerin protein kısmı **apoenzim** veya **apoprotein** olarak adlandırılır (Lehninger 2005).

Birçok enzim aktivitesini tarif eden deyim veya kelimeye ya da substratın adına “-az” son eki ilavesiyle adlandırılır. Böylece üreaz; ürenin hidrolizini, DNA polimeraz; DNA oluşturmak üzere nükleotidlerin polimerleşmesini katalizler. Pepsin ve tripsin gibi diğer enzimler substratlarını veya tepkimelerini belirtmeksizin isimlendirilir. Zamanla, birçok enzimin daha ortaya çıkarılması sonucu, sistematik bir isimlendirilmeye ihtiyaç duyuldu. Bunun üzerine enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre bir sınıflandırılmaya tabi tutuldu. Örneğin E.C.2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu; 7 bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1 fosfat transferinin alkol grubuna olduğunu ve son 1 rakamıda bu enzimin alkol grubuna fosfat transferini sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını göstermektedir.

Enzimler 6 gruba ayrılmışlardır;

1. Oksiredüktazlar : 2 substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

2. Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.

3. Hidrolazlar : Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir H₂O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.

4. Liyazlar : Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

5. İzomerazlar : Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.

6. Ligazlar : ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2007).

Enzim İnhibisyonu : Enzim inhibitörleri enzimatik tepkimeleri yavaşlatarak veya durdurarak katalizleyen moleküler ajanlardır. Enzimler hemen hemen bütün hücrel süreçleri katalizler. Böylece enzim inhibitörlerinin bilinen en önemli farmakolojik ajanlar arasında olması sürpriz olmamalıdır. Enzim inhibitörlerinin genellikle iki sınıfı vardır: geri-dönüşümlü (reversible) ve geri dönüşümsüz (irreversible) (Lehninger 2005).

Dönüşümsüz İnhibisyon : Geri-dönüşümsüz inhibitörler bir enzimle birleşen veya enzimin aktivitesi için esansiyel olan bir işlevsel grubu bozan veya özellikle kararlı kovalent olmayan bir yapı meydana getiren bileşiklerdir. Bir geri-dönüşümsüz inhibitör ve bir enzim arasındaki kovalent bağlanmanın oluşumu yaygındır (Lehninger 2005).

Dönüşümlü İnhibisyon : Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) olanıdır. Yarışmalı inhibitör, yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmez. Yani inhibitör komplekslerinin ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğundan substrat konsantrasyonun artırılması dengeyi ES kompleksi lehine kaydırır.

Yarışmasız inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırarak inhibisyon kaldırılmaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere yapışabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir: EI ve ESI. ESI'dan I dönüşümlü olarak ayrışabildiğinden yine ürün meydana gelebilir, fakat katalizlemede yavaş olur.

Bir başka inhibisyon tipi yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime değil, sadece ES kompleksine bağlanabilir. Unkompetitif inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesiyle inhibisyon artabileceğini göstermektedir. Buna göre inhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_M azalır. Aynı zamanda ortamda ESI kompleksi sürekli var olacağından V_{max} da düşer (Keha ve Küfrevioğlu 2007).

1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz tüm organizmalarda genel olarak bulunan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir (karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1). Sığır eritrositlerinden ilk defa keşfedilen karbonik anhidraz (CA), canlılarda CO_2 'nin hidratasyonu ve HCO_3^- 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (Supuran and Scozzafava 2001).



Karbonik anhidrazlar (CA: EC 4.2.1.1) insanları içeren yüksek omurgalıları kapsayan yaygın bir metaloenzimdir (Supuran 2004). Bu metaloproteinler kofaktor olarak çinkoyu kullanarak CO_2 ve HCO_3^- arasındaki dengeyi katalizler.

Çinko bağlı enzimin on altı izoenzimi farklı inhibitörlere göre hassasiyeti ve katalitik aktivitesi, hücre içinde bulunma yerindeki farklılığa göre tanımlanmışlardır. Bu izoenzimlerin bazıları sitozolik (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII), diğerleri membrana bağlı (CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV), iki tanesi mitokondriyel (CA VA ve CA VB) ve bir tanesi salgıda salgılanır (CA VI) (Hilvo *et al.* 2005). CA XV izoformu insanlarda ve diğer maymunlarda ekspresiyona uğramazken fare ve diğer yüksek omurgalılarda bol miktarda eksprese olur (Hilvo *et al.* 2005). CA bağlı proteinler olarak adlandırılan (CARPs): CARP VIII, CARP X ve CARP XI olmak üzere üç tane nonkatalitik formu bulunmaktadır (Supuran 2004).

Şu ana kadar α , β , γ , δ , ζ , η ve θ olarak adlandırılan ve değişik kaynaklardan gelen CA ların yedi sınıfı bulunmaktadır (So *et al.* 2004; Supuran 2008; Bertucci *et al.* 2009). CA'lar alternatif metal kofaktörü olarak kadmiyumu kullanan ζ formu dışında, çinko içeren metalo enzimlerdir (Lane *et al.* 2005; Xu *et al.* 2008). Ek olarak β - CA'lar en azından anaerobik Archaea *in vivo* ortamda demir içerirler (Tripp *et al.* 2004; Macauley *et al.* 2009). CA'lar tarafında katalizlenen reaksiyon organizmalardaki asit-baz düzenlemesinde çok önemlidir. CA'lar omurgalılarıdaki kemik erimesi, glukoneogenez, vücut sıvısının üretimi, CO_2 ve HCO_3^- ün taşınması gibi pek çok diğer fizyolojik süreçlere katılır (Sly and Hu 1995).

Bugüne kadar, CA'ların 5 farklı sınıfı belirlenmiştir: α , β , γ , δ ve ζ (Zimmerman ve Ferry 2008). Önceden ε -CA olarak bilinen bir sınıf (So *et al.* 2004), archaeal Cab tipi ve bitki tipi β CA'larda olan kıvrıma benzer bir kıvrım gösteren kristalografik yapısına (Sawaya *et al.* 2006) dayanılarak yeni bir β CA tipi olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Kimber and Pai 2000). ζ CA'da aktif bölgenin geometrisi β CA'lardakinin hemen hemen aynısıdır ve aynı zamanda kıvrımda bazı benzerlikler vardır ki bu kıvrım ζ CA'ların β CA'lardakinin mesafe olarak ayrılmış alt tipini temsil edebileceği önermesine yol açmıştır (Xu *et al.* 2008).

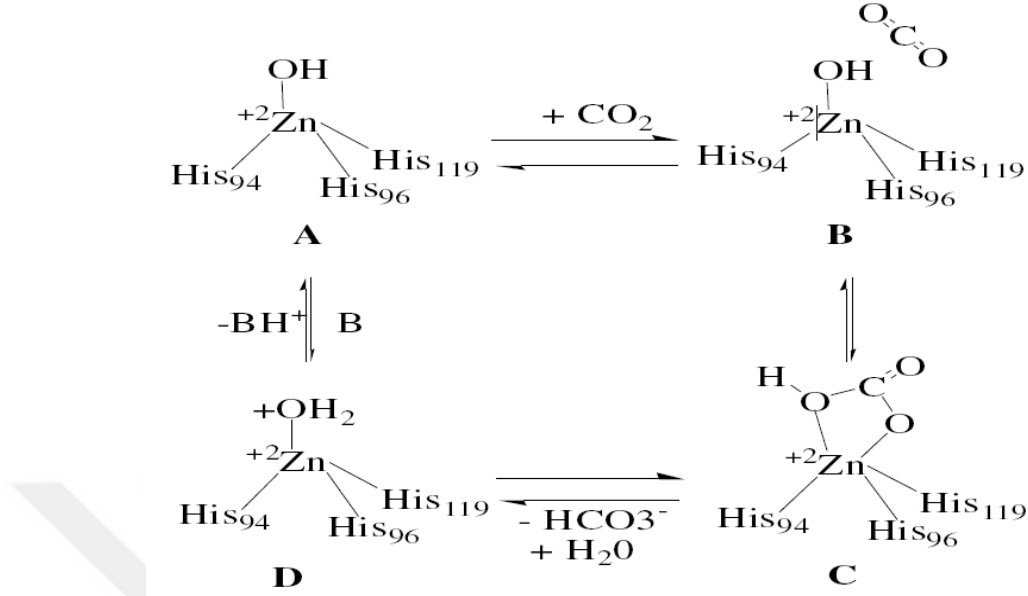
Üç ana sınıf CA (α , β , γ) lar her tarafa dağılmışken, δ CA'lar yalnızca tek hücreli deniz otlarında ve diğer deniz flantomlarında, ζ CA'lar yalnızca tekhücreli deniz otlarında bulunur. CA γ orthologları, archaea bakteri ve bitkilerde bulunur (Parisi *et al.* 2004; Zimmerman and Ferry 2008). Fakat hayvanlarda ve mantarlarda ikinci planda kalmaktadır (Elleuche and Poggeler 2009). α sınıfı Archea'larda bulunmamaktadır. Fakat bakterilerde ve eukaryalarda yeterli derecede bulunmaktadır, mantarların sadece filamentous tipi mantarlar α -CA'yı içermektedir (Elleuche and Poggeler 2009). Bitkilerde ve hayvanlarda α -CA'lar birçok izoform halinde bulunmaktadır. Örneğin 16 maymunlar dışındaki memelilerde 15 α -CA insanlarda dahil olmak üzere maymunlarda tanımlanmıştır (Sly and Hu 1995; Fabre *et al.* 2007). β CA'lar archae ve bakterilerin etki alanlarına ait olan pek çok türü ve eukaryalarda dahil olmak üzere muhtemelen tüm bitki ve mantar türlerini kapsayan en yaygın dağılıma sahip sınıf olarak görülür (Hewett

and Emmet 2000). β CA'lar aynı zamanda bir dizi insan patojenlerinde mantarlar/mayalar ve bakteriler olarak nitelendirilmiştir ve inhibisyon profilleri sülfanil amidler, anyonlar, karboksilatlar ve borik asitler gibi çeşitli etmenler vasıtasıyla keşfedilmiştir (Klengel *et al.*2005; Innocenti *et al.* 2008; Işık *et al.*2008; Innocenti *et al.* 2009; Schlicker *et al.* 2009; Syrjanen *et al.* 2010).

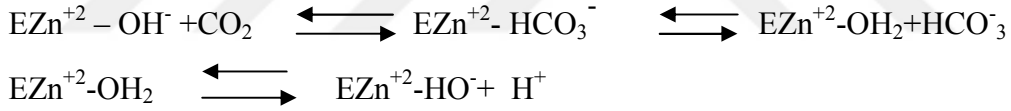
1.2. Karbonik Anhidrazların Katalitik ve İnhibisyon Mekanizması

CA'larda Zn(II) iyonu kataliz için gereklidir (Supuran and Scozzafava 2002; Supuran and Scozzafava 2000; Kim *et al.*2000). X-ışınları kristalografik çalışmaları metal iyonunun aktif bölgenin altında 3 histidin aminaasidi ve bir su molekülü/hidroksil iyonu ile koordine edildiğini göstermektedir (His 94, His96 ve His119) (Briganti *et al.*1997; Supuran and Scozzafava 2000; Kim *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2002). Ayrıca çinko ile bağlı tutulan su molekülü Glu 106'nın karboksilat bölgesine bağlı Thr 99'un hidroksil grubu ile de hidrojen bağı etkileşimleri yapmaktadır. Bu etkileşimler çinkoya bağlı su molekülünün nükleofilitesini ve substratın (karbondioksit) nükleofilik saldırıya yatkınlığını arttırmaktadır (Christianson and Fierke 1996; Briganti *et al.* 1997; Supuran and Scozzafava2000; Kim *et al.* 2000; Lindskog and Silverman 2000). Enzimin aktif bölgesinde çinko iyonuna bağlı hidroksil iyonu bulunmaktadır. Bu güçlü nükleofil hidrofobik bölgede bulunan karbondioksit molekülüne saldırır.

İnsan CA II izoenziminde Val 121, Val 143 ve Leu 198 aminoasitleri çinko iyonuna bağlı bikarbonatın oluşumunda rol almaktadırlar. Daha sonra bikarbonat iyonu bir su molekülü ile yer değiştirip ve çözeltiye geçerken, çinko iyonuna bağlı su molekülü yani katalitik olarak inaktif olan enzimin asidik formu oluşmaktadır (Briganti *et al.*1997; Supuran and Scozzafava 2000; Kim *et al.* 2000). Enzimin tekrar katalitik olarak aktif hale (temel hali veya A formu) geçmesi için aktif bölgeden ortama proton transfer edilir, bu reaksiyon aktif bölgenin diğer rezidüleri (örneğin CA I ve CA II izoenzimlerinde His 64 aminoasidi proton transferinde rol alır) veya ortamın tampon çözeltileri yardımıyla gerçekleşir. Bu işlem şematik olarak şu şekilde özetlenebilir (Christianson and Fierke 1996).



Şekil 1.1. Karbonik anhidraz enziminin CO₂-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi.



CO₂ nin bikarbonata dönüşümlü hidrasyonu gibi fizyolojik reaksiyonun yanı sıra, CA'lar örneğin siyanatın karbonik asite veya siyanamidin üreye, aldehidin gem-diollere hidrasyonları: karboksilik veya sülfanamidlerin hidrolizi ve ayrıca hidrolitik prosesler gibi diğer birçok reaksiyonları katalizler (Supuran *et al.* 1997; Briganti *et al.* 1999; Guerri *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000). Ayrıca CAIII'ün yapay fosfataz aktivitesi de görülmüştür (Kim *et al.* 2000). CA enzimlerinin fizyolojik öneme sahip CO₂ hidrasyonunun reaksiyonlarından başka reaksiyonları katalizleyip katalizlemediği belirsizdir. X-Ray kristal yapı belirleme çalışmaları şu an için 6 tane α (CA I-V ve CAXII) enzimleri (Stams and Christianson 2000) CA'ların varlığı ayrıca β ve γ CA ailelerinin varlığını da göstermiştir (Mitsuhashi 2000).

Çizelge 1.1. CA izoenzimlerinin katalitik aktiviteleri, sülfanamidlere ilgileri ve hücre içinde bulunma yerleri.

İzoenzim İçindeki	katalik aktivite (CO ₂ hidrasyonu)	Sülfanamidlere İlgisi	Hücre Yerleri
CA I	Düşük(CAII'nin %10'u)	Orta	Sitozol
CAII	Yüksek	Yüksek	Sitozol
CAIII	Çok düşük(CAII'nin %0,3'ü)	Çok Düşük	Sitozol
CAIV	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CAV	Ortanın Üstü	Yüksek	Mitokondri
CAVI	Orta	Ortanın Altı	Salyada bulunur
CAVII	Yüksek	Çok Yüksek	Sitozol
CARP VIII	Aktivitesi Yok	*	SitozolikOlabilir
CAIX	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CARP X	Aktivitesi Yok	*	Bilinmiyor
CARP XI	Aktivitesi Yok	*	Bilinmiyor
CA XII	Aktif	Bilinmiyor	Membrana bağlı
CA XIII ^b	Yüksek Olabilir	Bilinmiyor	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Bilinmiyor	Membrana bağlı

Karbonik anhidraz hemen hemen tüm organizmalarda bulunur (Böttcher *et al.* 1994) ve CO₂in HCO₃⁻ ve H⁺ ya hidrasyonunu tersinir olarak katalizler. 7tane CA izoenzimi öncelikle memelilerden karakterize edildi (Tashian *et al.* 1991). CA izoenzimlerinin bilinen fizyolojik fonksiyonlarından biri CO₂ in ve HCO₃ ün iç dönüşünü kolaylaştırmaktır, bu yüzden CA izoenzimleri fotosentez, kalsifikasyon, gaz dengesi, fizyolojik pH kontrolü gibi çeşitli proseslerde anahtar rol oynarlar (Jabusch and Deutsh 1985).CA II izoenzimi gözde, böbrekte,merkezi sinir sisteminde ve iç kulakta en geniş dağılmış CA'dır. CA'nın önemli görevlerinden biri gözde, merkezi sinir sisteminde, iç kulakta ve bazı diğer sistemlerde pH düzenlenmesi, su ve iyon transportudur (Parkila *et al.* 1994; Mori *et al.* 1998). İnsan eritrositlerindeki CA izoenzimlerinin aktiviteleri fizyolojik şatlar altında önemli değişiklikler göstermektedir. CA aktivitesindeki değişim diabetes mellitus ve hipertansiyon gibi metabolik hastalıklar ile bağlantılı olduğu görülmüştür (Parui *et al.* 1991; Parui *et al.*1992; Senturk *et al.* 2012).

