

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PELAJİK VE BENTİK BALIKLARININ SOLUNGAÇLARINDAN
SAFLAŞTIRILAN KARBONİKANHİDRAZ AKTİVİTELERİNİN
İRDELENMESİ

PELİN BİRİNCİ

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. BARBAROS DİNÇER
TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. SEVGİ KOLAYLI
YRD. DOÇ. DR. ÖZLEM FAİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI


RİZE-2017

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PELAJİK VE BENTİK BALIKLARININ SOLUNGAÇLARINDAN
SAFLAŞTIRILAN KARBONİKANHİDRAZ AKTİVİTELERİNİN
İRDELENMESİ

Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER danışmanlığında, Pelin BİRİNCİ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/11/2017 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ	


Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, tüm canlılarda bulunan ve solunum sisteminin önemli enzimlerinden biri olan karbonik anhidraz, Mezgıt (bentik) ve Hamsi (pelajik) balıklarının solungaçlarından saflaştırılmış ve enzim karakterize edilmiştir. Çalışmanın tüm deneysel kısımları, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tezimin her aşamasında yanımda olan, yüksek hoşgörü ve anlayış gösteren, hiç bir konuda desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER'e teşekkür ederim. Balıkların temini ve saklanması konusunda yardımlarından dolayı Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan KORAL hocama teşekkür ederim. Her zaman bilgisiyle tecrübesiyle sevgi, ilgi ve anlayışla yanımda olan sevgili hocalarım Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI, Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Nimet BALTAŞ'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarımnda hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, sürekli destek olan Sayın Mehmet KILIÇARSLAN ve Havva ATASEVER'e teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana güvenerek her zaman yanımda olan, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, canım babam Mehmet BİRİNCİ'ye, canım annem Birgül BİRİNCİ'ye ve mutluluk kaynağım sevgili kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

Pelin BİRİNCİ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan Hazırlanan “Pelajik ve Bentik Balıklarının Solungaçlarından Saflaştırılan Karbonikahidraz Aktivitelerinin İrdelenmesi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.
24/11/2017



Pelin BİRİNCİ

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

PELAJİK VE BENTİK BALIKLARININ SOLUNGAÇLARINDAN SAFLAŞTIRILAN KARBONİKANHİDRAZ AKTİVİTELERİNİN İRDELENMESİ

Pelin BİRİNCİ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

Bu çalışmada, denizel ortamda bentik bölgede yaşayan Mezgıt ve pelajik bölgede yaşayan Hamsi balıklarının solungaçlarından karbonik anhidraz (CA) saflaştırıldı ve karakterize edildi. Mezgıt balığı solungacından elde edilen CA enzimi, Sepharose-4B-L tirozin-sülfanilamid afinite kolonunda 14 kat ve %19,5 verimle saflaştırıldı. Hamsi balığı solungacından elde edilen CA enzimi ise 17 kat ve %9,5 verimle saflaştırıldı. Mezgıt ve Hamsi balıklarının özgül aktiviteleri sırasıyla 126,4 EU/mg protein ve 1.000,0 EU/mg protein olarak belirlendi. SDS-PAG Elektroforezi sonucunda her iki balığın solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidrazların altbirim molekül kütlesi yaklaşık 29 kDa olan tek protein bantlarına sahip oldukları belirlendi. Solungaçlarından elde edilen CA'ların p-nitrofenil asetat substratı varlığında esteraz aktiviteleri pH 8,0'da ve 40 °C sıcaklıkta en yüksek olduğu belirlendi. Mezgıt ve Hamsi balıklarının solungaçlarından saflaştırılan CA' nın, p-nitrofenol asetat substratı varlığında K_m ve V_{maks} değerleri Lineweaver-Burk grafiğiyle hesaplandı ve sırasıyla K_m değeri 0,08 mM ve 0,01 mM, V_{maks} değeri 1×10^7 $\mu\text{M}/\text{dak}$ ve $2,5 \times 10^6$ $\mu\text{M}/\text{dak}$ olarak tespit edildi. Mezgıt ve Hamsi balıklarının solungaçlarından elde edilen CA' nın sırasıyla sülfanilamid inhibitörü varlığında 6,0 μM ile 4,0 μM ve asetazolamid inhibitörü varlığında ise 2,0 μM ile 2,0 μM IC_{50} değerlerine sahip olduğu tespit edildi.

2017, 62 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karbonik anhidraz, Mezgıt Balığı, Hamsi Balığı, Pelajik, Bentik.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PURIFIED CARBONIC ANHYDRASE ACTIVITY FROM THE GILLS OF PELAGIC AND BENTHIC FISH

Pelin BİRİNCİ

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Master Thesis
Supervisor: Asiss. Prof. Dr. Barbaros DİNÇER

In this study, carbonic anhydrase (CA) was purified and characterized from the gills of anchovy fish living in the pelagic region and whiting living in the benthic region in marine environment. Carbonic anhydrase from the whiting gill was purified 14 fold and %19.5 yield using Sepharose-4B-L tyrosine-sulfanilamide affinity column. Also, carbonic anhydrase from the anchovy gill was purified 17 fold and %9.5 yield using same column. The specific activity of whiting and anchovy fish were determined as 126.4 EU / mg protein and 1,000.0 EU / mg protein, respectively. SDS-PAGE Electrophoresis showed that the carbonic anhydrases purified from the gills of both fish had single protein bands with a subunit molecular mass of approximately 29 kDa. In the presence of p-nitrophenyl acetate substratum of gills, esterase activities were found to be highest at pH 8.0 and 40 ° C. The values of K_m and V_{max} of carbonic anhydrase from the gills of whiting and anchovy fish were calculated by Lineweaver-Burk graph in the presence of p-nitrophenol acetate substrate and K_m values were determined as 0.08 mM and 0.01 mM respectively, V_{max} value was $1 \times 10^7 \mu\text{M} / \text{min}$ and $2.5 \times 10^6 \mu\text{M} / \text{min}$, respectively. It was determined that the CA obtained from the gills of whiting and anchovy fish had an IC_{50} value of 6.0 μM to 4.0 μM against the sulfanilamide inhibitor, respectively and 2.0 μM to 2.0 μM , against the acetazolamide inhibitor.

2017, 62 pages

Key words: Carbonic anhydrase, Whiting, Anchovy, Pelagic, Benthic.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLERve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Çalışmanın Amacı.....	2
1.3. Karbonik Anhidraz.....	3
1.3.1. Karbonik Anhidraz Ailesinin Sınıflandırılması.....	5
1.3.1.1. α Sınıfı Karbonik Anhidraz.....	5
1.3.1.2. β -Sınıfı Karbonik Anhidraz.....	10
1.3.1.3. γ -Sınıfı Karbonik Anhidraz.....	10
1.4. Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Fonksiyonları.....	11
1.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	12
1.5.1. Asetazolamid.....	14
1.5.2. Metazolamid.....	15
1.5.3. Etokszolamid.....	16
1.5.4. Benzolamid.....	16
1.5.5. Diklorfenamid.....	17
1.5.6. Dorzolamid.....	17
1.5.7. Brinzolamid.....	18
1.5.8. Sulthiam.....	18
1.5.9. İndisulam.....	19
1.5.10. Sakarin.....	19
1.5.11. Sulpirid.....	20
1.5.12. Zonisamid.....	21
1.5.13. Selekoksib.....	21