α -CA'ların özellikleri: Genel olarak α -gen ailesi içinde üç farklı CA izoenzim grubu bulunur. Bu grupların bir tanesi memelilerde CA I, II, III, V, VII ve XIII içeren sitoplazmik CA'ları kapsamaktadır. Bu izoenzimlerden mitokondriye bağlı CA V dışındakiler çeşitli dokuların sitoplâzmasında bulunurlar. Bir diğer izoenzim grubu ise membrana bağlı CA'lar olarak adlandırılırlar; memelilerde CA IV, IX, XII ve XV izoenzimlerinden oluşmuşlardır. Bu izoenzimler çok farklı doku tipinde plazma membranına bağlıdır. Sonuncu grup CA bağlı proteinler olarak adlandırılan şaşırtıcı CA VIII, X ve XI izoenzimlerini içermektedirler (Tashian *et al.* 2000).

Sitoplazmik CA'lar: Memelilerde katalik olarak aktifolan 6 tane sitoplazmik CA izoenzimi (CA I, II, III, V, VII ve XIII) vardır. Bu 6 izoenzimlerden 2 tanesi yüksek turnover sayısına (CA II, VII), 3 tanesi düşük turnover sayısına (CA I, V ve XIII) ve CA III aşırı düşük turnover sayısına sahiptir (Chegwidden and Carter 2000). CA I, III ve V in düşük aktivitesinin temel sebebi proton atlama mekanizmasındaki yapısal modifikasyonlardır (Lindskog and Silverman 2000; Stams and Christianson 2000).

CA III ve V izoenzimleri için ise 64. rezidüdeki aminoasidin farklı olmasından dolayı proton transferi daha zayıf bir şekilde gerçekleşmekte ve dolayısıyla daha düşük bir katalitik aktivite gözlemlenmektedir. Ayrıca, her iki izoenzimde 65. rezidüde bir mutasyon (serin aminoasidi yerine daha dallanmış bir yan gruba sahip bir aminoasit) içermekte ve bu da proton transfer mekanizmasını inhibe etmektedir. CA III'te ise Phe-198 değişimi ile birlikte bu durum proton transfer mekanizmasının tamamen elimine olmasına yol açmakta ve bu durumda proton doğrudan sitoplâzmaya aktarılmaktadır. Oysa CA I'de 64 ve 65. rezidülerin her ikisinde de bu durumun yüksek aktiviteli CA II'deki ile eşdeğer olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda temel değişim (modifikasyon) aktif bölgeye 67, 200 ve 204'teki histidin aminoasitlerinin ilavesi olarak görülmekte ve böylece aktif bölge çukuru küçülmektedir. Bu durumda proton transferinin His-200 ile gerçekleştiğine inanılmaktadır.

α -CA gen ailesinde filogenetik analizi sonucu sitoplazmik izoenzimlerin en eski olduğunu açığa çıkardılar. İlginç bir şekilde bu iki izoenzim omurgalılar içinde sınırlı

rollere sahip olduğunu gördüler. CA V karaciğer ve kas mitokondrilerinde sınırlıdır, CA V buralarda çeşitli biyokimyasal yollar için bikarbonat iyonu sağlarken, CA VII nin rolü henüz belirlenmemiştir (Chegwidden and Carter 2000). Fakat ilginçtir ki, CA VII nin oldukça korunumlu yapısı ve omurgalı canlıların soyundaki varlığı bu izoenzimin önemli bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir. Günümüze kadar CA ile ilgili yapısal ve fonksiyonel evrimle ilgili çalışmaların çoğu daha geniş bir dağılıma sahip CA I ve II izoenzimleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Esbaugh and Tufts 2006).

Membrana bağlı CA'lar: Memelilerde plazma membranlarına bağlı 5 tane CA izoenzimi (IV, IX, XII, XIV ve XV) bulunur (Sly 2000; Hilvo *et al.* 2005). Membrane bağlı CA'lar α -gen ailesinin çok erken gelişim evresinde sitoplazmik CA'lardan farklılaştığı görülmüştür. Bu izoenzimlerden 2 tanesi (IV ve XV) glikozilfosfatidilinositol (GPI) dayanak noktası ile membrana bağlı iken, diğer üç tanesi (IX, XII ve XIV) transmembran bölgesine sahiptirler. İlginç biçimde membrana bağlı izoenzimlerin katalizleme oranı yalnız düşük katalizleme oranına sahip CA XV in dışında genellikle yüksektir (Maren *et al.* 1993; Chegwidden and Carter 2000; Whittington *et al.* 2004; Hilvo *et al.* 2005). Bu durum ise membran bağlı izoenzimlerle yüksek aktiviteli CA II arasında aktif bölge cebinde çok fazla sayıda aminoasit farklılığından kaynaklanmaktadır. Daha ayrıntılı bir incelemeyle, membran bağlı izoenzimlerde aktif bölge cebi ile sterik etkileşim ihtimali olmasına rağmen katalitik mekanizma ile ilgili aminoasit rezidülerinde büyük bir farklılık olmadığı açıkça görülmektedir. CA XV in düşük aktivite göstermesi ise aktif bölge cebi analizi ile açık bir şekilde ifade edilememiş, muhtemelen Asn62-Asp mutasyonu His64 ün oryantasyonunu etkilemekte ve bu da proton transfer fonksiyonunu etkisiz hale getirmektedir, fakat bu durum henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Kayda değer diğer bir nokta ise düşük aktiviteli izoenzimler CA III ve V'te bu rezidüde mutasyon göstermektedir (Esbaugh and Tufts 2006).

Çoğu sitoplazmik CA izoenzimlerinde Pro-202 rezidüsünün mutasyonu Thr-199 kavisindeki dengesizlik katalitik etkinliğin artışına öncülük edecektir. İlginçtir ki, bu mutasyonlar memeli CA IV, XIV ve XV izoenzimlerinde gerçekleşmekte, fakat bu

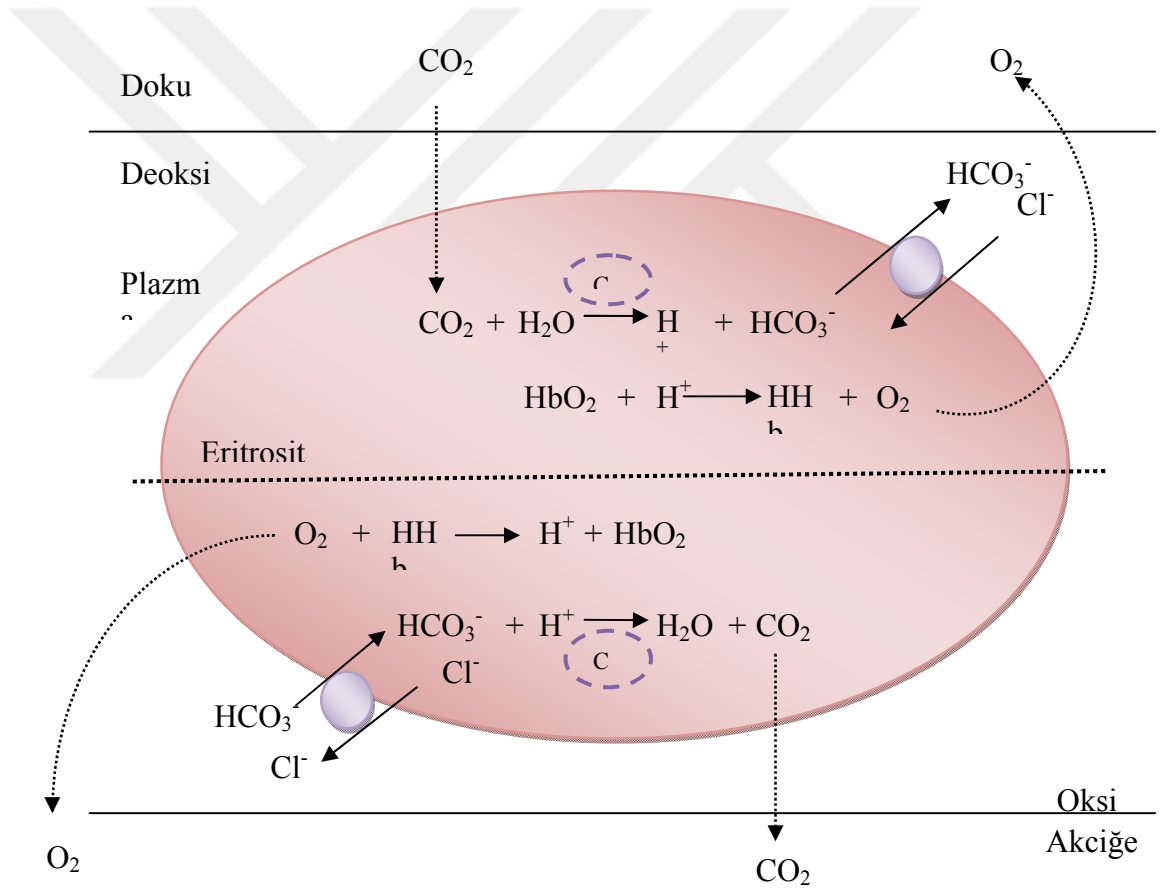
izoenzimlerde enerji bakımından olumsuzluk veren 202. rezidüdeki mutasyona rağmen Thr-199 un ilk konformasyonu korunmaktadır. Bu genellikle Cys-23 ve 203 arasındaki disülfid köprüsünün varlığı yüzündendir. Bu köprü tüm membrana bağlı CA izoenzimlerini korumaktadır ve sert ekstraselüler bölge yüzeylerinde ekstra denge verdiğine inanıyorlar (Stams and Christianson 2002). Bu köprünün aynı zamanda SDS ile CA izoenzimlerinin denatürasyonunda membrana bağlı CA ların dayanıklılığını sağladığını düşünmüşlerdir (Whitney and Brigle 1982).

Daha önce bahsedildiği gibi CA IV ve XV in ikisi de GPI ile plazma membranına bağlıdır, bu yüzden bu izoenzimler membrana bırakılmadan önce endoplazmik retikulumda posttranslasyonel modifikasyonlara uğrarlar. İlk olarak endoproteolitik enzimler N- terminal sinyal peptiddeki yarığın dışındadırlar. Bu peptide CA IV ve XV izoenzimlerinin ilk 18-20 aminoasidinden oluşmuştur ve olgunlaşmamış proteinin taşınmasında posttranslasyonel yöneltmesinde sorumludur (Waheed *et al.* 1996). C-terminal hidrofobik motif aynı zamanda GPI dayanak noktasının bağlanma bölgesine yapışmasını sağlamaktadır. Ser-266'daki bu bağlanma bölgesi tüm omurgalı CA izoenzimlerinde hemen hemen tamamen korunmaktadır (Okuyama *et al.* 1995).

CA IV ve CA XV aynı zamanda N-terminal sinyal peptidi içeren benzer transmembran izoenzimlerdir (Sly 2000). Ek olarak, bu izoenzimler C- terminal bölgesinde hidrofobik bir bölgeye sahiptir ve bu sayede transmembran bir bölge oluştururlar. Bu transmembran bölgesinin uzunluğu CA IX da 20 aminoasitten CA XII de 26 amino aside kadar değişmektedir. Aynı zamanda 25-30 aminoasitten oluşmuş küçük intraselüler bölge bulunmaktadır (Sly 2000).

CA'nın eritrositlerdeki rolü: CA enziminin en önemli rollerinden biri de ilk bulunduğu yer olan eritrositlerdeki önemidir. Eritrositlerde CA tamamen sitoplazmiktir ve temelde CO₂'in taşınması ve salınmasında rol alır. İnsan eritrosit ghost membranlarının az miktarda membran bağlı CA IV enzimi içerdiği gösterilmiştir; fakat bu durumun hücreye spesifik bir ekspresyon olmadığı gösterilmiştir. CO₂ taşınması işlemi, moleküler CO₂'nin doku dışına difüze edilmesiyle başlar ve kan akışına ve

oradan da eritrosit içersine kısmi basınç gradienti yardımıyla alınmasıyla devam eder. Eritrositlerde CO_2 , HCO_3^- ve H^+ iyonlarına dönüştürülür. Bu işlem CA tarafından katalizlenir. HCO_3^- iyonu mekik yardımıyla hücre dışına gönderilir. Bu arada H^+ hemoglobin veya non-karbonik asit tamponlarıyla, örneğin fosfat tamponları, tamponlanır. Bu işlem eritrositlerden CO_2 'nin hidrasyonu sonucu oluşan son ürünlerin her ikisinin de uzaklaştırılmasını sağlar ve kandaki CO_2 miktarını maksimize eder. Solunum organlarında (solungaç, akciğer ve/veya deri) bu reaksiyonlar tersine dönüştürülür ve CO_2 basınç gradienti yardımıyla dışarı atılır.



Şekil 1.2. Karbonik anhidrazların eritrositlerdeki rolü.

Karbonik anhidraz (CA)IV fare akciğerinin mikrozomal ve plazma membranından homojenize edilerek saflaştırıldı. Yalnız bir tane N-aminoasit sekansının insan CAIV ile %55 benzerlik gösterdiği rapor edildi. 39 kDa'luk fare enziminden alınan bir monospesifik antikor diğer memeli türlerinden alınan CAIV ile çapraz tepkimeler

yapılarak tavşanda üretildi. Bir N bağlı oligosakkarit zinciri içeren fare akciğer CA enzimi glikozidaz ile sindirildiğinde molekül kütlesi 36 000 daltona azaldığı belirtildi. Ayrıca ek olarak oligosakkarit zinciri içeren sekiz tane memeli CAIV nün molekül kütleleri incelendi; sonuç olarak sırasıyla akciğer mikrozomal membranına bağlı enzime peptide-N- glikozidaz ile muameleden sonra koyun, sığır ve tavşanda 52 000 den domuz, hint domuzu ve köpekten 42 000 den ve fare ve hamster dan 39 000 den 36 000 e azaldığı belirlendi (Waheed *et al.* 1991).

Canlı organizmalar için gerekli olan çoğu ağır metal çok düşük konsantrasyonlarda hücre yapısına bağlıdır ama yüksek konsantrasyonlarda canlılarda enzim sistemlerinin inhibisyonu yoluyla toksik etkilere yol açabilir (Johnston 1976).

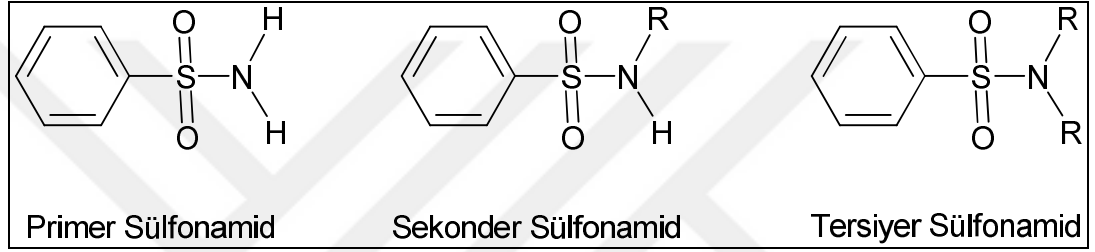
1.3. Sülfonamidler

Sülfonamidler, çinko enzimi karbonik anhidraz inhibitörlerini tasarlamakta kullanılan en yaygın çinko bağlama grubu (ZBG) dur. Yapısal özellikleri sülfonamid grubunu Zn^{+2} iyonu ve yakındaki kalıntılarla gösterilen CA boşluğu aktif bölgelerinin en derin ve merkezi bölümüne sığması için ideal parça haline getirir.

Karbonik anhidraz izoformlarını inhibe eden sülfonamid türevlerinin tasarımında iki ana yaklaşım olan halka ve kuyruk yaklaşımları uygulanmıştır. Birincisi ZBG'ye doğrudan bağlı halkayı modüle etmekten ibaretken ikincisi CAI'n yapı iskelesi içinde bulunan aromatik / heterosiklik halkaya farklı kuyrukların eklenmesinden meydana gelir (Nocentini *et al.* 2016). Sülfanilamid bulgusundan sonra binlerce kimyasal varyasyon incelendi ve en iyi terapötik sonuçlar SO_2NH_2 grubunun bir hidrojen atomunun heterosiklik halka ile değiştirildiği bileşiklerden elde edilmiştir (Kolaczek *et al.* 2014).

Sülfonamid azotundaki süstitüentin bulunma derecesine bağlı olarak sülfonamidler primer, sekonder veya tersiyer olarak sınıflandırılır (Şekil 1.3). Primer sülfonamidler sülfonil grup üzerinde iki hidrojen atomu, sekonder sülfonamidler ise bir hidrojen atomu içerir. Bu H^+ 'ler kısmen asidiktir ancak tersiyer sülfonamidler iyonize olabilen bir proton içermediğinden asidik değildir (De Ruiter 2005). Birincil sülfonamidler ($-SO_2NH_2$) CA inhibitörlerinin ana sınıfını temsil etmektedir (Bozdag *et al.* 2017).

Enzim molekülünün çok sayıda anyonu bağladığı bilinmektedir. Bunların arasında enzimin hem çok güçlü hem de seçici inhibitörleri olan bazı aromatik sülfonamidlerin ‘sülfonamid-karbonik anhidraz’ kompleksleri kristalografik olarak araştırılmıştır. Sülfonamid amino grubu çinko suyun yerini alır ve bu yapılardaki hidrojen bağlarını treonine¹⁹⁹ O^γ’a bağlar. Sadece potansiyel hidrojen bağı vericileri (sülfonamidler, HS ve HSO), normalde çinko suyunun bulunduğu koordinasyon alanına ulaşabilir (Hakansson *et al.* 1992).



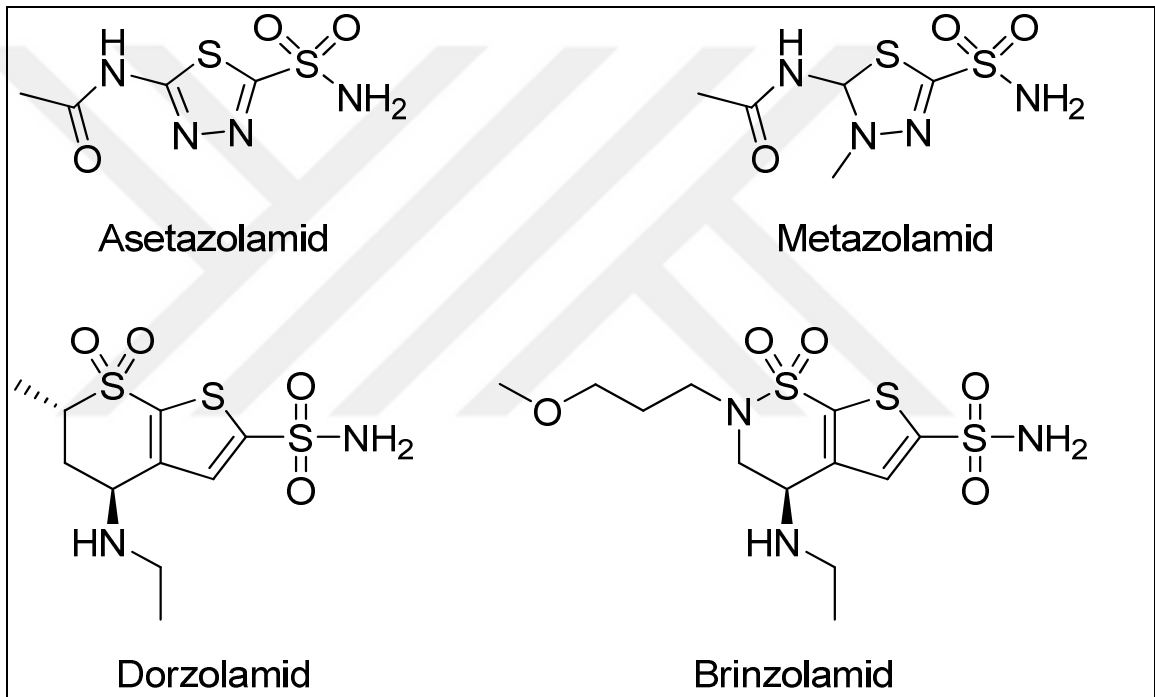
Şekil 1.3. Sülfonamidlerin genel yapısı.

Yüzden fazla sülfonamid kinetik, fizyolojik ve farmakolojik çalışmalarla araştırılmıştır. Sülfonamidin, enzim aktif bölgesinden çinko iyonuna anyon olarak koordinasyon yapıp tüm CA’ların katalitik aktivitesini inhibe ettiği kanıtlanmıştır. CA inhibe edici etkisi için araştırılan aromatik sülfonamidler arasında benzen sülfonamidler en iyi CA önleyici etkiyi göstermiştir (Arslan *et al.* 2016).

Pek çok sülfonamid CA inhibitörü gastro-duodenal ülser, asit-baz irregülasyonu ve bazı nörolojik bozuklukları da içeren çeşitli hastalıklara karşı terapötik maddeler olarak kullanılmıştır (Al-Rashida *et al.* 2011). Sülfonamidler pek çok biyolojik aktiviteye sahiptir ve farmakolojik örnekleri klinikte antibakteriyel, hipoglisemik, diüretik, antihipertansif ve antiviral ilaçlar olarak kullanılmaktadır (Abbate *et al.* 2004).

Karbonik anhidraz enzimi insanda bilinen 16 farklı izoenzimi içermektedir. Bu izoenzimlerden bazıları (CA I, CA II ve CA IV) insan gözünde bulunur. Glokom, göz içi basıncından (GİB) dolayı yavaş yavaş görme alanı kaybıyla karakterize edilen bir hastalık grubudur. Karbonik anhidraz inhibitörleri yıllardır glokom tedavisinde kullanılmaktadır ve klinik tıpta glokom tedavisinde bilinen en iyi inhibitörleridir. Bu

inhibitörler, artmış göz içi basıncını azaltarak hastalığın tedavisinde oldukça etkilidir (Senturket *al.* 2012). CA IX'un inhibisyonu ile ilgili yapılan ilk çalışmada asetazolamid (AZA) , metazolamid (MZA), etokzolamid (EZA), diklorofenamid (DCP) gibi klinikte kullanılan bir seri aromatik ve heterosiklik sülfonamidler (Şekil 1.4) kullanılmıştır (Sławiński *et al.* 2014). Yapılan çalışmalarda sülfonamidlerin karbonik anhidraz inhibisyonu ile antitümör maddeler olarak da etkili olduğu belirtilmiştir (Mojzych *et al.* 2015).



Şekil 1.4. Klinikte kullanılan birincil sülfonamid ilaçları - CA inhibitörleri.

1.4. Çalışmanın Amacı

Karbonik anhidrazlar canlılardaki CO₂ seviyesini düzenlemek için kullanılan enzimlerin önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Bu nedenle fizyolojik pH kontrolü, gaz dengesi, kalsifikasyon ve fotosentez gibi çeşitli proseslerde anahtar rol oynar.

Karbonik anhidraz enzimi insan eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, *Plasmodium falciparum*, sığır kemiği ve sığır lökositleri gibi çok sayıda kaynaktan yoğun şekilde incelenmiş ve saflaştırılmıştır (Arslan *et al.* 2016). Yeni karbonik

anhidraz inhibitörlerinin geliştirilmesi, sülfonamidlerin kimyasal alanının genişletilmesine bağlı olarak karbonik anhidrazın aktif bölgesi ile etkileşebilen yeni inhibitörlerin geliştirilmesine imkan sağlayabilir (Angapelly *et al.* 2017).

Karbonik anhidraz inhibitörleri yaygın olarak glokom hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bazı kanser türlerinin tedavisi, nörodejeneratif hastalıklar ve obezite tedavisinde de karbonik anhidraz enziminin inhibitörleri kullanılmaktadır.

Günümüzde ilaç olarak kullanılmakta olan CAI'lerin insan metabolizmasındaki beklenmeyen yan etkilerinin fazla olması nedeni ile yeni ve daha etkili inhibitörlerin tasarlanması dünya çapında araştırılmaktadır. Bu nedenle araştırma konumuz daha güçlü, yan etkileri az olan (ya da hiç olmayan) ve daha özgül inhibitörleri belirlemektir.

Bu tez çalışmasında, tasarlanmış 4-metilbenzensülfonamid türevlerinin insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda ise sülfonamid türevlerinin CA I-II için etkili inhibitörler olarak kullanıp kullanılamayacağı bilgisine ulaşılabacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından ve birbirlerinden ayrı olarak keşfedilmiştir. Meldrum ve Roughton 1933 yılında sığır eritrositinden hazırladıkları karbonik anhidrazın %70 saflıkta olduğunu söylediler. Fazla miktardaki hemoglobini uzaklaştırmak için hemolizat hazırlarken etanol ve kloroform kullandılar. Daha sonraki saflaştırmaları tuz çöktürmesi ve jel adsorbantlar ile protein karışımına uygulayarak klasik teknikler kullanarak gerçekleştirmeye çalıştılar. 1930 ve 1940 yılları boyunca diğer memelilerin eritrositlerinden karbonik anhidrazı saflaştırmak için benzer yöntemler tanımladılar. Teknik gelişmeler sonradan eritrositlerden karbonik anhidrazı saflaştırmak için yöntemler sağladılar. Böylece Lindskog 1960 da sığır eritrositlerinde elektroforetik olarak ayırt edilen 2 tane karbonik anhidraz enzimi buldular. Bu iki enzim kinetik ve kimyasal olarak çok benzer olmalarına rağmen bu kanıt eritrositlerdeki karbonik anhidraz enzimleri için kural olmayabilir. İnsan, maymun, at, tavşan, gine domuzu (Tappan *et al.* 1964) ve sıçan eritrositlerinde (Mcintosh 1969) turnover katsayıları birbirinden farklı en az 2 çeşit CA enzimi olduğu saptanmıştır. Bu izoenzimlerin katalitik aktiviteleri arasındaki farkın büyüklüğüne göre, bu iki CA izoenzimi enzimler arasında eşsiz bir yere sahiptir. 1968 de Furth yapılan aktif bölge kimyası çalışmalarında bu izoenzimlerin olası faydalarını keşfetmiştir. 1968 yılında Edsall enzimlerin fizikokimyasal görünüşleri, davranışları ayrıntılı olarak çalışıldı.

1970'li yıllara kadar kandan ve diğer dokulardan CA'yı izole etmek için bir kaç deneme yapıldı. Keilin ve Mann 1940 yılında önce domuz midelerinden CA saflaştırmayı denedi ve %30 saflıkta enzim elde etmeyi başardı. Daha sonraları 1963 yılında Sen, Drance ve Woodford sığır lens ekstraktından 2 enzim fraksiyonu elde ettiler, fakat enzimi saflaştıramadılar. 1967 yılında Byvoet ve Gotti enzimi köpek böbreğinden kısmen saflaştırdılar ve 1969 yılındaMcintosh sıçan dorsolateral prostat bezlerinden iki çeşit CA enzimini homojen bir saflıkta elde etmiştir.

Söyüt vd. 2008 yılında gökkuşığı alabalığı beyninden Sepharose-4B-L-tirozin – sülfanilamit afinite kromatografisi ile CA enzimini saflaştırdılar. SDS PAGE enzimin molekül kütleiniyaklaşık 29 kDa, jel filtrasyon kromatografisi ile enzimin molekül kütleini yaklaşık 27,3 kDa olarak buldular. Söyüt ve Beydemir yine 2008 yılında Sepharose-4B-L-tirozin –sülfanilamit afinite kromatografisini kullanarak gökkuşığı alabalığının karaciğerinden CA enzimini saflaştırdılar. Enzimin molekül kütleini SDS PAGE de 29,4 kDa jel filtrasyon kromatografisiyle molekül kütlei yaklaşık 31 kDa civarında buldular. Söyüt ve Beydemir 2011 yılında yaptıkları bir başka çalışmada gökkuşığı alabalığının böbrek dokusundan Sepharose-4B-L-tirozin –sülfanilamit afinite kromatografisini kullanarak CA enzimini saflaştırdılar. Enzimin molekül kütlei SDS-page de 28,7 kDa jel filtrasyon kromatografisinde 26,9 kDa olarak tespit ettiler.

Demir vd. 2004 yılında sığır midesinden CA enzimini saflaştırmışlardır, enzimin molekül kütlei sığır eritrosit CA enzimine çok yakın 30 kDa civarında olduğunu bulmuşlardır.

Beydemir vd. 2006 yılındagökkuşığı alabalığının lensinden Sepharose-4B-L tirozin-sülfanilamit afinite kolonunu kullanarak %60 verimle 900 kat enzimi saflaştırdılar ve enzimin molekül kütlei SDS Poliakrilamid jel elektroforezi ile yaklaşık 27 kDa olarak hesapladılar.

2006 yılında Söyler tarafından hazırladığı yüksek lisans tezinde Van kedisinin eritrositlerinden CA enzimini saflaştırmış ve enzimin molekül kütlei 30 kDa olarak bulmuştur.

Bursal 2009 yılında yapmış olduğu doktora çalışmasında kivi meyvesinden CA enzimini CM Sephadex G-25 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-25 saflaştırma basamakları ile %61,5 verimle ve 5,23 kat olarak saflaştırmış. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile enzimin molekül kütleini 66 kDa olarak bulmuştur.

Hisar vd. 2003 yılında gökkuşuğu alabalığı eritrositlerinden gerçekleştirdiği bir çalışmada CA enziminin molekül kütlesini hem jel filtrasyon kromatografisi ile hem de SDS-PAGE ile 28 kDa olarak belirlediler. 2011 yılında Kılıç yaptığı yüksek lisans çalışmasında koyun midyesinden CA I ve CA II izoenzimlerini saflaştırdı. Çalışmalarında CA II izoenzimini %78 verimle 529,4 kat saflaştırdı. Enzimin molekül kütlesini poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesini 26,7 kDa olarak belirlediler.

Demirdağ *et al.* 2011 yılında koyun karaciğer dokusundan CA II izoenzimini %72 verimle, 2320 EU/mg spesifik katsayısıyla 203,5 kat enzim saflaştırmışlardır ve enzimin molekül kütlesini yaklaşık 29 kDa olarak buldular.

Yaylacı 2009 yılında doktora tezi çalışmasında ilk defa mersin alabalığı eritrositlerinden CA enzimini saflaştırıp karakterizasyon çalışmasını yaptılar. Sepharose-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonundan enzimi %29 verimle 539 kat saflaştırdılar. Enzimin molekül kütlesini, saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yapılmış ve enzimin molekül kütlesini 29 kDa olarak buldular.

Şu ana kadar CA izoenzimleri pek çok hayvan dokusundan ve bitki türünden saflaştırılıp karakterize edildi. 1982 yılında Whitney ve Brigle sığır akciğerinden membrana bağlı karbonik anhidraz enzimini saflaştırdılar ve molekül kütlesini 52 kda civarında buldular. Saflaştırılan enzimin glukozamin galaktoz ve siyalik asit içerdiğini ve en az %20 sinin karbonhidrat olduğu bulunmuştur. 1990 yılında Zhu ve Sly insan akciğerinden karbonik anhidraz IV izoenzimini saflaştırdılar. İnsan akciğer CA IV ünün molekül kütlesini 35 kda civarında olduğunu ve oksijen ve azot bağlı oligosakkarit zinciri içermediğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca CA IV'ün yüksek aktivitesi, halojen tuzlarına dayanıklılığı ve sülfonamidlere olan ilgisinden dolayı CA II ye benzediğini bulmuşlardır.

Demir vd. 2000 yılında sığır akciğerinden CA IV izoenzimini saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlelerini SDS PAGE ve jel filtrasyon kromatografisiyle 54 ve 29 kDa civarında 2 bant olarak belirlemişlerdir.

Karbonik anhidraz (CA)IV fare akciğerinin mikrozomal ve plazma membranından homojenize edilerek saflaştırıldı. Yalnız bir tane N-amino asit sekansının insan CA IV ile %55 benzerlik gösterdiği rapor edildi. 39 kDa'luk fare enziminden alınan bir monospesifik antikor diğer memeli türlerinden alınan CAIV ile çapraz tepkimeler yapılarak tavşanda üretildi. Bir N bağlı oligosakkarit zinciri içeren fare akciğer CA enzimi glikozidaz ile sindirildiğinde molekül kütlesi 36 000 daltona azaldığı belirtildi. Ayrıca ek olarak oligosakkarit zinciri içeren sekiz tane memeli CAIV'nün molekül kütleleri incelendi; sonuç olarak sırasıyla akciğer mikrozomal membranına bağlı enzime peptide-N- glikozidaz ile muameleden sonra koyun, sığır ve tavşanda 52 000 den domuz, hint domuzu ve köpekten 42 000 den ve fare ve hamster dan 39 000 den 36 000 e azaldığı belirlendi (Waheed *et al.* 1990).