1.5.14.	Valdekoksib.....	22
1.5.15.	Topiramate.....	22
1.6.	Mezgit Balıklarının Genel Özellikleri.....	23
1.7.	Hamsi Balıklarının Genel Özellikleri.....	24
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	27
2.1.	Materyal.....	27
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	27
2.1.2.	Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	27
2.1.3.	Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	28
2.1.4.	Çalışmada Kullanılan Mezgit ve Hamsi Balıklarının Temini.....	31
2.2.	Yöntemler.....	31
2.2.1.	Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarının Temini ve Homojenatlarının Hazırlanması.....	31
2.2.2.	Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarından CA Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları İle İlgili Yöntemler.....	32
2.2.2.1.	Sepharose-4B Afinite Kolonunun Hazırlanması.....	32
2.2.2.1.1.	CNBr ile Aktive Edilmiş Sepharose-4B' ye L-Tirozin Takılması.....	32
2.2.2.1.2.	Sülfanilamid Kenetlendirilmesi.....	32
2.2.2.2.	Mezgit ve Hamsi Balıklarının Homojenatlarının Afinite Kolonuna Sırasıyla Tatbiki ve Elüsyonu.....	34
2.2.3.	Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)....	34
2.2.4.	Kantitatif Protein Tayini.....	36
2.2.5.	Elüatlarda Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayini.....	36
2.2.5.1.	CO ₂ Hidrataz Aktivitesi Tayini.....	37
2.2.5.2.	Esteraz Aktivitesi Tayini.....	38
2.2.6.	Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarındaki CA'nın Kinetik İncelenmesi.....	39
2.2.6.1.	pH'ın Karbonik Anhidraz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi.....	39
2.2.6.2.	Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarından Saflaştırılan CA'ın Esteraz Aktivitesi için K _m , V _{max} , K _{kat} ve V _o Değerlerinin Bulunması...	40
2.2.6.3.	Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarından CA'nın İnhibisyon Çalışması.....	40
3.	BULGULAR.....	41

3.1. Mezgıt ve Hamsi Solungaçlarında Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart alışma Grafiği ve Hidrataz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	41
3.2. Mezgıt ve Hamsi Solungaçlarından Karbonik Anhidrazın Saflaştırılmasına Ait Bulgular.....	42
3.3. SDS-PAGE Elektforez Bulguları.....	44
3.4. Mezgıt ve Hamsi Balıklarının Solungaç Dokularındaki Karbonik Anhidrazın Optimum pH değerleri.....	45
3.5. Mezgıt ve Hamsi Solungaçlarından Saflaştırılan CA'nın Kinetik Verilerine Ait Bulgular.....	47
3.6. Mezgıt ve Hamsi Solungaçlarından Saflaştırılan CA'nın İnhibisyon alışmalarına Ait Bulgular.....	48
4. TARTIşMA.....	50
5. SONUÇLAR.....	54
6. ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR.....	57
ZGEMIş.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri.....	7
Şekil 2. A) CA II; aktif bölge yapısı, B) CA II; üç boyutlu yapısı.....	7
Şekil 3. HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik gösterilişi.....	8
Şekil 4. CA'nın katalitik mekanizması.....	9
Şekil 5. A-Methanosarcina thermophila CA'sı, B- γ CA'nın aktif bölgesinde metal ligasyonu.....	10
Şekil 6. Karbonik Anhidraz enzimin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi.....	14
Şekil 7. Asetazolamid.....	15
Şekil 8. Metazolamid.....	15
Şekil 9. Etokszolamid.....	16
Şekil 10. Bezolamid.....	16
Şekil 11. Diklorfenamid.....	17
Şekil 12. Dorzolamid.....	17
Şekil 13. Brinzolamid.....	18
Şekil 14. Sultiham.....	18
Şekil 15. Indisilam.....	19
Şekil 16. Sakarin.....	20
Şekil 17. Sulpirid.....	20
Şekil 18. Zonisamid.....	21
Şekil 19. Selekoksib.....	21
Şekil 20. Valdekoksib.....	22
Şekil 21. Topiramate.....	22
Şekil 22. Mezgit Balıklarının (<i>Merlangius euxmus</i>) görünümü.....	23
Şekil 23. Hamsi Balıklarının (<i>Engraulis encrasicolus</i>) görünümü.....	25
Şekil 24. CNBr Sepharose 4B-L-Tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların açık formülleri	33
Şekil 25. Esteraz Aktivitesi Reaksiyon Mekanizması.....	38
Şekil 26. Protein standart çalışma grafiği.....	41
Şekil 27. Mezgit Balığı solungacından elde edilen CA elüsyon grafiği.....	42

Şekil 28.	Hamsi Balığı solungacından elde edilen CA elüsyon grafiği	43
Şekil 29.	Mezgit solungacından elde edilen SDS-PAGE elektroforezi	44
Şekil 30.	Hamsi solungacından elde edilen SDS-PAGE elektroforezi	45
Şekil 31.	Protein molekül ağırlığı standart çalışma grafiği.....	45
Şekil 32.	Mezgit Balığı solungacından saflaştırılan CA için pH grafiği.....	46
Şekil 33.	Hamsi Balığı solungacından saflaştırılan CA için pH grafiği	46
Şekil 34.	Mezgit Balığından saflaştırılan CA'nın <i>p</i> -NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği.....	47
Şekil 35.	Hamsi Balığından saflaştırılan CA'nın <i>p</i> -NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği.....	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon turleri.....	5
Tablo 2. Ylıksek omurgalılarda α CA izoenzimleri, onların nispi CO ₂ hidrataz aktiviteleri, sülfonamid inhibitörlerine karşı afiniteleri ve hücre içindeki yerleşimleri.....	6
Tablo 3. Çalışmada kullanılan alet, cihazlar ve markaları.....	27
Tablo 4. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanıldığı yerler.....	28
Tablo 5. CO ₂ -hidrataz aktivitesi reaksiyon karışımı.....	37
Tablo 6. Esteraz aktivitesi için reaksiyon karışımı.....	39
Tablo 7. Mezigit Balığı solungacından saflaştırılan CA enziminin saflaştırma tablosu.....	43
Tablo 8. Hamsi Balığı solungacından saflaştırılan CA enziminin saflaştırma tablosu.....	43
Tablo 9. Mezigit Balığı solungacından saflaştırılan CA için kinetik veriler.....	48
Tablo 10. Hamsi Balığı solungacından saflaştırılan CA için kinetik veriler.....	48
Tablo 11. Karbonik anhidrazın inhibitörleri varlığında elde edilen IC ₅₀ değerleri...	49

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CA	Karbonik Anhidraz
EU	Enzim Ünitesi
<i>p</i> -NFA	Paranitro Fenil Asetat
hCA	Human Karbonik Anhidraz
IC ₅₀	%50 İnhibisyon Konsantrasyonu
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletillen Diamin
K _m	Michaelis-Menten Sabiti
V _{maks}	Maksimum Hız
EDTA	Etilendiamintetraasetatik Asit
EC	Enzim kodu
kDa	Kilodalton
ABS	Absorbans Değeri

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Aerobik organizmalarda O₂'li solunum sonucunda oluşan CO₂ gazı akciğerler vasıtasıyla dışarı verirler. CO₂'in sudaki çözünürlüğü tüm gazlar gibi ortam sıcaklığına ve basıncına bağlıdır. Solunum esnasında oluşan CO₂ gazının suda çözünür hale gelmesinden pek çok fizyolojik etkinliğe kadar rol alan önemli bir enzim grubu karbonik anhidrazlardır (Smith ve Ferry, 2000).

Fizyolojik pH'da karbondioksitin bikarbonata dönüşümü çok yavaştır ve enzim tarafından katalizlenmesi gerekir. CO₂' in bikarbonata çevrimi CO₂' in hücre içinde tutulmasında önemlidir. HCO₃⁻'in CO₂'e çevrimi ise HCO₃⁻'in hücre içine girişini kolaylaştırır. Böylece, enzimatik olarak CO₂ ve HCO₃⁻'in çevrilmesi sadece hücresel enzimlerin ihtiyaç duydukları seviyede hücrenin karbondioksit miktarını artırmasında değil, ayrıca hücresel işlemlerin başarılabilmesi için uygun hücre içi karbondioksit ve bikarbonat seviyelerinin devamında da hücreye yardımcı olur. CO₂ ve HCO₃⁻'in birbirlerine çevrilmesi reaksiyonlarını katalizleyen karbonik anhidraz (CA) enzimidir (Smith ve Ferry, 2000).