Fanjul vd. 2004 yılında insan pankreas dokusundan yaptıkları çalışmada CA IV enziminin ekspresyonunu incelemişlerdir. İnsan pankreas homojenatlarında CA IV enziminin molekül kütlelerini 35 kDa olarak belirlemişlerdir. Yaptıkları immunositokimyasal çalışmalar sonucu CA IV enziminin centroacinar (kanal) hücrelerde ve arasında, intralobüler ve interlobüler kanal hücrelerinin ekspresyona uğradığını gözlemlemişlerdir. Bu enzimin luminal plazma membranındaki bağlanma biçimi ve lokalizasyonu, enzimin luminal pH'nın korunmasında görev alabileceğini göstermektedir.

Schwartz vd. 1999 yılında yaptıkları bir çalışmada tavşan böbreğinde CA IV ekspresyonunun postnatal gelişimini incelemişlerdir. Çalışma sonunda CA IV enziminin ekspresyonunun postnatal yaşamın ilk evrelerinde renal asidifikasyonunun arttırılmasında katkısı olabileceğini gözlemlemişlerdir. Yine 2004 yılında Purkerson ve Schwartz ise tavşanlarda membrana bağlı CA IV, IX, XII ve XIV izoformlarının ekspresyonunu ve olgunlaşma süresince CA IV ve IX'un indüklenmesini incelemişlerdir.

Tavşanlarda bu enzimlerin böbrek, kalp, akciğer, iskelet kası, pankreas, safra kesesi, mide, ince bağırsak, kolon ve dalak gibi dokularından mRNA'ların real-time PCR metodu kullanarak ekspresyonuna bakmışlardır. CA IV mRNA'sının çoğunlukla böbrek, kalp, akciğer, kolon ve safra kesesinde ekspresyona uğradığını gözlemlemişlerdir.

William vd. 2009 yılında CA II ve IV izoenzimlerinin güçlü bir inhibitörü olan tiyoeter benzensülfanilamit ve türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sentez, yapı-aktivite analizleri ve kimyasal özelliklerin optimizasyonu tanımlanmıştır. Nanomolar seviyesinde inhibisyon gözlemlendi ve termodinamik çözünürlüğü geliştirilen bu bileşikler umut verici bir şekilde tavşan göz homojenatları karbonik anhidraz enzimlerinin *in vitro* inhibisyonuna sebep olduğunu bulmuşlardır.

Brown vd. 1990 yılında sıçan CA IV izoenzimini afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırdılar ve sıçan böbreğinde immunolokalizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere tavşanlarda özel bir antiserum üretmek amacıyla kullanmışlardır. Sonuç olarak CA IV'ün sıçan böbreklerinin üstünde belirli kısımlarında bikarbonatın yeniden absorpsiyonundan sorumlu luminal CA olduğu bulunmuştur. Ayrıca CAIV'ün sıçan nefronlarının basolateral plazma membranlarında bikarbonat iyonunun taşınmasında önemli rol oynadığını önermişlerdir (Brown *et al.* 1990).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan CNBr aktif sefaroze 4B, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), trietanolamin, benamidin Sigma-Aldrich'ten. Diğer gerekli kimyasalları Merck AG'den temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Ultra santrifüj	: Beckman Coulter
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Shimadzu (UV-1800)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Buzdolapları	: Arçelik
Peristaltik pompa	: Ismatec
Derin dondurucu	: Beko (-20°C'ye kadar)
Derin dondurucu	: Sanyo Ultra Low (-85°C'ye kadar)

3.1.3. Afinite Kolonunda ve PAGE'de Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

1. 0,2 M NaHCO₃ çözeltisi, pH: 8,7 (Sefaroz 4B matriksinin hazırlanması için kullanılan tampon): 8,4 g NaHCO₃, 450 ml destile su kullanılarak çözüldü, 1 N NaOH ile pH: 8,7'ye ayarlandıktan sonra, sonuç hacmi destile su kullanılarak 500 ml'ye getirildi.

2. 25 mM Tris-HCl / 0,1 M'lık Na₂SO₄ çözeltisi, pH: 8,7 (sentezlenen afinite jeli için dengeleme tamponu): 1,514 g Tris, 7,1 g Na₂SO₄ tartıldı, 450 ml destile edilmiş suda

çözülüp daha sonra da 1 N'lik HCl ile pH: 8,7'ye getirilerek sonuç hacim destile su kullanılarak 500 ml'ye getirildi.

3. 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ çözeltisi, pH: 8,7 (hemolizat uygulamasından sonra afinite jelinin yıkanma tamponu) 1,514 g Tris, 1562 g Na₂SO₄ tartıldı, 450 ml destillenmiş su ile çözüldü 1 N'lik HCl ile pH: 8,7'ye ayarlandıktan sonra destile su kullanılarak toplam çözelti hacmi 500 ml'ye tamamlandı.

4. 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ çözeltisi, pH: 5,6 (afinite kolonuna bağlanmış olan CA enzimlerinin elüe edilmesi için uygulanan çözelti): 0,347 g NaCH₃COO.3H₂O ve 3,062 g NaClO₄ 40 ml destillenmiş suda çözüldü, 1 N HCl kullanılarak pH: 5,6'ya kadar ayarlandıktan sonra destillenmiş suyla toplam hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

5. 0,05 M KH₂PO₄ çözeltisi, pH: 7,5 (Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyaliz işlemlerinde kullanılan tampon): 3,402 g KH₂PO₄ 450 ml destillenmiş su içerisinde çözüldü, 1 N HCl kullanılarak pH'sı 7,5'a ayarlandıktan sonra toplam hacim destillenmiş suyla 500 ml'ye tamamlandı.

6. Numune hazırlanmasında kullanılan tampon: 0,325 ml 1 M'lık Tris-HCl (pH = 6,8) 0,5 ml % 10'luk SDS, 0,5 ml gliserol, 0,5 ml % 0,1'lik Br-timol mavisi bir beherde karıştırıldı, sonsında hacmi destile su kullanılarak 5 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Hazırlanan bu tampon kullanılmadan hemen önce, 20 / 1 oranında toplam tampon / β-merkaptotanol olacak şekilde çözelti hazırlandı.

7. Poliakrilamid jelinde proteşnlerin yürütülmesinde kullanılan tampon: 3,0 g Tris ile 14,4 g glisin 100 ml destile suda çözüldü, sonrasında üzerine 10 ml % 10'luk SDS çözeltisi eklendi toplam hacmi destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

8. SDS-PAGE jelini boyanmak için kullanılan çözelti: 0,1 g Coomassie brillant blue R-250, % 10 CH₃COOH, % 40 destile su ve % 50 CH₃OH olacak şekilde karışım ihtiyaç kadar hazırlandı.

9. SDS-PAGE’inde jelin yıkanması amacıyla kullanılan çözelti: % 10 CH₃COOH, % 40 destile su ve % 50 CH₃OH olacak şekilde ihtiyaç kadar hazırlandı.

10. SDS-PAGE’inde yürütülen proteinlerin sabitlenmesi amacıyla kullanılan çözelti: % 10 triklorasetikasit, % 40 destile su ve % 50 izopropanol olacak şekilde ihtiyaç kadar hazırlandı.

11. Protein çözeltilerinin kantitatif miktar tayini için kullanılan çözelti: 50 mg coomassie brilliant blue G-250, 25 ml % 95’lik etanol kullanılarak çözüldü, hazırlanan çözeltiye de % 95’lik 50 ml fosforik asit eklenerek çözeltinin toplam hacmi, destile su kullanılarak 500 ml’ye tamamlandı.

12. 1 M’lık Tris-HCl pH: 8,8 tampon çözeltisi: 6,05 g Tris 45 ml suda çözülüp 1 M’lık HCl çözeltisi kullanılarak pH: 8,8’e ayarlandı sonrasında destile su ile 50 ml’ye tamamlandı.

13. 1 M’lık Tris-HCl pH: 6,8 tampon çözeltisi: 1,21 g Tris 2,5 ml destile suda çözüldü 1 M’lık HCl çözeltisi kullanılarak pH: 6,8’e ayarlandı sonrasında destile su ile 10 ml’ye tamamlandı.

14. % 0,8-% 30’luk bisakrilamid-akrilamid çözeltisi: 0,08 g bisakrilamid ve 3 g akrilamid alınıp 6,92 ml destile su kullanılarak hazırlandı.

15. 1 g SDS 9 ml destile suda çözülerek % 10’luk SDS çözeltisi hazırlandı.

16. Tez çalışmalarımızda kullanılan kuarsetin, katekin, klojenik asit, absisik asit, morin ve rutin 1mg/ml olacak şekilde DMSO ile çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra çalışmalarda saf su ile 10.000 kat seyreltilerek kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein Tayini

3.2.1.a. Kalitatif olarak protein tayini

Proteinlerin yapılarında bulunan triptofan ve tirozinin aminoasitlerinin 280 nm’de dalga boyunda maksimum absorbands vermesini esas alan bir yöntemdir (Segel 1968). Bu metodla afinite kromatografisinde elde edilen bütün fraksiyonların kalitatif olarak protein tayinleri yapıldı.

3.2.1.b. Bradford Yöntemine Göre Protein Tayini

Benzilselüloz-sğlfonamid afinitesi kullanılarak elde edilen enzim çözeltisi ve tüm safhalardaki numunelerin protein miktarları bu yöntem kullanılarak tespit edildi. Bu metodun temel prensibi, protein ile coomassie brilliant blue G-250 boyasının kompleks oluşturmastır. Oluşan protein-boya kompleksinin maksimum absorbandsı 595 nm’de görülür. 15 dakika içerisinde protein-boya kompleksi oluşur. Oluşan bu kompleks çözeltilerde uzun süre kararlı şekilde kalır. Bradford yöntemi olarak bilinen bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg aralığındadır (Bradford 1976).

3.2.2. Karbonik Anhidraz Aktivite Tayini

Karbonik anhidraz enzimi üzerinde yapılan kinetik çalışmalar için aktivitesi ölçümleri estearz yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem CA enziminin esterez aktivitesi göstermesi esasına dayanır. Prensip olarak CA enzimi p-nitrofenil asetatı substrat olarak kullanarak p-nitrofenole hidroliz eder. P-nitrofenol maddesi 348 nm’de maksimum absorbsiyon göstermektedir. ($\epsilon_{348} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Verpoorte *et al.* 1967).

Esteraz aktivitesi için kullanılan yöntem şu şekildedir: 0,02 M Tris-SO₄ pH: 8,0 içindeki enzim çözeltisi kuvartz küvetlere konulur ve 300 µl substrat (+inhibitör) konuldu 3 dakika süre ile 25 °C’da 348 nm’de köre karşı ölçüm yapıldı. Deneyde kullanılacak p-nitrofenil asetatın günlük taze olmasına özen gösterildi. P-nitrofenil asetat

çözeltisi; 13,5 mg katı p-nitrofenil asetat tartılarak 0,5 ml aseton içinde çözüldü ve 24 ml saf suya yavaş yavaş karıştırılarak hazırlandı.

3.2.3. Afinite kromatografisi jelinin hazırlanması

Enzim saflaştırmada en çok kullanılan ve bizimde kullanacağımız yöntem afinite kromatografisi yöntemidir. Bir tür adsorbsiyon kromatografisi olan afinite kromatografisi, saflaştırılmak istenen maddenin, matriks diye adlandırılan polimer bir maddeye kovalent olarak bağlanan bir koplementer maddeye (ligand) spesifik ve geri dönüşümlü bağlanmanın olduğu bir yöntemdir. Matriks olarak biogel, sephadex ve sepharose v.b. gibi değişik polimerler kullanılabilir. Kullanılacak ligand saflaştırılması düşünülen maddeye spesifik ve geri dönüşümlü bir şekilde bağlanma afinitesi sahip olmalıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2007).

a. Reaktif Sepharose 4B'ye tirozin takılması : Aktif Sepharose 4B matriksi 25ml 200mM NaHCO₃ tamponu ile (pH: 8,8) içerisine alınıp üzerine 200 mg tirozin ilave edildi. Bu işlem sonrası tirozinin fazlasını uzaklaştırmak için 50 ml saf su ile jel yıkandı. Son olarak, 100 ml 200mM NaHCO₃ tamponu kullanılarak (pH: 8,8) tekrar yıkandı ve tirozin bağlanan jel aynı tampondan 40 ml alınarak içerisine bırakıldı.

b. Sülfanilamid bağlanması : 0,050 g sülfanilamid, yaklaşık 0°C'deki 10 ml 1 N HCl içerisinde çözüldü ve içinde 0,150 g NaNO₂ olan 0°C'deki 5 ml karışım, hazırlanan bu sülfanilamid çözeltisi içerisine azar azar ilave edildi. Yaklaşık 10 dk içerisinde diazolama reaksiyonu tamamlanan sülfanilamid 40 ml Sepharose-4B-tirozin karışımına eklendi. pH'sı, 1 N NaOH çözeltisi kullanılarak 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat kadar oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Sonrasında 1 litre saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO₄ (pH: 7,4) tamponu kullanılarak yıkandı. Yıkandıktan sonra hazırlanan jel aynı tampondan 20 ml kadar eklenerek buzdolabının +4°C bölümüne konularak kullanılıncaya kadar saklandı.

3.2.3.a. Afinite kolonunun paketlenmesi

Afinite jeli dengelenmesi için Tris-HCl, pH:7,8 tamponu içerisine alındı ve böylece jel süspanse edilmiş oldu. Süspanse edilen afinite jeli su trompu yardımı ile vakumlanarak gözenekleri arasında kalan hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Havası alınan jel, 1x10 cm'lik soğutmalı kapalı sistem cam kolona dolduruldu. Jel doldurulduktan sonra peristaltik pompa kullanılarak dengeleme çözeltisi kullanılarak yıkama işlemi yapıldı. Afinite jelinin dengelenip dengelenmediği alttan alınan eluat ile üstten ilave edilen dengeleme çözeltisinin 280 nm'de gösterdiği absorbands ve pH değerlerinin eşit çıkması ile belirlendi.

3.2.4. Koyun kalp dokusundan CA enziminin saflaştırılması

Koyun kalp dokusu Ağrı kombinasyonundan taze olarak temin edildi. Alınan taze kalp önce bıçakla küçük parçalara ayrıldı, sonra sıvı azotla dondurularak parçalandı ve en son olarak Tris-HCl, pH=7,8 tampon çözeltisi içerisine alındı. Tampon çözelti içerisine alınan homojenat süzgeç kağıdından geçirilerek santrifüj tüplerine dolduruldu ve 15 dakika 2500 xg'de santrifüj edildi. Santrifüj makinesinden alınan tüplerin üstünde kalan çözelti kısmı damlalık yardımı ile dikkatlice alındı, sonrasında tüplerin alt kısmındaki çökelek kısmı atıldı.

3.2.5. Koyun kalp dokusundan elde edilen enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

10 ml koyun kalp homojenatı alındı dikkatlice afinite kolonuna yüklendi, tüm homojenatı kolon emdikten sonra 25 ml yıkama tamponu ilave edildi, sonrasında 15 ml 100mM NaCH₃COO / 500mM NaClO₄, pH: 5,6 çözeltisi ilave edilerek kolonda tutunan karbonik anhidraz enzimi elüe edildi. Sonrasında kolona dengeleme tamponu tatbik edilerek kolon +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.6. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi(SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Enzim numunesi elde edildikten sonra enzimin saflığı %3-8 kesikli SDS-PAGE yöntemi kullanılarak Laemmli yöntemine göre yapıldı (Laemmli 1970).

Ayırma jelinin hazırlanması : 5 ml 1 M Tris-HCl pH=8,8, 4,4 ml %30'luk akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %0,1'lik SDS, 0,13 ml %5'lik TEMED (N,N, N',N'-Tetrametil etilen diamin) ile 3,13 ml destile su karıştırıldı. Elde edilen karışımı içerisinde en son 0,27 ml %5'lik PER [amonyum persülfat, (NH₄)₂S₂O₈] ilave edildi.

Yığılma jelinin hazırlanması : 0,41 ml 1 M Tris-HCl pH:6,8, 0,44 ml %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml %0,1'lik SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED ve 2, 45 ml destile su karıştırıldı. Elde edilen karışımın içerisinde 0,07 ml %5'lik PER ilave edildi.

3.2.7. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için kinetik çalışmalar

3.2.7.a. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum iyonik şiddet çalışması

Koyun kalbinden elde edilen CA enzimi aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin tespit edilmesi için daha önce literatürde yapılan araştırmalarla uyumluluğu belirlenen potasyum fosfat tamponunun optimal pH'daki farklı derişimlerdeki çözeltiler hazırlandı. Değişik potasyum fosfat konsantrasyonlarında esterase aktivitesi değerleri belirlenerek potasyum fosfat derişimi ile tespit edilen aktivite değerlerinin grafikleri çizildi (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4).

3.2.7.b. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum pH çalışması

Koyun kalp CA izoenzimleri için optimum pH'sı 6,5-9,0 değerleri arasında olan 20 mM Tris-SO₄ ve pH'sı 5,0-8,0 arasında olan 50 mM K-fosfat tamponları kullanılarak enzimin gösterdiği aktivite değerleri spektrofotometrik olarak tespit edildi (Çizelge 4.3-4.4 ve Şekil 4.4-4.5).

3.2.7.c. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için stabil pH çalışması

Koyun kalp CA izoenzimlerinin stabil olduğu pH'yı belirlemek için; pH 'ları 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 aralığında 20 mM Tris-SO₄ 50 mM ve pH 'ları 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 7.5 ve 8.0 aralığında KH₂PO₄ tampon çözeltileri kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml'si ile 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak 4°C'de muhafaza edildi. Birer gün arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.5.- 4.6 ve Şekil 4.6-4.7).

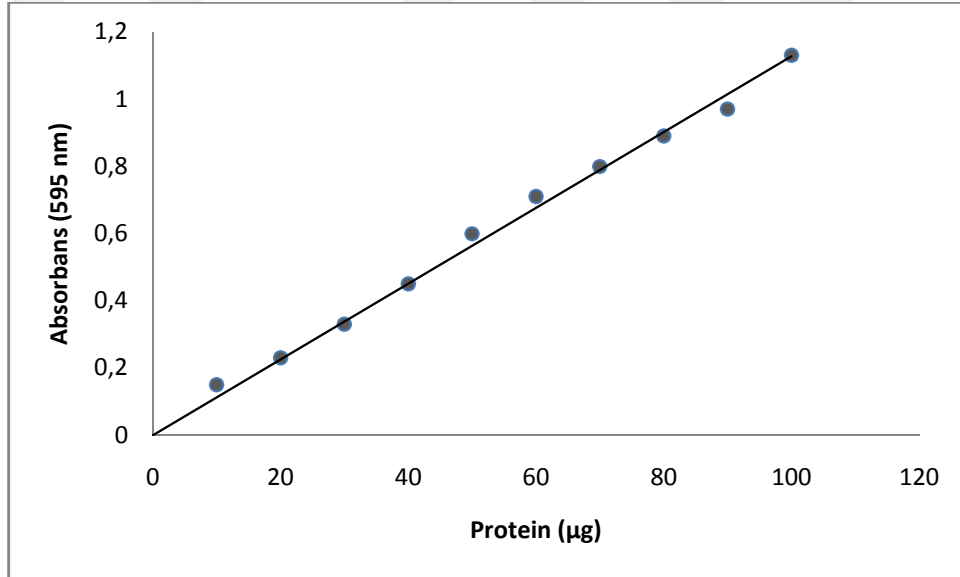
3.2.7.d. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi

Canlıların hayatlarının sağlıklı devam etmesi için ihtiyaç duyduğu temel zorunlu besinler ve bunların dışında bulunan insanları ilgilendiren ve alakadar oluğu hemen hemen herşeyde anyonlar bulunmaktadır. Bu çalışma kapsamında koyun kalp dokusundan Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi için **5a-g** numaralı azosülfonamidlerin etkileri esteraز aktivitesi yöntemi kullanılarak incelendi. Enzimleri inhibe eden sülfonamidler için sabit substrat konsantrasyonunda farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak IC₅₀ değerleri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi (Lineweaver and Burk 1934).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.



Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik.

Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için saflaştırma tablosu hazırlandı (Çizelge4.1). CA enzimi %46,15 verimle, 900 EU/mg spesifik aktivite ile 51,93 kat saflaştırıldı

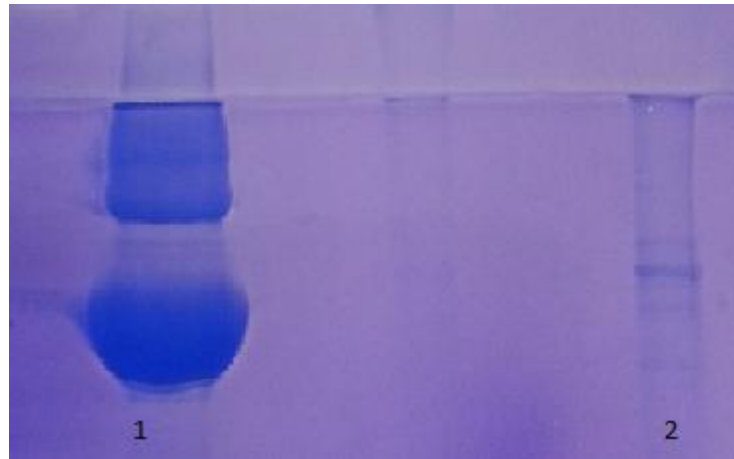
Çizelge 4.1. Koyun kalbinden CA enziminin sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma sonuçları.

Numune türü	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	10	13.5	135	2340	17.33	100	1
Koyunkalp CA	5	0.24	1.20	1080	900	46.15	51.93

4.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Sepharose-4B afinite kromatografisinden saf olarak elde edilen CA izoenzimleri ve standart proteinler, Bölüm 3.2.6’de anlatıldığı şekilde elektrofrez işlemi gerçekleştirildi. Dahasonra elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekildi ve saflaştırılan CA izoenzimlerinin molekül kütleleri log MK-Rf grafikleri çizilerek bu grafiklerden hesaplandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. SDS- PAGE fotoğrafı 1 numaralı kuyu: Standart proteinler (66 kda, 45 kda, 29 kda) ve 2 numaralı kuyu: (koyun kalbinden saflaştırılan CA).

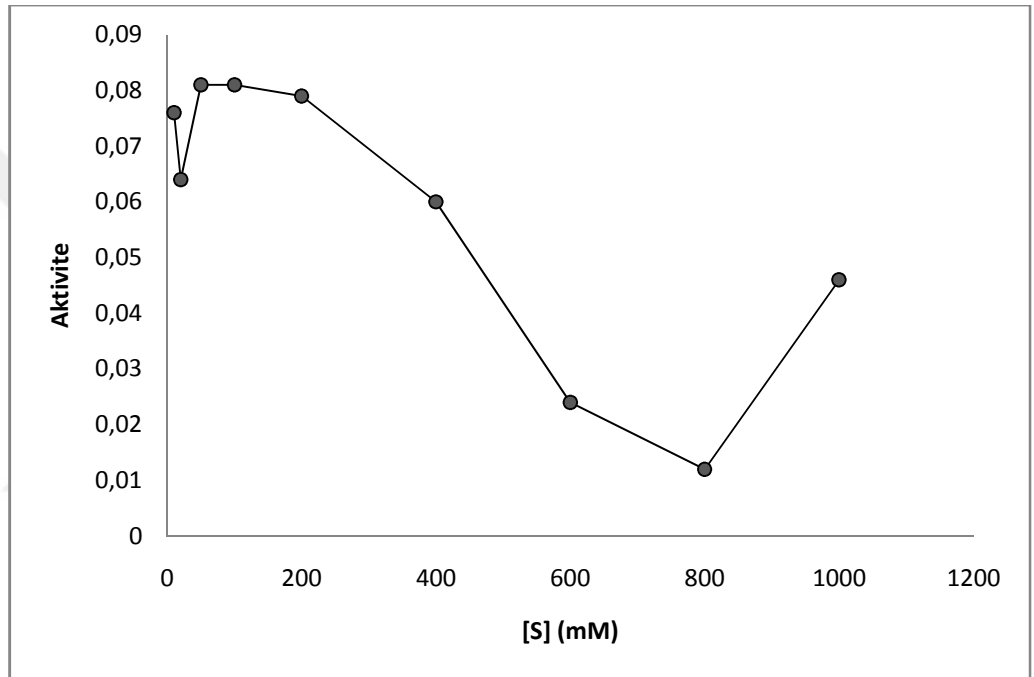
4.3. Koyun Kalp Dokusundan Saflaştırılan CAenzimi için Kinetik alışmalar

4.3.1. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CAenziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Koyun kalp CA enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen KH_2PO_4 tamponunun optimal pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Farklı KH_2PO_4 konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak KH_2PO_4 konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan alışmalar sonucu koyun kalp CAenzimi için en uygun iyonik şiddetin 50 mM KH_2PO_4 pH:8,0 tamponu olarak tespit edildi (izelge 4.2 - 4.5, şekil 4.3-4.6).

Çizelge 4.2. Koyun kalp CA enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

KH_2PO_4 derişimi (mM)	10	20	50	100	200	400	600	800	1000
Aktivite (EÜ/ml)	0,076	0,064	0,081	0,081	0,079	0,06	0,024	0,012	0,046



Şekil 4.3. 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak koyun kalp CAenziminin optimum iyonik şiddeti için değişim grafiği.

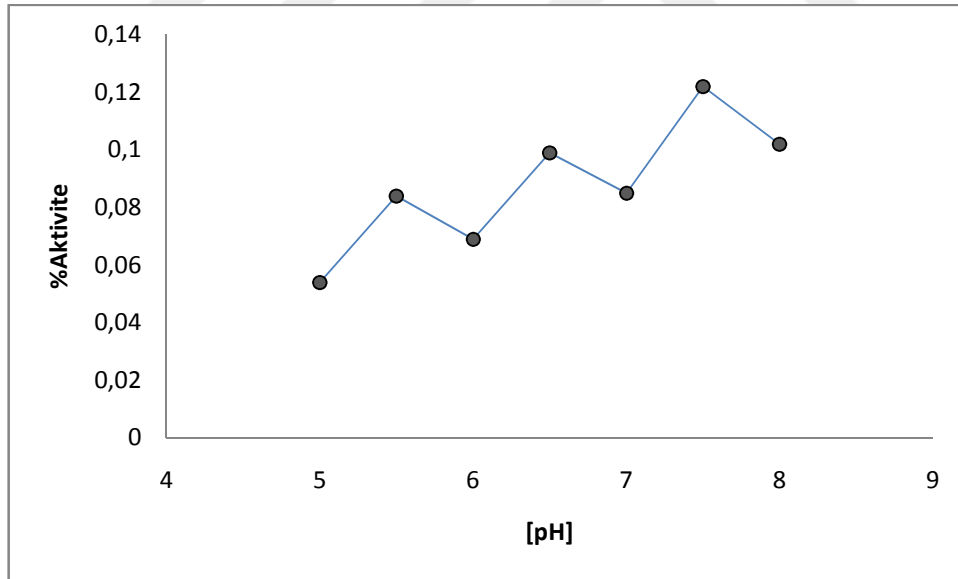
4.3.2. Koyun kalbinden saflaştırılan CA enzimi için optimum pH çalışması

4.3.2.a. KH_2PO_4 için optimum pH çalışması

Koyun kalp CA enziminin optimum pH'sı 6,5-9,0 aralığında 20 mM Tris- SO_4 ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 50 mM potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.4 - 4.5 ve Çizelge 4.3-4.4). Koyun kalp CA enzimi için optimum pH 50 mM KH_2PO_4 pH:7,5 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun kalp CA enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,054
5,5	0,084
6,0	0,069
6,5	0,099
7,0	0,085
7,5	0,122
8,0	0,102



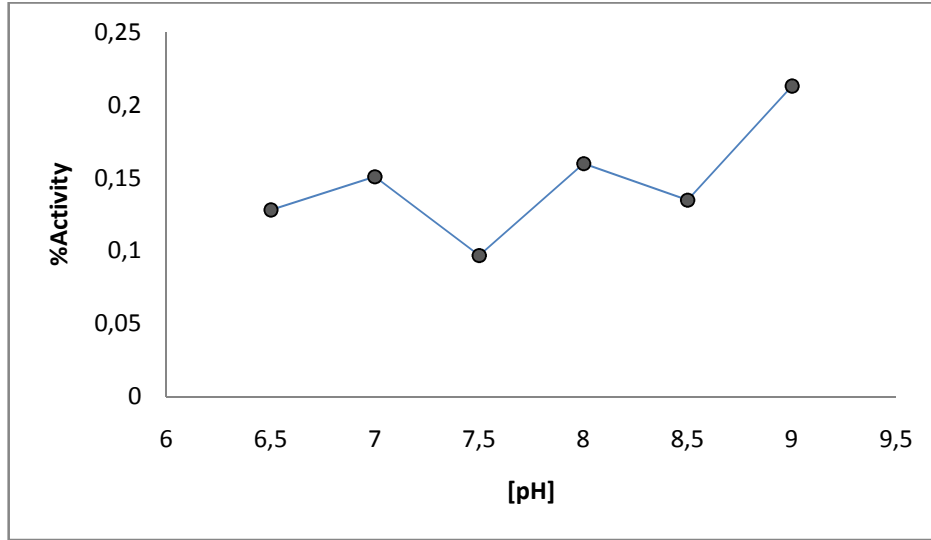
Şekil 4.4. 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak koyun kalp CA enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği.

4.3.2.b. Tris-SO₄ için optimum pH çalışması

Koyun kalp CAenziminin optimum pH'sı 6,5-9,0 aralığında 20 mM Tris-SO₄çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. 20 mM Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak koyun kalp CA enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/ml)
6,5	0,128
7,0	0,151
7,5	0,097
8,0	0,160
8,5	0,135
9,0	0,213



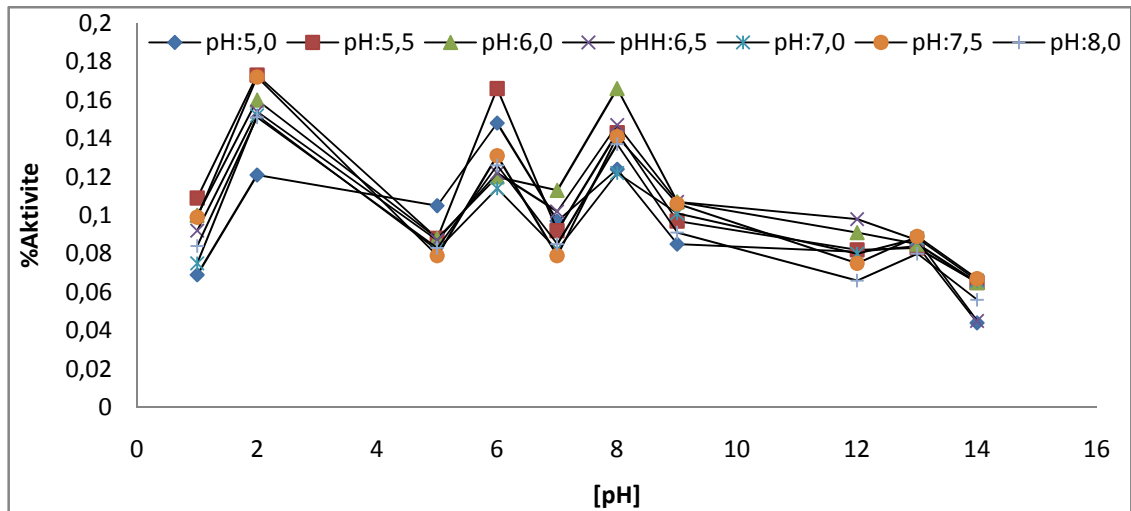
Şekil 4.5. 20 mM Tris-SO₄ Tampon çözeltileri kullanılarak koyun kalp CA enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği.