Karbonik anhidraz, temel olarak solunum sırasında oluşan karbondioksitin suda çözünmesini, taşınmasını ve vücuttan atılmasını sağlayan bir enzimdir. Bunun yanında; asit-baz dengesini, iyon değişimini, kardivasküler sistemin düzenlenmesi gibi pek çok fizyolojik olayda rol alan çok önemli bir enzimdir. Canlılarda çok yaygın olarak bulunan CA enziminin bulunduğu ortamın şartlarına ve ihtiyacına göre değişik izoenzimleri mevcuttur. Her geçen gün yeni bir izoenzimi ortaya çıkartılmakta olup bugün itibariyle 16 tane izoenzimi bulunmaktadır. Üzerinde en çok çalışma yapılan ve en yaygın olarak bulunan izoenzimleri ise CA I ve CAII' dir.

CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn²⁺ iyonu genel olarak metabolik karbondioksit transportunun yanı sıra birçok dokuda H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarının birikiminde de önemli rol oynar. Böylece vücuttaki birçok dokuda H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarının toplanmasını sağlayarak, vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında da önem bir yere sahiptir (Chegwidden vd, 2000; Wistrand, 1981). Böbrek, gastrit, mukoza ve göz lensi bu dokular arasında gösterilebilir. Bu dokular haricinde, histokimyasal

yöntemlerle tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da karbonik anhidraz enzimine rastlanmıştır. Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, bazı böcek ve bakterilerde enzimin değişik rolleri olduğu kanıtlanmıştır (Supuran ve Scozzafava, 2001; Chegwiddden vd., 2000).

1.2. Çalışmanın Amacı

Bütün canlılarda bulunan ve üzerinde en çok çalışma yapılan enzim karbonik anhidrazdır. Canlı sistemlerde pH düzenleyici, su elektrolit ve iyon transportunu düzenleyici olarak rol alan bir enzimdir. CA' lar fizyolojik olarak CO₂'in hidrasyonunu ve HCO₃⁻'ın dehidratasyonunu dönüşümlü bir şekilde katalizler. Enzim, bütün dokularda mevcut olup hidrataz aktivitesinin yanında H⁺ ve HCO₃⁻ birikiminde de rol oynamaktadır.

Karbonik anhidraz enziminin, hidrataz aktivitesiyle canlılarda çok önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Bununla birlikte bazı ester bağlarının parçalanması ve aldehitlerin hidrasyonunu da katalizlemesi, enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını da sağlamıştır. Günümüzde CA'nın farklı canlı ve dokularda fonksiyonlarının tam olarak anlaşılması ve farklılıklarının ortaya konması için yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Literatür taraması sonucunda genellikle CA çok tüketilen tatlı su balıklarının dokularında çalışıldığı, tuzlu su balıklarının dokularında ise çok az sayıda çalışmanın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca denizin pelajik (yüzey) ve bentik (dip) bölgelerinde yaşayan balık türlerindeki mevcut CA farklılıklarını ortaya koyan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada, tuzlu su yüzey ve dip balıkları olan sırasıyla hamsi ve mezgitin solungacından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca bu balıkların solungaçlarındaki CA enziminin detaylı olarak kinetiğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Solungaçlardan Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonu kullanarak CA'lar saflaştırılıp, enzimlerin farklı pH, substrat konsantrasyonları ve inhibitörlerdeki hidrataz ile esteraz aktiviteleri incelendi. Ayrıca, dip ve yüzey

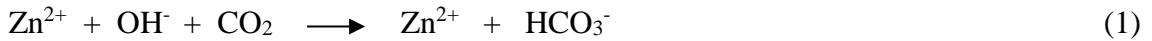
balıklarının CA aktivitelerinde farklılıkların olup olmadığı ve solungaç CA'nın çevresel faktörlerden ne düzeyde etkilendikleri belirlenmesi amaçlandı.

1.3. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz (CA; EC 4.2.1.1.) enzimi ilk kez 1933 yılında eritrositlerde karakterize edilmiştir. Bu çalışmalarda eritrositlerden HCO_3^- 'in hızlı transferi için gerekli olduğu teorik olarak saptanan bir katalitik faktör araştırılmıştır. Böylece CA enzimi, tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir.

CA aktif bölgesinde Zn^{2+} iyonu bulduran bir metalloenzim ailesindedir (Smith ve Ferry, 2000) ve canlılarda CO_2 hidrasyonunu tersinir olarak katalizler. Karbonik anhidraz biyolojik sistemler için oldukça önemlidir. Çünkü, karbondioksitin bikarbonata katalizsiz dönüşümü nötral pH da oldukça yavaştır (Sharma vd., 2009).

Kinetik çalışmalar bütün karbonik anhidraz izoenzimlerinde iki basamaklı bir mekanizmanın olduğunu göstermiştir. İlk basamakta (Reaksiyon 1) çinkoya bağlı hidroksit iyonunun CO_2 'ye nükleofilik saldırısı gerçekleşmektedir. İkinci basamakta (Reaksiyon 2) ise çinkoya bağlı su molekülünün iyonlaşması ve protonun uzaklaştırılmasıyla aktif bölgenin tekrar oluşturulması olayları gerçekleşmektedir.



Bu mekanizmada Reaksiyon 3 safhasının gerçekleşmesinde, protonun dış çözücü ortamına aktarılması için enzimin aktif bölgesindeki bir aminoasit birimi proton taşıyıcı birim (PTB) olarak rol oynamaktadır. PTB aldığı protonu ortamdaki tampon (B) moleküllerine aktarmaktadır (Reaksiyon 3 ve 4).



Karbonik anhidraz II'nin katalizlediği enzimatik mekanizmada hız belirleyici basamak protonun aktif bölgeden uzaklaştırılması safhasıdır. Bu edenle aktif bölgedeki proton taşıma kapasitesine sahip aminoasit birimleri aktivitede önemlidirler Aktivitede

çinkonun dördüncü ligand pozisyonuna yakın bölgede bir hidrojen bağı alıcısının olması önemlidir. Enzim, hidrataz aktivitesi yanında esteraz aktivitesine de sahiptir, ancak fizyolojik açıdan hidrataz aktivitesi önemlidir. Bu sayede organizmanın asit-baz dengesinin düzenlenmesinde önemli rol üstlenir. Bu dengenin bozulduğu durumlarda, örneğin göz içi tansiyonunda, karbonik anhidraz enzim aktivitesine müdahale sıklıkla uygulanan bir tedavi yöntemidir. Bu açıdan CA inhibitörleri klinik olarak önemli bileşiklerdir (Pushkas vd., 2000).

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

Karbonik anhidraz enziminin, hidrataz aktivitesiyle son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidratasyonunu da katalizlemesi, karbonik anhidraz enziminin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir. Bu nedenle, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılmasında daha etkili ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Falkbring vd., 1972).

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

Reaktifler			Ürünler
O=C=O	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	HCO ₃ ⁻ + H ⁺
HN=C=NH	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	H ₂ NCONH ₂
RCHO	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	RCH(OH) ₂
RCOOAr	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	RCOOH + ArOH
RSO ₃ Ar	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	RSO ₃ H + ArOH
ArOPO ₃	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	HPO ₃ ⁻² + ArOH
ArF	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	HF + ArOH
PhCH ₂ OCOCl	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	PhCH ₂ OH + CO ₂ + HCl
RSO ₂ Cl	+ H ₂ O	\rightleftharpoons	RSO ₃ H + HCl

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

1.3.1. Karbonik Anhidraz Ailesinin Sınıflandırılması

Karbonik Anhidraz enzimleri α , β , γ , δ , ζ CA' lar olarak 5 farklı familyada sınıflandırılmıştır.