4.3.3. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi için stabil pH çalışması

Koyun kalp CA enzimi optimum pH'sı önceden anlatıldığı gibi şekilde; pH 'ları 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 aralığında 20 mM Tris-SO₄ ve pH 'ları 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 7.5 ve 8.0 aralığında 50 mM KH₂PO₄ tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.6-4.7 ve Çizelge 4.5-4.6). Koyun kalp CA enzimi için stabil pH, 50 mM KH₂PO₄ tamponu pH:7,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. Koyun kalp CA enziminin stabil pH'sı için 50 mM KH₂PO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

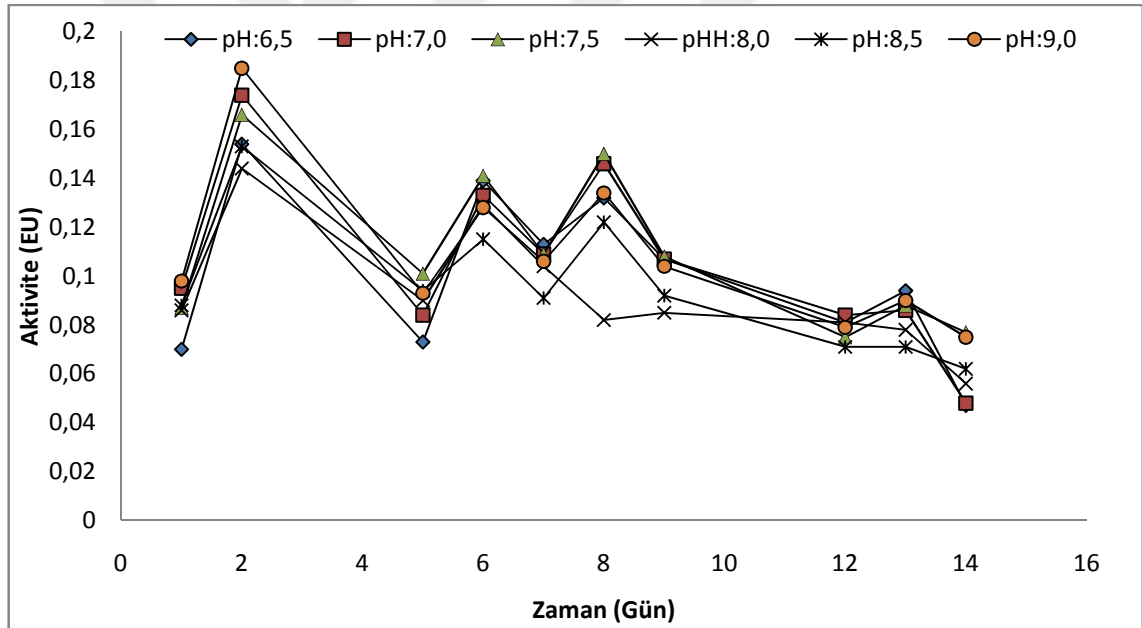
Zaman(gün)	1	2	5	6	8	12	13	14
Enzim Ünitesi	0,069	0,121	0,105	0,148	0,124	0,081	0,084	0,044
	0,109	0,173	0,088	0,166	0,143	0,082	0,083	0,065
	0,100	0,160	0,088	0,120	0,166	0,091	0,085	0,065
	0,092	0,154	0,087	0,122	0,147	0,098	0,087	0,045
	0,075	0,152	0,082	0,114	0,122	0,080	0,088	0,066
	0,099	0,172	0,079	0,131	0,141	0,075	0,089	0,067
	0,084	0,151	0,083	0,126	0,137	0,066	0,080	0,056



Şekil 4.6. Değişik pH'lardaki 50 mM KH₂PO₄ tampon çözeltisi kullanılarak koyun kalp CA enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.

Çizelge 4.6. Koyun kalp CA enziminin stabil pH'sı için 20 mM Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.

Zaman (gün)	1	2	5	6	8	12	13	14
Enzim Ünitesi	0,070	0,154	0,073	0,139	0,132	0,081	0,094	0,047
	0,095	0,174	0,084	0,133	0,146	0,084	0,086	0,048
	0,087	0,166	0,101	0,141	0,150	0,075	0,088	0,077
	0,086	0,144	0,090	0,129	0,082	0,081	0,078	0,056
	0,088	0,153	0,094	0,115	0,122	0,071	0,071	0,062
	0,098	0,185	0,093	0,128	0,134	0,079	0,090	0,075

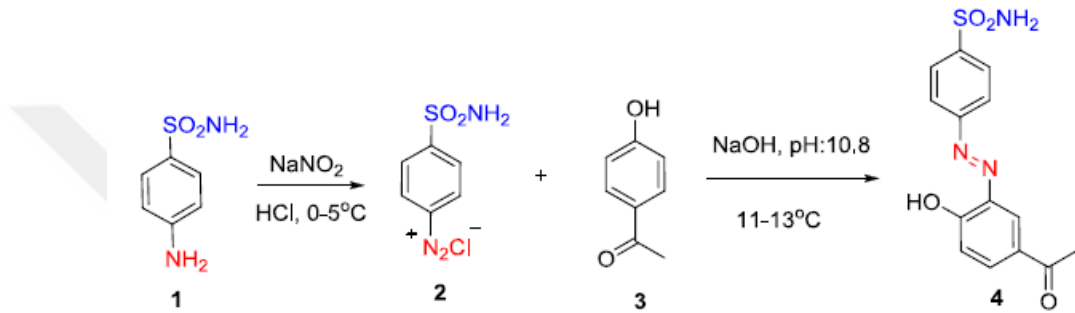


Şekil 4.7. Değişik pH'lardaki 20 mM Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak koyun kalp CA enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.

4.3.4. Azosülfon Amidlerin Sentezi

4.3.4.1. (E)-4-((5-asetil-2-hidroksifenil)diazenil)benzensülfonamid (4)

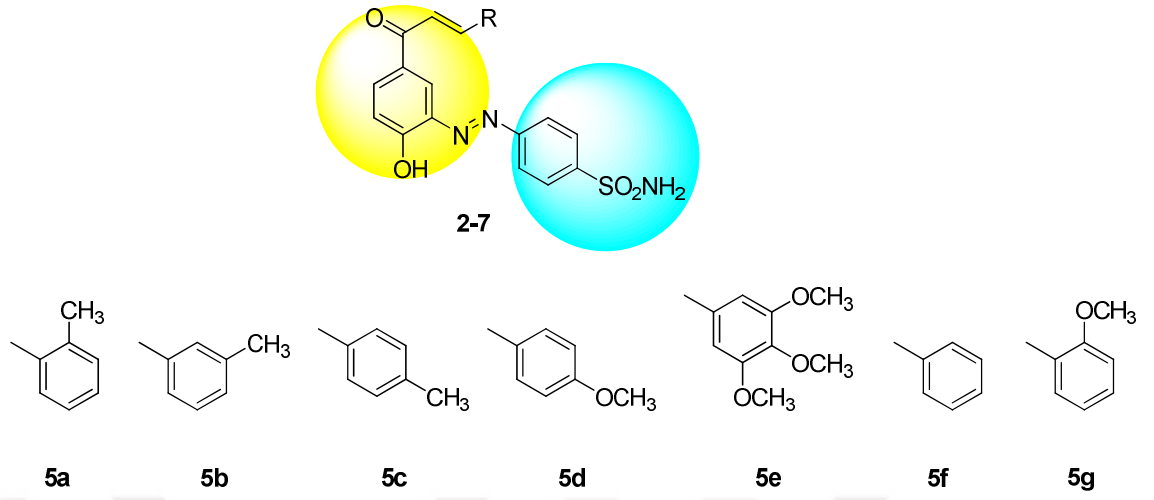
Aminlerin diazolanması ve kenetlenme reaksiyonları kullanılarak elde edilen (E)-4-((5-asetil-2-hidroksifenil)diazenil)benzensülfonamid (4)'ün sentezlenmesinde başlangıç bileşiği olarak sülfanilamid(1), NaNO₂/HCl varlığında 0-5°C'de diazonyum tuzu sentezlenmiştir. Taze hazırlanmış bu diazonyum tuzu (2), bazik ortamda çözülen 4-hidroksiasetofenonla (3) 11-13°C'de kenetlenerek azo boyar madde olan orto-hidroksiazo bileşiği (4) sentezlenmiş olup reaksiyona ait genel reaksiyon denklemi Şekil 4.8' de verilmiştir.



Şekil 4.8. *o*-hidroksiazo bileşiği (4) sentezlenmiş olup reaksiyona ait genel reaksiyon denklemi.

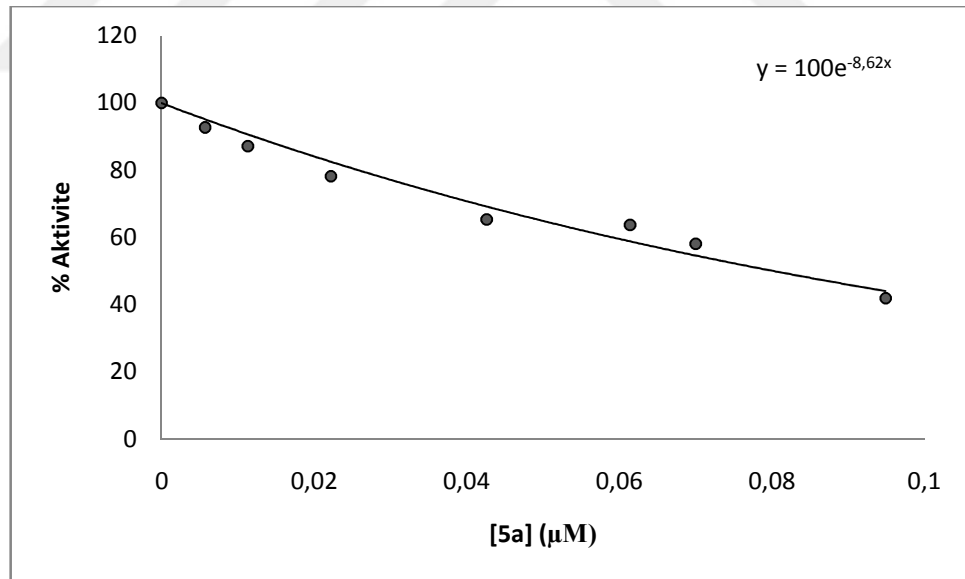
4.3.4.2. Azo sülfonamid kalkonların (5a-g) sentezi için genel yöntem

Claisen-Schmidt kondenzasyonu yöntemi kullanılarak elde edilen 5-14 nolu bileşiklerin sentezlenmesinde başlangıç bileşiği olarak (E)-4-((5-asetil-2-hidroksifenil)diazenil)benzensülfonamid (4), baz olarak NaOH ve çözücü olarak etanol kullanılmıştır. Reaksiyonlar 75 °C'de mikrodalga yardımıyla gerçekleştirilmiş olup elde edilen ürünlerin molekül şekilleri Şekil 4.9'da verilmiştir.

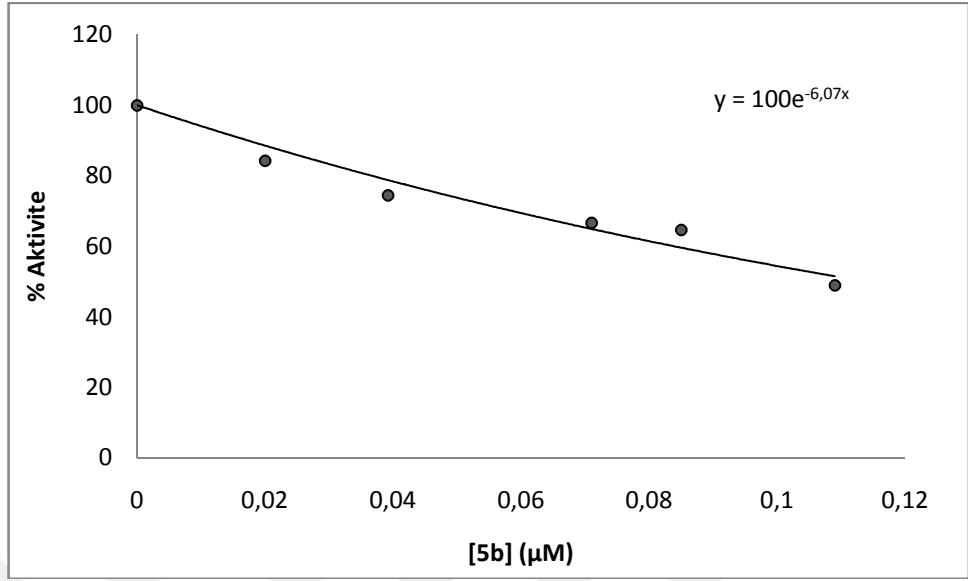


Şekil 4.9. 5a-5g kodlu bileşiklerin genel molekül şekli.

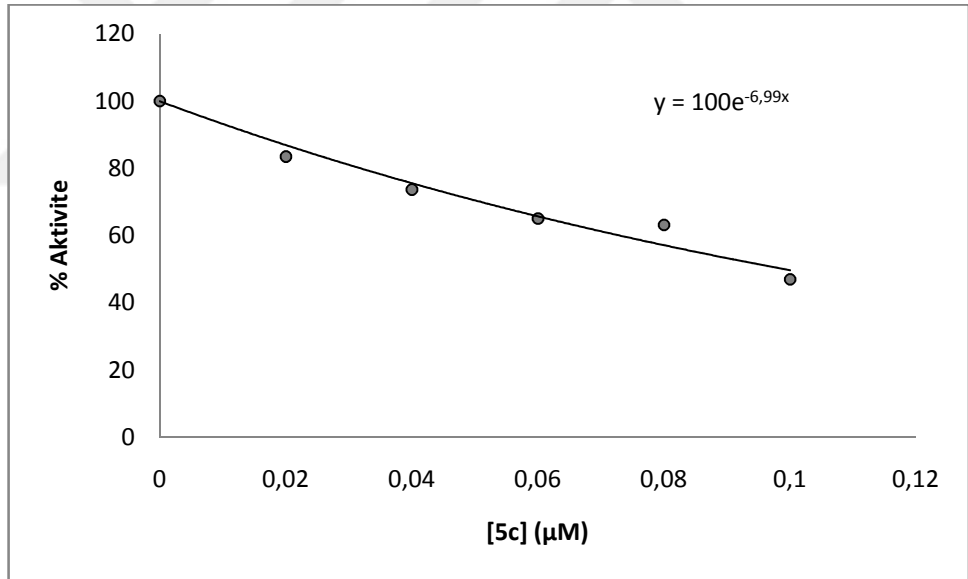
4.3.5. Koyun kalp dokusundan saflaştırılan CA enzimi Üzerine Sentezlenen Azosülfonamidlerin İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi



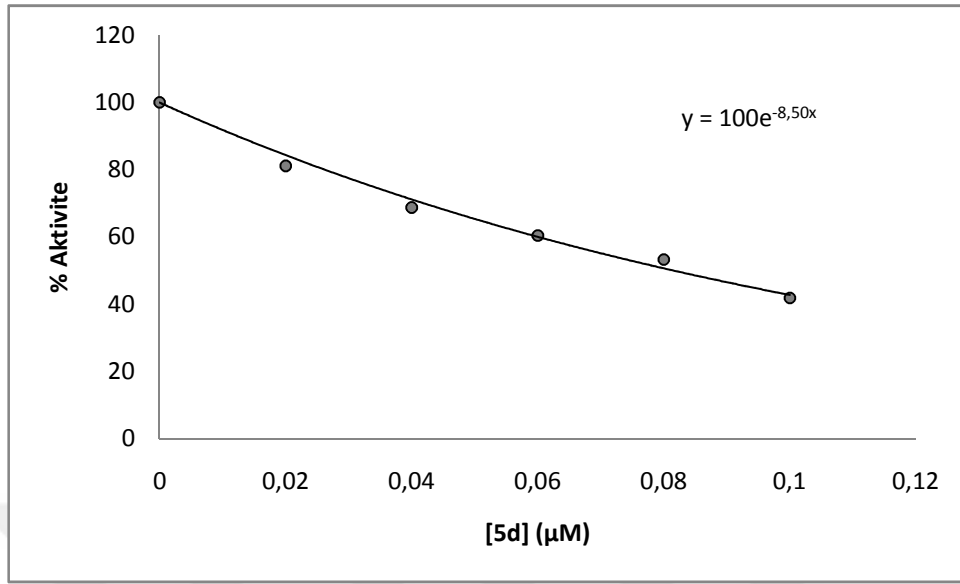
Şekil 4.10. Koyun kalp CA enzimi üzerine **5a** numaralı sülfonamidin etkisi.



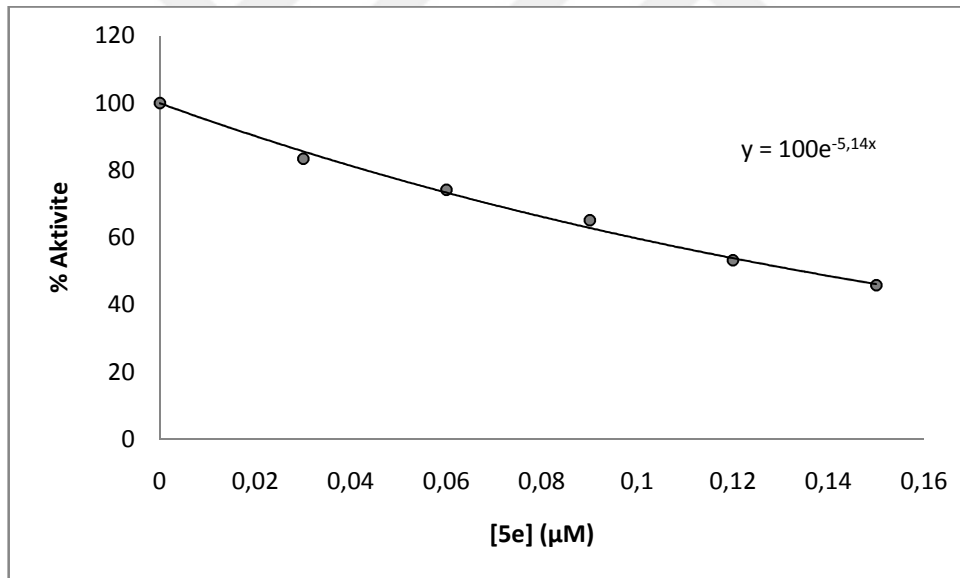
Şekil 4.11. Koyun kalp CA enzimi üzerine **5b** numaralı sülfonamidin etkisi.



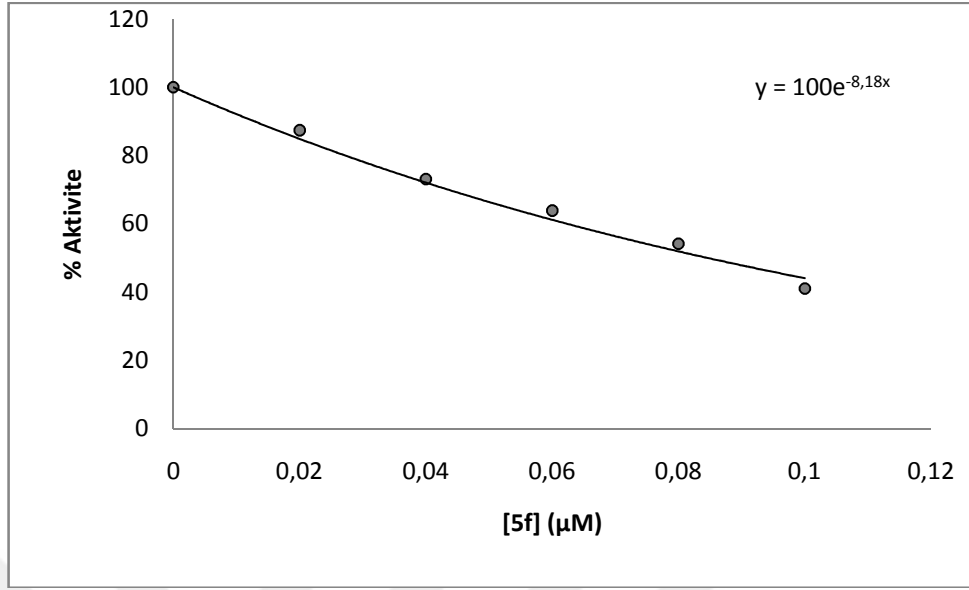
Şekil 4.12. Koyun kalp CA enzimi üzerine **5c** numaralı sülfonamidin etkisi.



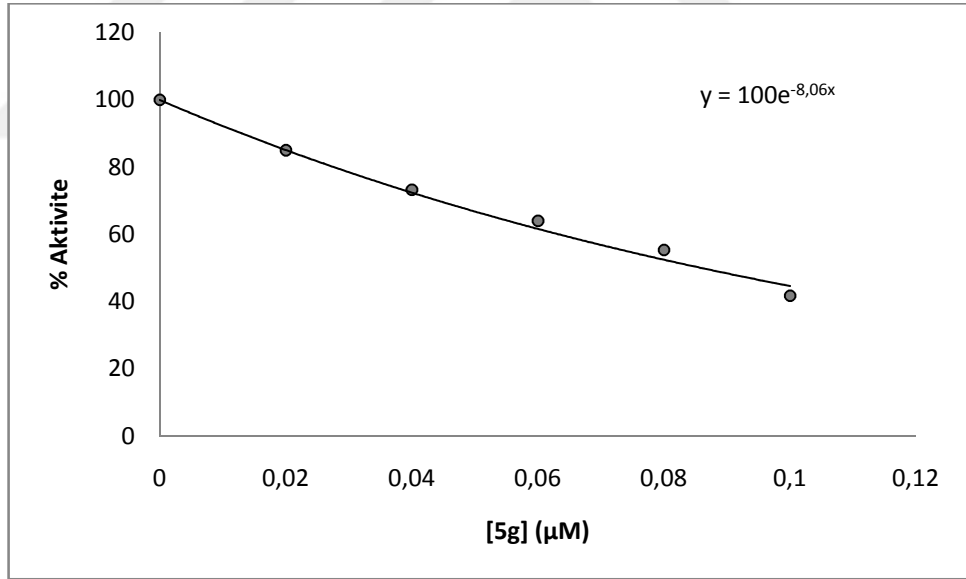
Şekil 4.13. Koyun kalp CA enzimi üzerine **5d** numaralı sülfonamidin etkisi.



Şekil 4.14. Koyun kalp CA enzimi üzerine **5e** numaralı sülfonamidin etkisi.



Şekil 4.15. Koyun kalp CA enzimi üzerine **5f** numaralı sülfonamidin etkisi.



Şekil 4.16. Koyun kalp CA enzimi üzerine **5g** numaralı sülfonamidin etkisi.

Çizelge 4.7.Koyun kalp CA enzimleri için bulunan IC₅₀ değerleri.

İnhibitör	Koyun kalp CA IC₅₀ değeri (μM)
5a	0,0800
5b	0,1140
5c	0,0990
5d	0,0814
5e	0,1346
5f	0,0847
5g	0,0859

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidraz (CA) her yerde bulunan bir enzim CO₂ in hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonunu dönüşümlü olarak katalizler. Bu enzim hemen hemen yaşayan tüm organizmalarda bulunur, bununla birlikte memelilerde yalnız α -CA gen ailesi üyeleri bulunur(Chegwidden and Carter 2000; Hewett and Emmett 200). Şu ana kadar subselüler yerleşim, biyokimyasal özellikleri ve onların sekansları aracılığıyla memelilerde 16 farklı CA izoenzimi belirlendi. Ek olarak son zamanlarda memeli olmayan omurgalılarda birkaç yeni izoenzim belirlendi(Esbaugh and Tufts 2006).

CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir.Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir.Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Demir *et al.* 2001; Senturk *et al.* 2012). Balık solungacı (Bone *et al.* 1995) ve balık eritrositi (Arena 2002), böceklerden (Sender *et al.* 1999), sığır lökositleri (Gervais and Tufts 1999) gibi çeşitli kaynaklardan saflaştırıldı.

Genel olarak α -gen ailesinde CA izoenzimlerinin 3 farklı grubu bulunmaktadır. Bu grupların bir tanesi memelilerde CA I, II, III, V, VII ve XIII izoenzimlerini bulunduran stoplazmik CA ları içerir. Bu izoenzimler mitokondride bulunan CA V in dışında çeşitli dokuların stoplazmasında bulunurlar. İzoenzimlerin bir diğer grubu memelilerde CA IV, IX, XII, XIV ve XV izoenzimlerini içeren membrana bağlı CA'lar olarak adlandırıldı. Bu izoenzimler birçok farklı doku tipinde plazma membranına bağlıdır. En son grup protein bağlı CA olarak adlandırılan CA VIII, X, XI izoenzimlerini içermektedir (Tashian *et al.* 2000). Bu izoenzimlerin klasik CA aktivitelerini-CO₂'nin hidrasyon/dehidrasyonu aktivitesi- kaybettikleri ve bilinen hiçbir fizyolojik fonksiyon göstermedikleri bilinmektedir fakat oldukça korunumlu bir yapıya sahip olmaları omurgalılarda bu izoenzimli çok önemli kılmaktadır (Tashian *et al.* 2000).

Çoğu farklı dokularda, kemik resorpsiyonu kalsifikasyon, iyon tranportu, asit-baz transportu ve birkaç farklı metabolik prosesleri içeren birkaç farklı fizyolojik prosesleri kapsayan çeşitli CA izoenzimleri bulunur. CA nın en önemli ve ençok çalışılan görevlerinden bir tanesi vücut içindeki solunum gazlarının taşınmasıdır (Esbaugh and Tufts 2006).

Çinko içeren metaloenzimi her yöne dağılmıştır, CA öncelikle hayvanlarıda içeren çoğu yaşayan organizmadan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Bottcher *et al.* 1994; Krunkrai *et al.* 2001; Zhenyan *et al.* 2006). Bu enzim farklı dokularda önemli rol oynar (Supuranet *et al.* 2001; Arslanetal. 2016). Hayvan aleminde bu enzimin literatürde 16 izoenzimi rapor edilmiştir (Nishimori *et al.* 2007). Enzim birçok farklı dokudan saflaştırılmış ve enzim aktivitesi üzerineilaçların, pestisitlerin ve çeşitli kimyasalların etkileri incelenmiştir (Çelik *et al.* 1996; Innocenti *et al.* 2005). Özellikle insanda çoğu hastalıkta CA izoenzimlerinin inhibisyonu kullanılmaktadır. Bundan dolayı; bu enzim çoğu ilaç için hedeftir. Örneğin, CA nın güçlü inhibitörü olarak asetazolamide, dorzolamide ve brinzolamide olarak bazı sülfonamidler vardır (Arena 2002). Bu CA inhibitörleri göz içi basıncı düşürmektedir, çoğunlukla glukomanın tedavisi için farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır (Casini *et al.* 2002).

Medikal ilaçlar, çeşitli metaller, anyonlar ve pestisitler gibi çoğu maddelerin CA'lar üzerinde inhibitör etkisi gösterdiği literatürde belirtilmiştir (Casini *et al.* 2002; Innocenti *et al.* 2005; Şentürk *et al.* 2011). Çoğu kimyasallar nispeten düşük dozajlarda, özellikle spesifik enzimin inhibisyonu normal enzimin aktivitesinde değişim ile Biotanın metabolizmasını etkilemektedir ve bu etki dramatik ve vücut ile ilgili olabilir (Hochsteret *et al.* 1973; Christensenet *et al.* 1982). Bu yüzden, ağır metaller doğada çeşitli kaynaklarda bulunmaktadır ve yaşayan organizmalar üzerinde çeşitli toksikolojik etkilere sahiptir. Örneğin civa ve kadmiyum gibi ağır metallerin sinerjik yolla toksik bir etki gösterdikleri bulunmuştur. (O'Hara 1973; Bianchini and Gilles 1996) Aynı zamanda membran taşıyıcı ligandlar ile ağır metallerin bağlanması onların katalitik fonksiyonunu değiştirebileceği ifade edilmiştir (Rainbow and Dallinger 1993).

Bu çalışmada koyun kalp dokusundan CA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu ve bu enzim üzerine sentezlenen azosülfonamidlerin etkilerini belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada enzimini saflaştırmak için afinite kromatografisi tercih edildi. Bazı proteinler afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplomenter bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı tekniktir (Keha ve Küfrevioğlu 2007). Bunun için Sepharose 4B sülfanil amid L tirozin afinite kolonu tercih edilmiştir.

CA enziminin canlılar için hayati öneme sahip olması ve böbrek dokusunun insanlar için temel besin kaynaklarından olması ve daha önce hiç çalışılmamış olmasından dolayı bu dokuyu tercih ettik. Bu amaçla Ağrı Et Kombinasından alınan taze koyun kalbi soğuk zincir kuralına göre laboratuvarımıza getirilmiştir. Enzimlerin saflaştırılması işlemi iki basamakta gerçekleştirildi; 1) Koyun CA enzimikalp dokusundan homojenat hazırlandı 2) Koyun CA enzimikalp dokusundanelde edilen homojenat numunesi için Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Deney aşamasındaki bütün işlemler soğuk ortamda gerçekleştirildi.

Koyun kalp CA enzimi afinite kromatografisi ile yapılan saflaştırma işlemleri sonucunda kalp dokusundan CA izoenzimi spesifik aktivitesi 900 (EÜ/mg protein) olan, %46,15 verimle yaklaşık 51,93 kat saflaştırıldı. Koyun kalp CA enziminin molekül kütlesini SDS Poliakrilamid jel elektroforezi ile 31 kDa olarak bulundu.

CA enzimi şüana kadar birçok dokudan saflaştırılmıştır. CA enziminin molekül kütlesi canlıdan canlıya, dokudan dokuya farklılık göstermektedir. Robert ve Richard 1971 yılında koyun eritrositlerinden kolon kromatografisi ve izoelektrik fokuslamanın kombinasyonlarını kullanarak bir tane büyük ve üç tane küçük bileşenini saflaştırdılar. Bu büyük form deney süresince sedimentasyonya tek bir bileşen olarak davrandığını bulmuşlardır ve nişasta jel elektroforezi ile molekül kütlesini 30 000 wt mol olarak gözlemlemişlerdir.

Örneğin CA II izoenzimi insan eritrositlerindeki molekül kütlesini 30 kDa olarak bulunmuştur (Şentürk *et al.* 2012). Beydemir vd. 2006 yılında gökkuşağı alabalığının lensinden saflaştırdıkları CA enziminin molekül kütlesini 27 kDa olarak bulmuşlardır. Söyüt vd.2008 yılında gökkuşağı alabalığı beyninden saflaştırdıkları CA nın molekül kütlesini SDS PAGE ile 29 kDa olarak bulmuşlardır. Söyüt ve Beydemir 2008 yılında gökkuşağı alabalığının karaciğerinden CA enziminin molekül kütlesini 29,4 kDa olarak ve 2011 yılında aynı canlı üzerinde farklı bir organ üzerinde yaptıkları çalışmada ise gökkuşağı alabalığının böbreğinden CA enzimini saflaştırmışlardır ve enzimin molekül kütlesini 28,7 kda olarak bulmuşlardır. Kılıç 2011 yılında yaptığı yüksek lisans tezinde koyun midesinden CA I ve CAII izoenzimlerinin molekül kütlesini 26,7 kDa olarak bulmuştur.

Koyun kalp CAenzimi için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Koyun kalp CA enzimi için en iyi aktivite gösterdiği iyonik şiddetkonsantrasyonu 50 mM KH_2PO_4 olarak belirlendi. Koyun kalp CAenzimi için optimum pH çalışmasında CA enzimi için optimum pH: 7,5 olarak bulundu. Koyun kalp CAenzimi için yapılan stabil pH çalışmasında yapılan 2 haftalık gözlem sonucunda CA enziminin stabil olduğu en iyi pH değeri pH:7,5 50 mM KH_2PO_4 tamponu olarak belirlendi.

Demirdağ vd. 2011 yılında insan CA I ve CA II enzimi ile koyun böbreğinden saflaştırdıkları CA enzimi üzerine oksitetrasiklin antibiyotığının etkisini esteraz aktivitesi metodu ile incelediler. Oksitetrasiklin antibiyotığının her üç enzim üzerinde de aktivasyon etkisi gösterdiğini bulmuşlardır. En güçlü aktivasyon etkisini CA I üzerinde ve en zayıf aktivasyon etkisini de CA üzerinde gösterdiğini tesbit etmişlerdir.

Kılıç 2011 yılında yapmış olduğu yüksek lisan tezinde koyun midesinden CA I ve CA II izoenzimlerini saflaştırmış karakterize etmiş bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemiştir. SDS-PAGE ile CA II izoenzimin molekül kütlesini 26,7 kDa olarak bulmuşlardır. Hidrataz aktivitesi metodu ile enroflaksasin, tylosin, ampisilin sodyumun enzimler üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak koyun CA II izoenzimi üzerine etki eden ilaçların IC_{50} değerlerini enroflaksasin, tylosin, ampisilin

ilaçları için sırasıyla 2,47, 0,0387, 1,63 mM olarak hesaplamışlardır. Enzimler üzerine kanamisin sülfatın, amikasin sülfatın ve enroflaksasinin etkilerini esteraz aktivite yöntemini kullanarak incelemişlerdir. kanamisin sülfatın, amikasin sülfatın ve enroflaksasin ilaçları için IC_{50} değerlerini sırasıyla 0,118, 0,0362, K_i değerlerini sırasıyla $0,042 \pm 0,0118$, $0,0327 \pm 0,0078$ mM ve enroflaksasinin CA II izoenzimi üzerinde etki göstermediğini tesbit etmişlerdir (Demirdag *et al.* 2014).