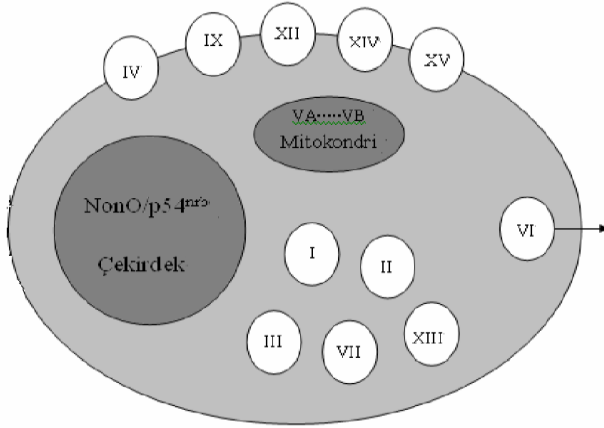
1.3.1.1. α Sınıfı Karbonik Anhidraz

Günümüze kadar kataliz mekanizması olarak en çok çalışılmış ve en yaygın dağılımı olan sınıf olarak bilinmektedir. Yıllarca hayvanlarda bulunduğu bilinmesine rağmen son yıllarda bitkilerde de bulunduğu çalışmalarla ortaya konmuştur. Karbonik anhidrazlar; hayvanlar, bitkiler, algler, eubakteriler ve virüslerde tespit edilmiştir. Memelilerde 16 farklı α CA izoenzimi vardır. Bu izoenzimler arasındaki ilişkiler tespit edilmiştir (Tablo 2).

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

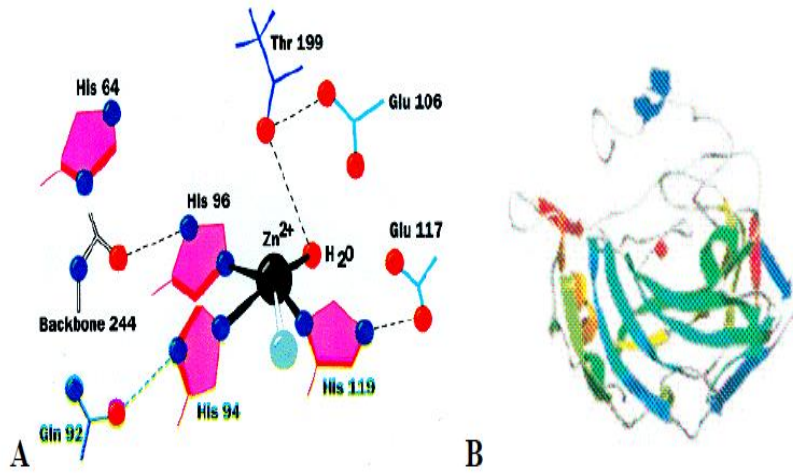
İzoenzim	Katalitik aktivite (CO₂ hidrasyonu)	Sülfonamidlere karşı afinite	Hücre içi yerleşme
CA I	Düşük (CAII'nin %10'u)	Orta	Sitoplazma
CA II	Yüksek	Çok yüksek	Sitoplazma
CA III	Çok düşük	Çok düşük	Sitoplazma
CA IV	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CA VA	Orta derece- yüksek*	Yüksek	Mitokondri
CA VB	Yüksek	Yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta derece	Yüksek	Tükürük/süt'te salgı
CAVII	Yüksek	Çok yüksek	Sitoplazma
CARP VIII	Akatalitik	#	Sitoplazma
CA IX	Orta derece	Yüksek	Transmembran
CARP X	Akatalitik	#	Sitoplazma
CARP XI	Akatalitik	#	Sitoplazma
CA XII	Düşük	Yüksek	Transmembran
CA XIII	Orta derece	Orta-yüksek	Sitoplazma
CA XIV	Düşük	Yüksek	Transmembran
CA XV	Düşük	Bilinmiyor	Membrana bağlı

Beş tane membrana bağlı (CA IV, IX, XII, XIV ve XV), beş tane sitozolik formu (CA I, II, III, VII ve XIII), iki mitokondriyal formu (CA VA ve VB) bulunmaktadır. Ayrıca tükürük ve sütte bulunan bir salgı CA izoenzimi (CA VI) vardır. Bununla birlikte karbonik anhidraz gen ailesine ait olan üç tane karbonik anhidraz ile ilişkili protein (CARP) vardır (Şekil 1) (Supuran, 2008).



Şekil 1. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri (Supuran, 2008).

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



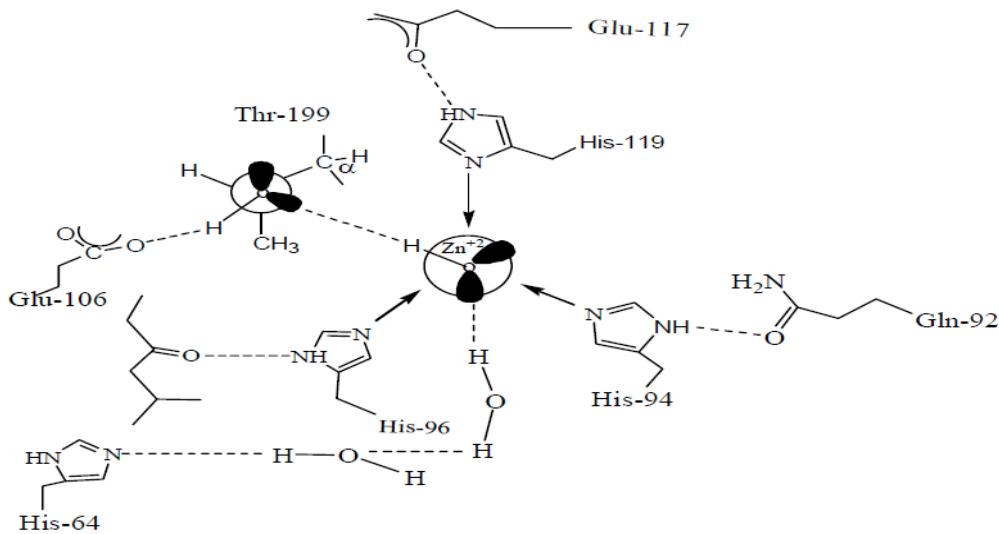
Şekil 2. A) CA II; aktif bölge yapısı, B) CA II; üç boyutlu yapısı

HCA I; 30 kDa büyüklüğüne sahip bir proteindir. Eritrositlerde, kolon epitelinde, göz lensi ve korneal epiteliumda bulunmakla birlikte, hücre içinde sitozolde yer alan HCA I çözünebilir karakterdedir. Eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir. Eritrositlerde HCA II 'ye göre beş kat daha fazla protein bulunmaktadır. Buna rağmen katalitik aktivitesi HCA II 'nin sadece %15 'i kadardır (Lowe vd., 1991; Sowden vd., 1992). CA izoenzimleri, yağ, üre, şeker hastalığı, tümör oluşumuna yol açan etkenler ve çok zehirli çeşitli patojenlerin gelişmesini içine alan

patolojik ve fizyolojik süreçlerle ilgili olan geniş bir enzim familyasıdır. Diüretikler ve antiglokom ilaçlarının yanı sıra, karbonik anhidraz inhibitörlerinin, yeni anti-obezite, anti-kanser ve antienfeksiyon ilaçları olarak kullanımındaki önemi son yıllarda yaygın bir biçimde vurgulanmaktadır ve yeni çalışmalar da CA aktivasyonunun Alzheimer Hastalığı için yeni bir tedavi olanağı sağlayabileceğini ileri sürmektedir. Karbonik anhidrazın etkinliği kapsamındaki inhibitörlerin ve aktivatörlerin yaygın bir hastalığa karşı yeni kullanımlara olanak sağlamasıyla bugün bazıları klinik denemelerde değerlendirilmektedir. Bu değerlendirme CA izoformlarıyla ilgili özgül düzenleyicilerin gelişme sürecini ön plana çıkarmıştır (Supuran, 2008).

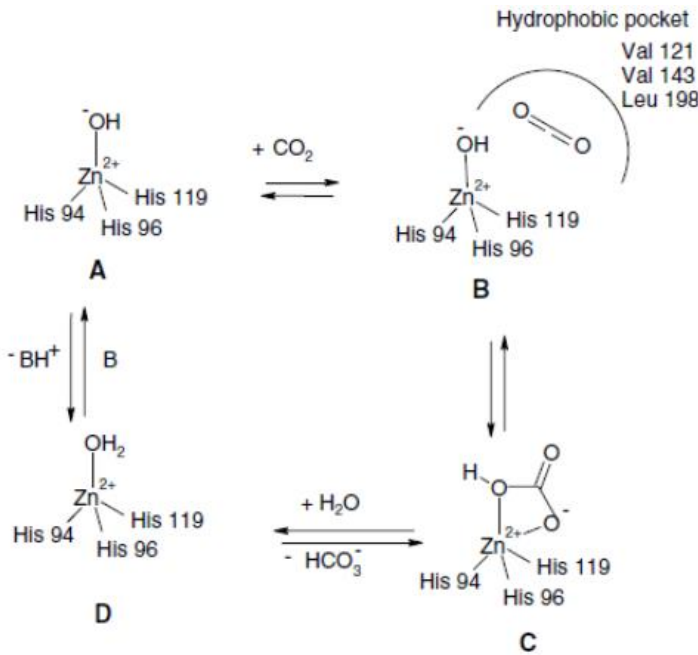
Kataliz yapabilmeleri için tüm α karbonik anhidrazların Zn (II) metal iyonuna gereksinimi olduğu görülmüştür ve Zn^{2+} iyonu aktif bölgeye 3 histidin (His 94, His 96, His 119) ile bir su molekülü/hidroksil iyonu ile bağlanmaktadır (Şekil 2) (Supuran ve Scozzafava, 2007).

Zn^{2+} iyonu içeren karbonik anhidraz enzimi, sorbitol dehidrogenaz yapısına benzemektedir. Zn^{2+} 'nin yetersizliğinin neden olduğu birçok metabolik bozukluklar ve sonuçları, Zn^{2+} içeren enzimlerin üretimiyle azalmaktadır. CA miktarını azalması, metabolik dengesizlik ve hastalıklara neden olmaktadır (Akıncıoğlu vd, 2013). Genel olarak ağır metaller; enzim ile ilişkili metalin yerini alması ya da karbonil, karboksil ve sülfidril içeren işlevsel gruplar ile enzimatik aktivitesini değiştirebilir.



Şekil 3. HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik gösterilişi (Tripp vd., 2001).

İnsan HCA-II izoenzimi üzerinde yapılan spesifik bölgenin mutasyonu ve X-ray kristalografisi çalışmalarında da, katalitik mekanizma oldukça ayrıntılı bir şekilde ortaya konulmuştur (Şekil 3) ve diğer izoenzimlerin mekanizmaları genellikle bu mekanizma ile aynı olmasına rağmen, bazı spesifik detaylarda farklı olabilmektedir. Karbonik anhidrazın yapısal olarak iki önemli özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Birincisi, aktif bölgede Zn^{2+} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu vardır. İkincisi, aktif bölgenin yakınında bulunan aminoasitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmişlerdir (Supuran ve Scozzafava, 2001).



Şekil 4. CA'nın katalitik mekanizması.

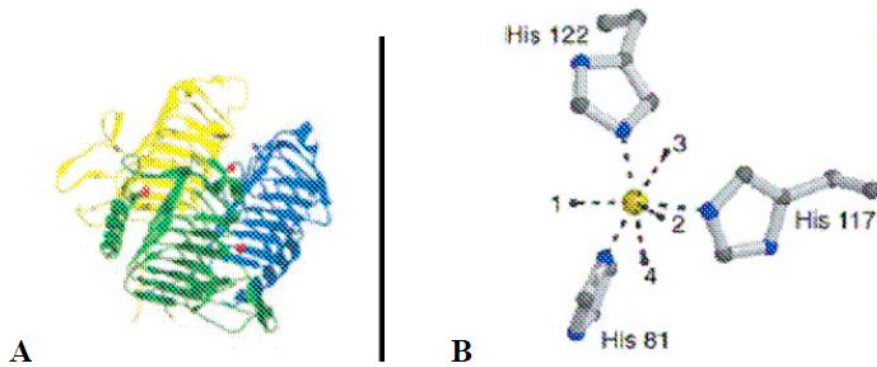
Aktif bölgede bulunan Zn^{2+} ile koordine olan su aynı anda Thr199'un hidroksil kısmı ile hidrojen bağı yapmıştır. Thr199 Glu 106'nın karboksilat kısmı ile de bağ halindedir. Bu durum Zn^{2+} ile koordine olan su molekülünün nükleofilik karakterini artırır. Böylece substratı olan CO_2 , nükleofilik atak için uygun yönlendirme olmuş olur (Şekil 4). CA'ların çoğu yaklaşık 30 kDa molekül ağırlığına sahip monomerler olarak aktif haldedir (Tripp vd., 2001).

1.3.1.2. β Sınıfı Karbonik Anhidraz

Canlı organizmalarda β CA' lar, α karbonik anhidrazlar kadar yaygın değildir. Bakterilerin çoğu, bazı archaealar, algler ve yüksek bitkilerin kloroplastları β sınıfına ait olan karbonik anhidrazları içine alır. β CA' lar ile α CA' ların arasındaki en önemli fark, β CA'ları genellikle 25-30 kDa molekül ağırlığına sahip, 2-6 kadar monomerlerden oluşan oligomer olmalarıdır (Supuran ve Scozzafava, 2001).

1.3.1.3. γ Sınıfı Karbonik Anhidraz

Bu CA sınıfı ilk kez archaebakterilerde keşfedilmiştir ve Zn^{2+} iyonu içeren γ CA' lar olduğu gibi, Co^{+2} içerenler de görülmüştür (Gilmour, 2010; Iverson vd, 2000). γ - CA sınıfını diğer sınıflardan ayıran farklı özellik vardır. γ monomeri, yaklaşık 70 kDa' luk molekül ağırlığına sahip homotrimer yapılar oluşturmak üzere etkileşmekte ve γ -CA'ların aktif bölgelerinin koordinasyonu oldukça farklı etki etmektedir. Üç histidin yapısı içeren metal bağlama bölgesi monomerik bir yapıya benzeyen bir tetrahedral geometrik yapıdadır. Koordinasyon geometrisi Zn içeren γ CA için üçgen bipiramid ve Co-substitüe enzim için oktahedraldir, (Şekil 5-A), diğer üçüncüsü ise (His117) başka bir monomere aittir (Şekil 5-B).



Şekil 5. A) *Methanosarcina thermophila* CA'sı, 69 kDa (homotrimer) B) γ -CA'nın aktif bölgesinde metal ligasyonu (Tripp vd, 2001).

Üç aktif bölge, monomerlerin yüzeylerine yerleşmişlerdir. Aktif bölge yüzeyde bulunmasına rağmen, γ CA'nın aktif bölge yapısı α CA'ninkine benzemektedir.

Katalitik mekanizması α sınıfı CA'ların mekanizmasına benzer olduğu tespit edilmiştir (Moroney vd., 2001; Iverson vd., 2000; Kisker vd., 1996).