Antibiyotikler canlılar tarafından en çok kullanılan ilaçlardır. Antibiyotiklerin CA izoenzimlerini düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiği belirlenmiştir. Ağır metaller su, hava, beslenme vb. yollarla canlılara geçebilmektedirler ve metaller canlı vücutunda birirmektedirler. Besin zinciri yoluyla metaller canlıdan canlıya geçebilmektedirler. Metallerin yukarıda anlatıldığı gibi CA izoenzimleri üzerinde çok düşük konsantrasyonlarda bile inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanında metallerin metabolik yol enzimleri üzerinde diğer enzimleride inhibe ettiği düşünülürse yapılan çalışmanın önemi daha iyi anlaşılacaktır.

Yaptığımız bu tez çalışmasında:

Koyun kalp CA enzimi Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. SDS-PAGE yöntemi ile enzimlerin saflığı ve proteinin molekül ağırlığı belirlendi.

1. Koyun kalbinden elde edilen CA enzimi %46,15 verimle, 900 EU/mg spesifik aktivite ile 51,93 kat saflaştırıldı.
2. Elde edilen enzim için kinetik çalışmalar yapıldı optimum iyonik şiddet, optimum pH, stabil pH değerleri belirlendi.
3. Koyun kalp CA enzim üzerine yeni sentezlenen azosülfonamidlerin esteraz aktivitesi yöntemi ile IC_{50} değerleri belirlendi.

KAYNAKLAR

- Arena (Applied Research Ethics National Association) (2002) Institutional animal care and use committee guidebook, 2nd ed. Boston, 121-125.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Özmen, İ., Okuroğlu, M.E., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo," *Pharmacological Research*, 42, 187-191.
- Beydemir, S., Bulbul, M., Hisar, O., Soyut, H., Yanık, T., 2006. Carbonic Anhydrase: Affinity Purification and Kinetic Properties from Rainbow Trout Lens *International Journal of Applied Chemistry* ISSN 0973-1792 Vol.2 No.1 pp. 45-55.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Briganti, F., Mangani, S., Scozzafava, A., Vernaglione, G., Supuran, C.T., 1999. Carbonic anhydrase catalyzes cyanamide hydration to urea: Is it mimicking the physiological reaction? *J Biol Inorg Chem*, 4:528-536.
- Brown, D., Zhu, L.X. and Sly, S.W., 1990. Localization of membrane-associated carbonic anhydrase type IV in kidney epithelial cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Cell Biology*, Vol.87, pp. 7457-7461.
- Bottcher, K., Waheed, A. and Sly, W.S., 1994. Membrane-associated carbonic anhydrase from the crab gill: Purification, characterization, and comparison with mammalian CAs. *Arch. Biochem. Biophys*, 312, 429.
- Casini, A., Mincione, F., Vullo, D., Menabuoni, L., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2002. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 17, 9.
- Casini, A., Scozzafava, A., Mincione, F., Menabuoni, L. and Supuran, C.T., 2002. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis of Water Soluble Sulfonamides Incorporating a 4-sulfamoylphenylmethylthiourea Scaffold, with Potent
- Celik, I., Camas, H., Arslan, O., Küfrevioğlu, O.İ., 1996. The effects of some pesticides on human and bovine erythrocyte carbonic anhydrase enzyme activities in vitro. *J Environ Sci Heal A*, 31:2651-2657.
- Chegwidden, W.R., Carter, N.D., Introduction to the carbonic anhydrases. In: Chegwidden, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H., 2000. Introduction to the carbonic anhydrases. *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*. Birkhauser Verlag Basel, Boston pp. 13-28.
- Chegwidden, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H. (Eds.), Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs) and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains. *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*. Birkhauser, Basel, pp. 105-120.
- Christianson, D.W., Fierke, C.A., 1996. Carbonic anhydrase: Evolution of the zinc binding site by nature and by design. *Acc Chem Res*, 29:331-339.
- Demirdag, R., Sentürk, M., Küfrevioğlu, O.İ., 2011. Activatory Effects of Oxytetracycline on Some α -Carbonic Anhydrases. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 39 (2), 207-212.

- Demirdag, R., Yerlikaya, E., Kufrevioglu, O.I., 2011. Purification of Carbonic Anhydrase-II from Sheep Liver and Inhibitory Effects of Some Heavy Metals on Enzyme Activity Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, DOI:10.3109/14756366.2011.615744
- Elleuche, S., Poggeler, S., 2009. Evolution of carbonic anhydrases in fungi. *Curr Genet* 55(2):211-222.
- Esbaugh, A.J., Tufts, B.L., 2006. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 154, 185–198.
- Gervais, M.R. and Tufts, B.L., 1999. Characterization of carbonic anhydrase and anion Exchange in the erythrocytes of bowfin (*Amia cavla*), a primitive air-breathing fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 23:343-350.
- Hewett-Emmett, D., 2000. Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. *EXS*, 90(90):29-76.
- Hewett-Emmett D., 2000. Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. In: Chegvidden WR, Edwards Y, Carter N, editors. *The carbonic anhydrases-New horizons*. Basel: Birkhäuser Verlag, pp 29–78.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, 392, 83-92.
- Hochster, R.M., Kates, M. and Quastel, J.H., 1973. *Metabolic Inhibitors*. Academic Press, Vols. 3 and 4, also see pp. 66-82, pp. 71-89 New York.
- Jabusch, J. R., Deutsch, H. F., 1985. Localization of lysines acetylated in ubiquitin reacted with *p*-nitrophenyl acetate *Archives Biochemistry and Biophysics*, 238, 170-177.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2007. *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, 5. Baskı. Sirkeci/İstanbul.
- Kimber, M.S, Pai, E.F., 2000. The active site architecture of *Pisum sativum* betacarbonic anhydrase is a mirror image of that of alpha-carbonic anhydrases. *EMBO J*, 19(7):1407-1418.
- Klengel T, Liang W.J, Chaloupka J, Ruoff C, Schroppel K, Naglik JR, Eckert S.E, Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lehninger *Biyokimyanın İlkeleri* David L.Nelson, Michael M. Cox (Çeviri editörü: Nedret Kılıç) Palme yayıncılık 2005
- Lindskog, S., 1960. Purification and properties of bovine erythrocyte carbonic anhydrase *Biochimica et Biophysica Acta*, 39, 218.
- Lindskog, S., Silverman, D.W., 2000. The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. In: Chegvidden WR, Edwards Y, Carter N, editors. *The carbonic anhydrases-New horizons*; Basel: Birkhäuser Verlag, pp 175-196.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 57, 685
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 130, 26.

- Maren, T.H., Wynns, G.C., Wistrand, P.J., 1993. Chemical properties of carbonic anhydrase IV, the membrane-bound enzyme. *Mol. Pharmacol.* 44, 901-905.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Onishi, S., Vullo, D., Cecchi, A., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2007. Carbonic anhydrase inhibitors: Cloning, characterization, and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 7229.
- Parisi, G., Perales, M., Fornasari, M.S., Colaneri, A., Gonzalez-Schain, N., Gomez-Casati, D., Zimmermann, S., Brennicke, A., Araya, A., Ferry, J.G., Echave, J., Zabaleta, E., 2004. Gamma carbonic anhydrases in plant mitochondria. *Plant Mol Biol*, 55(2):193-207.
- Parui, R., Gambir, K. K., Mehrotra, P. P., 1991. *Biochem. Int*, 23, 779-789
- Parui, R., Gambir, K. K., Cruz, I., Hosten, A. O., 1992. *Biochem. Int*, 26, 809-820
- O'Hara, J., 1973. Cadmium Uptake by Fiddler Crabs Exposed to Temperature and Salinity Stress, *J. Fish. Res. Board. Can*, 30, 846.
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X.L., Sly, W.S., 1995. Carbonic anhydrase IV: role of removal of C-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme activity. *Arch. Biochem. Biophys*, 320, 315-322.
- Rainbow, P.S. and Dallinger, R., 1993. Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. In: Dallinger R, Rainbow PS, Eds. *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 119-131.
- Sawaya, M.R., Cannon, G.C., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E.B., Yeates T.O., Kerfeld, C.A., 2006. The structure of beta-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. *J Biol Chem*, 281(11):7546-7555.
- Sly W.S., Hu P.Y., 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem* 64:375-401
- Sly, W.S., 2000. The membrane carbonic anhydrases: from CO₂ transport to tumor markers. In: Chegwidan, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H. (Eds.), *The membrane carbonic anhydrases: from CO₂ transport to tumor markers. The Carbonic Anhydrases*. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp. 96-103.
- So A.K., Espie G.S., Williams E.B., Shively J.M., Heinhorst S., Cannon G.C., 2004. A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell. *J Bacteriol*, 186(3):623-630.
- Supuran C.T., Conroy C.W., Maren T.H., 1997. Is cyanate a carbonic anhydrase substrate?: *Proteins Struct Funct Genet* 27:272-278.
- Supuran C.T., Scozzafava A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Exp Opin Ther Patents* 10:575-600.
- Supuran, C.T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwidan, W.R. and Scozzafava, A., 2001. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 703.
- Supuran CT, Scozzafava A., 2002. Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Exp Opin Ther Patents* 12:217-242.
- Supuran CT., 2004. Carbonic anhydrases: Catalytic and inhibition mechanisms, distribution and physiological roles carbonic anhydrase. In: Supuran CT, Scozzafava Conway J, editors. *Carbonic anhydrase. Its inhibitors and activators*. London: CRC Press; p 1-23.

- Supuran, C. T., 2008. Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Disc.*, 7, 168-181.
- Stams, T., Christianson, D.W., 2000. X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. In: Chegwiddden, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H. (Eds.), X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*. Birkhauser Verlag, Boston. pp. 159–174.
- Senturk, M., Gulcin, I., Beydemir, S., Kufrevioglu, O.I., Supuran, C.T. 2011. In vitro inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chemical Biology & Drug Design*. 77, 494-499.
- Senturk, M., Ekinici, D., Goksu, S., Supuran, C.T. 2012. Effects of dopaminergic compounds on carbonic anhydrase isozymes I, II, and VI. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 27; 3: 365-369.
- Tappan, D. V., Jacey, M. J. and Boyden, H. M. Ann. N.Y., 1964. *Acad. Sci*, 121, 589.
- Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., Carter, N.D., Bergenheim, N.C.H., 2000. Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs) and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains.
- Tashian R. E., Hewett-Emmett D., Venta P. J., 1991. "Diversity and Evolution in the Carbonic Anhydrase Gene Family," ed. by Botrè F., Gros G., Storey B. T., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim., pp. 151-161.
- Tripp B.C, Bell C.B, Cruz F, Krebs C, Ferry J.G., 2004. A role for iron in an ancient carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 279(8):6683-6687.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T., 1967 Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J.Biol.Chem*. 242, 4221.
- Waheed, A., Okuyama, T., Heyduk, T., Sly, W.S., 1996. Carbonic anhydrase IV: purification of a secretory form of the recombinant human enzyme and identification of the positions and importance of its disulfide bonds. *Arch Biochem. Biophys*. 333, 432-438.
- Waheed A, Zhu X.L, and Sly S.W., 1991. Membrane-associated Carbonic Anhydrase from Rat Lung Purification, characterization, tissue distribution, and comparison with carbonic Anhydrase IVs of other mammals. Vol. 267, No. 5, Issue of February 15, pp. 3308-3311
- Waheed A, Zhu L. W and Sly, S.W., 1992. Membrane-Associated carbonic anhydrase from Rat Lung purification, characterization, tissue distribution and comparison with carbonic anhydrase IVs of other mammals. *The Journal of Biological Chemistry* 1992 by The American Society for Biochemistry and molecular biology, Inc. Vol.267, No.5, Issue of February 15, pp. 3308-3311, printed in U.S.A.
- Whitney, P.L., Briggles, T.V., 1982. Membrane-associated carbonic anhydrase purified from bovine lung. *J. Biol. Chem.*, 257, 12056–12059
- Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- Xu Y., Feng L., Jeffrey P.D., Shi Y., Morel F.M., 2008. Structure and metal Exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, 452(7183):56-61.

Zimmerman, S. A., Ferry, J. G. & Supuran C. T., 2007. Inhibition of the archaeal β -Class (Cab) and γ -Class (Cam) carbonic anhydrases. *Curr. Top. Med. Chem.*, **7**, 901-908



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Mustafa ORHAN
Doğum Yeri	Hamur
Tarihi	1991
İletişim bilgileri	Mustafa.orhan04@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi	Fen Bilimleri Enstitüsü	Biyokimya	Yüksek Lisans	2017
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi	Fen Edebiyat Fakültesi	Kimya	Lisans	2014

YAYINLARI

A) Uluslar Arası Konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

A.1.	Orhan, M., Celik, H., Senturk, E., Javed, K., Durdagi, S., Ekinci, D., Senturk, M. Purification of Carbonic Anhydrase Enzyme from Bovine Liver and Investigation of Inhibition Effects of Some Sulfonamide Derivatives. 3rd International BAU Drug Design Congress, 1-3 October 2015. Istanbul, Turkey.
A.2.	Koz, G., Orhan, M., Çelik, H., Durdagi, S., Ekinci, D., Şentürk, M., Coşgun, N. Kinetic and Docking Study of Some Malononitrile Derivatives of Acetylcholinesterase. 3rd International BAU Drug Design Congress, 1-3 October 2015. Istanbul, Turkey.
A.3.	Çelik, H., Orhan, M., Şentürk, E., Şentürk, M. Comparison of Inhibition Effects of Some Phenolic Compounds on Carbonic Anhydrase Isoenzymes from Mammalian Tissues. 2 nd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies. November 27-29, 2015. Istanbul, Turkey.
A.4.	Arslan, T., Orhan, M., Karagöz, L., Şentürk, M. Synthesis of Novel Azosulfonamide Chalcones and Investigation of Inhibitory Effects on Some Carbonic Anhydrase Isoenzymes. 3rd International BAU Drug Design Congress, 1-3 October 2015. Istanbul, Turkey.
A.5.	Arslan, T., Senturk, M., Orhan, M. Synthesis of Novel Methyl and Methoxy Substituted Azosulfonamide Chalcones and Carbonic Anhydrase Inhibitory Properties. International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences (ICANAS 2017), April 19-21 2017. Antalya, Turkey.

B) Ulusal Konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

B.1.	Çelik, H., Orhan, M. , Arslan, M., Fidan, İ., Şentürk, M., 2015.Asetilkolin Esteraz Enzimi Üzerinde Bazı Hidroksilli Moleküllerin <i>İn Vitro</i> Etkilerinin Belirlenmesi. 2. Ulusal hesaplamalı kimya kongresi. 2-5 Haziran, Kars.
C.2.	Tosun, G., Orhan, M. ,Çelik, H., Salmas,R.E., Mestanoğlu, M., Durdağı, S., Ekinci, D., Arslan, T., Şentürk, M., Yaylı, N., 2015. Bazı Pirazol Türevlerinin İnsan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerinde <i>İn Vitro</i> ve <i>İn Silico</i> Etkilerinin İncelenmesi. 2. Ulusal hesaplamalı kimya kongresi. 2-5 Haziran, Kars.
C.3.	Orhan, M. ,Çelik, H., Oğur, E., Şentürk, M.,2015. Safranin Maddesinin Asetilkolin Esteraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi. 2. Ulusal hesaplamalı kimya kongresi. 2-5 Haziran, Kars.
C.4.	Orhan, M. ,Çelik, H., Oğur, E., Durdağı, S., Şentürk, M.,2015. Asetilkolin Esteraz ve Butirilkolin Esteraz Enzimleri Üzerinde Anizol Türevlerinin <i>İn Vitro</i> ve <i>İn Silico</i> Etkisilerinin İncelenmesi. 2. Ulusal hesaplamalı kimya kongresi. 2-5 Haziran, Kars.
C.5.	Orhan, M. , Şentürk, M. Koyun Kalp Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Fenolik Maddelerin in Vitro İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi. 27. Ulusal Kimya Kongresi. 23-28 Ağustos 2015. Çanakkale.
C.6.	Orhan, M. , Çelik, H., Güney, M., Çavdar, H., Şentürk, M. Bazı Urasil Türevlerinin Antioksidan Etkilerinin ve Bazı Antioksidan Enzimler Üzerine İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi. 27. Ulusal Kimya Kongresi. 23-28 Ağustos 2015. Çanakkale.
C.7.	Orhan, M. , Çelik, H., Oğur, E., Talaz, O., Şentürk, M. Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz Enzimleri Üzerinde Bazı Sülfonamidlerin in Vitro Etkilerinin İncelenmesi. 27. Ulusal Kimya Kongresi. 23-28 Ağustos 2015. Çanakkale.