1.4. Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Fonksiyonları

Karbonik anhidraz enzimi birçok fizyolojik olayda rol oynamaktadır. Bu enzim temel olarak CO₂'in ve HCO₃⁻'in birbirine dönüşümünü katalizler. Böylece solunumda, metabolizmada dokular ve akciğer arasındaki karbondioksit ve bikarbonat taşınımında, asit-baz dengesinde, çeşitli doku ve organlarda elektrolit sekresyonunda, lipogenez, ürejeniz gibi biyosentetik reaksiyonlarda, kemik rezorpsiyonunda, kireçlenme, tümör gelişiminde ve daha birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol alır (Supuran ve Scozzafa, 2007).

CA enziminin fizyolojik olaylarda yer aldığı en önemli olaylardan bazıları şunlardır;

- Asit-Baz dengesi,
- Kardiovasküler tonusun regülasyonu,
- Sindirim,
- Hücre bölümleri arasındaki iyon değişimi,
- Değişik enzimatik reaksiyon için gerekli bikarbonatın sağlanması

Enzim, hidrataz aktivitesi yanında esteraz aktivitesine de sahiptir, ancak fizyolojik açıdan hidrataz aktivitesi önemlidir. Bu sayede organizmanın asit-baz dengesinin düzenlenmesinde önemli rol üstlenir. Bu dengenin bozulduğu durumlarda, örneğin göz içi tansiyonunda, karbonik anhidraz enzim aktivitesine müdahale sıklıkla uygulanan bir tedavi yöntemidir. Bu açıdan CA inhibitörleri klinik olarak önemli bileşiklerdir.

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin biyolojik numunelerden izole edilmesinde, saflaştırılmasında ve karakterizasyonunda birçok kromatografik ve elektroforetik yöntem uygulanmıştır. Karbonik anhidrazın farklı izoformlarının farklı canlılardan ve dokulardan kromatografik ayrılmasında, uygulanan yöntemde farklılık arz etmektedir.

1.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

CA enzimi aktivitesinin birçok kimyasal madde ve ilaçlar tarafından inhibisyon ve aktivasyon etkileri bilim adamları tarafından araştırılmış ve literatürde rapor edilmiştir (Beydemir vd, 2000; Beydemir ve Gülçin, 2004; Supuran vd, 2001). CA enzimi birçok dokuda ilaçlar için hedef molekül olarak kabul edilmektedir ve bu ilaçların birçoğu hayvanlarda ve insanlarda CA'nın kuvvetli inhibitörü olarak bilinen sülfonamidin türevleridir.

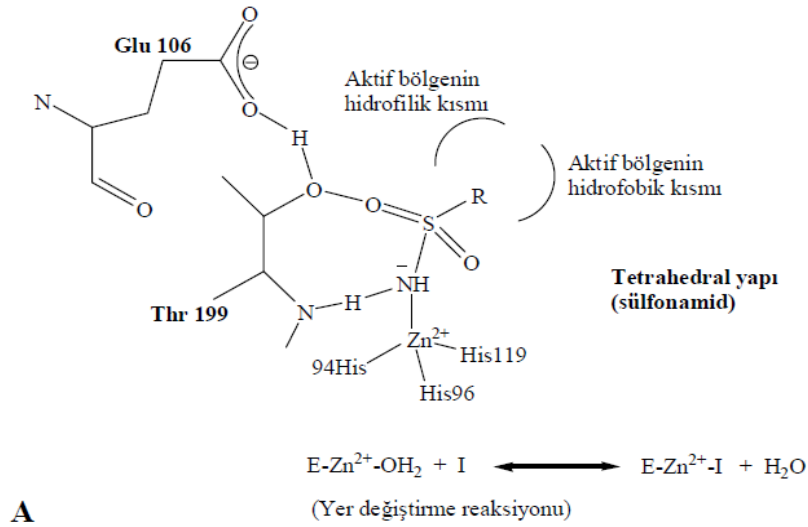
Karbonik anhidraz inhibitörleri iki grupta ele alınmaktadır. Birinci grup inhibitörler metaller ile kompleks yapmış anyonlardır. İkinci grup inhibitörler ise enzimin Zn^{2+} iyonuna bağlanan moleküllerdir (Esposito vd, 2000). İnorganik anyon ve katyonların, karbonik anhidraz enziminin inhibisyonu hakkında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

İnsan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimlerinin CO_2 hidrataz aktivitesinin Pb^{2+} , Ag^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} ve Cu^{2+} ağır metal iyonları tarafından inhibe edilmektedir. Se^{4+} ve Co^{2+} iyonları tarafından ise aktive edildiği belirlenmiştir (Roughton ve Booth, 1946).

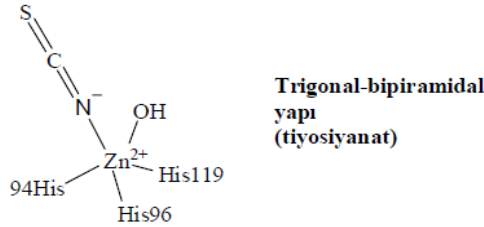
Karbonik anhidraz inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarıyla ortaya çıkarılmış ve bu çalışmalarda, CA enziminin katalizlediği mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları araştırılmıştır. Bu çalışmalarda çok çeşitli karbonik anhidraz enzimi için inhibitörler sentezlenmiştir. Bu inhibitörler başta glokom, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik hastalıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans (MRI) belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların geliştirilmesinde yol gösterici olarak kullanılmaktadır. Farklı karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgelerinin aydınlatılması, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine fırsat vermektedir (Winum vd., 2004; Franchi vd., 2003).

Asetozalamid, methazolamid ve sulfonamid türevleri kırk yıldır glukomada (göz tansiyonu) intraselüler basıncın düşürülmesinde kullanılmaktadır. Asetazolamid, methazolamid, sulfanilamid, diklorofenamid gibi inhibitörler bikarbonat konsantrasyonunu azaltırlar, suyun ve Na^+ nun posterior kısma akışı olur ve bu da sulu ortamın azalmasına, intraoküler basıncın azalmasına neden olur. Bu maddelerin ortak özelliği aromatik halkalarına bağlı bir serbest sulfonamid ($-\text{SO}_2 \text{NH}_2$) grubudur ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyonuna neden olurlar. Glukomada CA II inhibitörü olarak kullanılan ilaçların istenmeyen yan etkileri daha etkili sulfanamid türevlerinin sentezine zorlamıştır (Becker, 1954). Mitokondrial CA VA ve CA VB nin inhibitörleri antiobesite ajan olarak da kullanılmaktadır. CA IX ve CAXII inhibitörleri kanser tedavisinde kullanılmaktadır.

Karbonik anhidrazın en önemli inhibitörü olan sülfonamidler, çinko iyonuna tetrahedral geometri şeklinde bağlanarak sülfonamidin azot atomu Zn^{2+} iyonu ile koordine olur. Thr 199 ve Glu 106 yapıları hidrojen bağları ile inhibitörün metal iyonuna bağlanmasına katılırlar. İnhibitörün bağlanmasına diğer bir katkı da, aromatik/heteroaromatik kısmın aktif bölgenin hidrofilik ve hidrofobik aminoasitleri ile etkileşimi sonucu sağlanır (Şekil 6). Anyonlar metal iyonunun hem tetrahedral geometrisinde hem de trigonal-bipiramidal şekilde bağlanabilirler (Supuran vd., 2004).



A

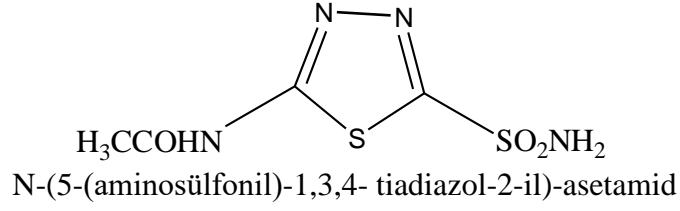


B

Şekil 6. Karbonik anhidrazın inhibisyonunun mekanizması. A-sülfonamid ile, B-anyonik inhibitörler ile (Supuran vd., 2004).

1.5.1. Asetazolamid

Asetazolamid, karbon dioksidin hidrasyonu ve karbonik asidin dehidrasyonunu içeren geri dönüşümlü reaksiyonu katalize eden enzim olan karbonik anhidraz üzerinde spesifik olarak etkili olan enzim inhibitörüdür (Şekil 7). Akut konjestif glokomun pre-operatuar evresinde, konjestif kalp yetersizliği ve ilaçlarla oluşan sekonder ödemlerin tedavisinde kullanılır. Bununla birlikte, epilepsi tedavisinde diğer ajanlarla birlikte yardımcı olarak ve akut yükseklik hastalığında semptomların önlenmesi ve iyileştirilmesinde endikedir. Asetazolamid tedavilerde diüretik olarak da kullanılır. Diüretik etkilerinden çok, başka farmakolojik etkileri için de kullanılır, çünkü loop diüretikleri ve tiazitler asetazolamidden daha efektiftir. Kullanım alanları, glokom tedavisi (aqueous humorun üretimini azaltır), epilepsi, yükseklik hastalığı, idrarın alkalileştirilmesi ve metabolik alkalozdur (URL-1, 2017).

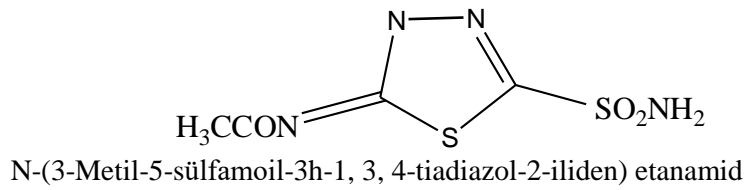


Şekil 7. Asetazolamid.

En sık gözlenen yan etkiler: baş ağrısı, ateş, susuzluk, halsizlik, bitkinlik, yüz kızarması, çocuklarda büyüme geriliği, gevşek paralizi, anafaksi, mide bulantısı, kusma, diyare, vücutta yayılan kırgınlık hissidir. Uzun süreli tedavilerde asetazolamidler böbrek taşı oluşumuna da neden olmaktadır (URL-2,2017).

1.5.2. Metazolamid

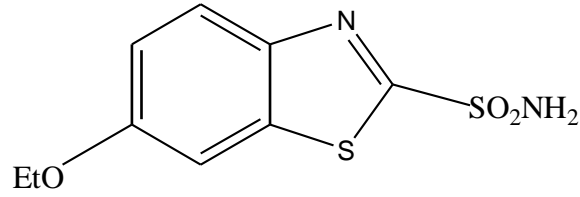
Sülfonamid türevi olan ve muhtemel antineoplastik aktiviteye sahip CA inhibitörüdür. Metazolamid, asetozalamide göre serum proteinlerine daha az bağlanır ve etki süresi daha uzundur. Tümör ilişkili karbonik anhidraz IX'u inhibe ederek hipoksiya tümörlerinde artan hücre ölümü ile sonuçlanabilir. Hipoksiya indükleyici bir transmembran glikoprotein olarak CA IX CO₂ ve suyun bikarbonat ve protona hızlıca dönüşmesini katalizler ve bikarbonat iyonları, tümör mikro çevresinin asitleştirmesini sürdürmek için yardım eder ve bazı hipoksiya tümörlerinde sitotoksik tedavilere karşı direnç geliştirir (Şekil 8) (Işık., 2008; URL-3, 2017).



Şekil 8. Metazolamid.

1.5.3. Etokszolamid

Etokszolamid CA inhibitörü olarak görev yapan bir sülfonamid ilacıdır. Glokom, ülser tedavilerinde ve diüretik olarak kullanılır. Ayrıca, epilepsinin bazı formlarının tedavisinde de kullanılır. Etokszolamid su, sodyum, potasyum ve bikarbonatın reabsorpsiyonunu azaltmak amacıyla proksimal renal tübüllerdeki karbonik anhidraz aktivitesini inhibe eder (Şekil 9) (URL-10, 2017).

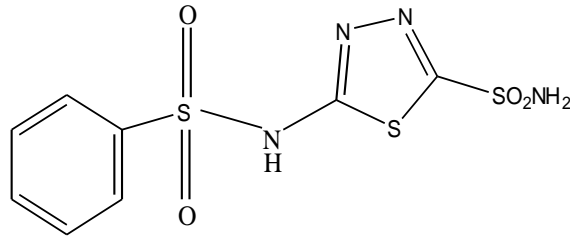


6-etoksibenzotiazol-2-sülfonamid

Şekil 9. Etokszolamid.

1.5.4. Benzolamid

Benzolamid bir karbonik anhidraz inhibitörüdür. Başlıca eritrositlerde bulunan bu inhibitör, solunum yetmezliği durumlarında kullanılabilir. CA-II' de en aktif olan izoenzimlerin bir dizi halinde bulunur (Şekil 10) (Supuran vd., 2004).

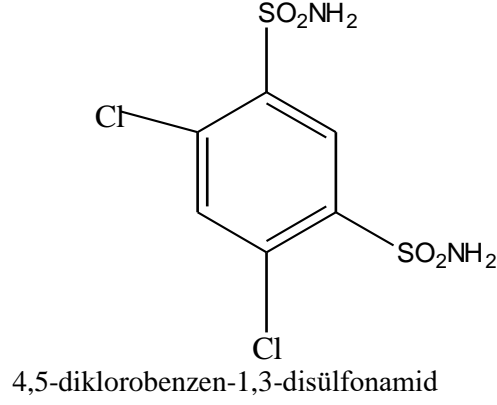


5-Benzensulfonilamino-[1,3,4]tiadiazol-2-sülfonik asit amid

Şekil 10. Benzolamid.

1.5.5. Diklorfenamid

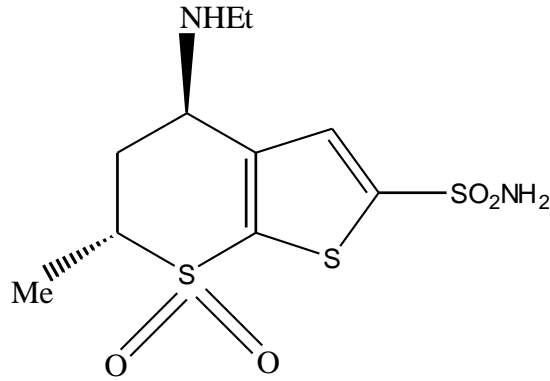
Sülfonamid türevi bir karbonik anhidraz inhibitörüdür (Şekil 11) (Işık, 2008; URL-4, 2017).



Şekil 11. Diklorfenamid.

1.5.6. Dorzolamid

Dorzolamid bir karbonik anhidraz inhibitörüdür. Bu bir anti-glukom ajandır ve aqueous humour üretimini azaltır. % 2'lik bir çözelti biçiminde topikal oftalmik olarak uygulanır (Şekil 12) (URL-11, 2017).

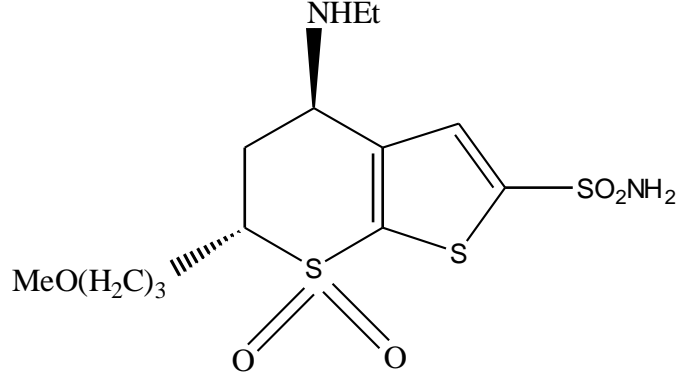


4-Etilamino-6metil-7,7-diokso-4,5,6,7-tetrahidro-7λ⁶-thieno[2,3-b]tiopiran-2-sülfonamid

Şekil 12. Dorzolamid.

1.5.7. Brinzolamid

Oküler hipertansiyon veya glukoma sahip hastalarda göz içi basıncını düşürmek için kullanılan bir karbonik anhidraz inhibitörüdür (Şekil 13) (URL-12, 2017) .

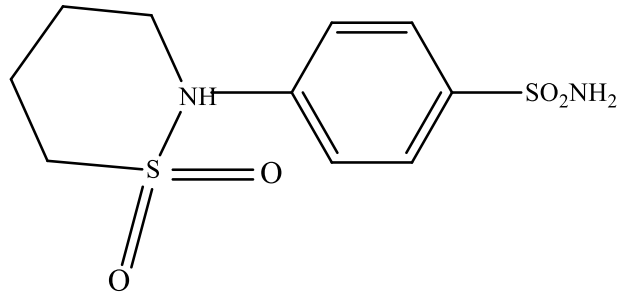


(5R)-5-etilamino-3-(3-metoksipropil)-2,2-diokso-2λ6,9-ditia-3-azabisiklo[4.3.0] nona-7,10 dien-8-sülfonamid

Şekil 13. Brinzolamid.

1.5.8. Sulthiam

Sulthiam bir sülfonamiddir ve karbonik anhidraz enziminin inhibitörüdür. Antikonvülzan olarak kullanılmaktadır. Sulthiam kısmi felç tedavisinde kullanılmıştır. Temporal lob epilepsilerinde özellikle sulthiam duyarlılık göstermektedir. Bugün, Almanca konuşulan ülkelerde ve İsrail'de (örneğin iyi huylu rolandik epilepsi gibi) çocukluk çağında görülen iyi huylu epilepsi tedavisi için tercih edilen ilaçtır (Şekil 14) (URL-5, 2017).



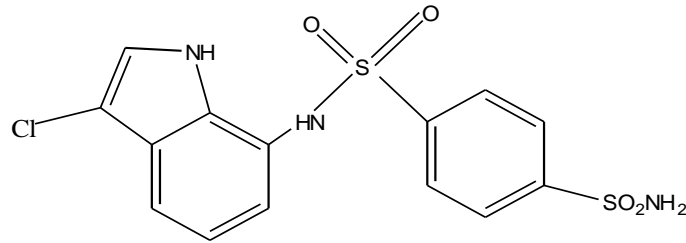
4-(1,1-dioksotiazinan-2-il) benzensülfonamid

Şekil 14. Sulthiam

En sık görülen gözlenen yan etkiler; yüz ve bacaklarda kaşıntı, solunum güçlüğü, ataksi ve iştahsızlık hissidir. Az gözlenen yan etkiler ise; baş dönmesi, döküntü, Stevens-Johnson sendromu, bulantı, kilo kaybı, lökopeni, baş ağrısı, psişik değişiklikler, depresyon, salya akması, artan ağrı, uykusuzluk hissi görülmektedir. Uzun süreli kullanımlarda kalsiyum ve D vitamini metabolizması ile ilgili düzensizliklerin ortaya çıktığı gözlenmiştir.

1.5.9. İndisulam

Indisulam bir karbonik anhidraz inhibitörü ve antitümör inhibitörüdür. Klinik olarak geliştirilmekte olan katı tümörlerin tedavisinde kullanılan bir sülfonamid antikanser ajanıdır. İndisulam hücre döngüsünü G1 fazında tutar. Çoğu fizyolojik süreçte görev alan önemli bir enzimdir. Yapılan kanser çalışmalarında karbonik anhidrazı inhibe ettiği ve belirgin bir şekilde en az 60 tane transkriptin ekspresyon seviyesini değiştirdiği tespit edilmiştir (Şekil 15) (Supuran, 2003).



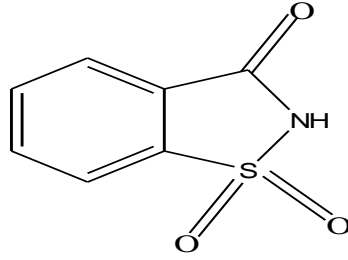
4-(1,1-dioksotiazinan-2-il) benzensülfonamid

Şekil 15. Indisulam

1.5.10. Sakarin

Temel maddesi benzoik sülfinit olan sakarin, sakarozdan daha tatlı olup, özel izne bağlı olarak içki, şekerleme, ilaç ve diş macunu gibi ürünlerde tat vermek için kullanılır. Raf ömrü gıda maddelerinde yaklaşık 6 ay, ilaçlarda ise 2 yıl kadardır. Besin hazırlama ve depolamaya dayanıklıdır. Yüksek sıcakta pişirme, acımsı metalik bir tat oluşturabilir Günümüzde sakarin kullanımı oldukça yaygınlaşmış olup birçok yerde kullanılmaktadır. Reçeller, sakızlar, unlu gıdalar, konserveler, şekerlemeler ve tatlı sosları başta olmak üzere bunlar dışında kozmetik ürünlerde, ilaçlarda, vitaminlerde de

kullanılmaktadır. Ayrıca sofratlandırıcısı olarak da birçok marka adı altında kullanıma açıktır (Şekil 16) (URL-6, 2017).

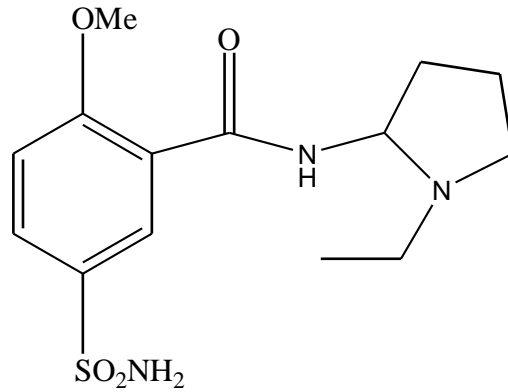


1,1-Diokso-1,2-benzotiazol-3-on

Şekil 16. Sakarin

1.5.11. Sulpirid

Sulpirid genellikle şizofreni veya psikoz gibi hastalıkları olan insanların tedavisine yardımcı olmak için kullanılan ve “tipik antipsikotikler” adı verilen ilaç grubuna aittir. Şizofreni veya psikozu olan hastalarda genellikle pozitif ve negatif olmak üzere iki gruba ayrılan farklı semptomlar görülebilir. Yapısı kimyasal olarak amisülpiridine benzer (Şekil 17) (URL-7, 2017).

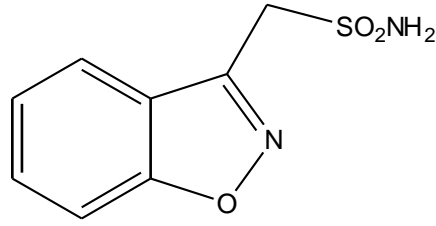


N-[(1-etilpirrolidin-2-il)metil]-2-metoksi-5-sülfamoil-benzamid

Şekil 17. Sulpirid

1.5.12. Zonisamid

Zonisamid, kısmi başlangıç nöbetleri olan erişkinlerde tedavide yardımcı olarak kullanılmak üzere onaylanmış bir sülfonamid antikonvülzandır. Bipolar depresyon, obezite, Parkinson hastalığı, epilepsi hastalıklarında da kullanılmıştır (Şekil 18) (URL-8, 2017).

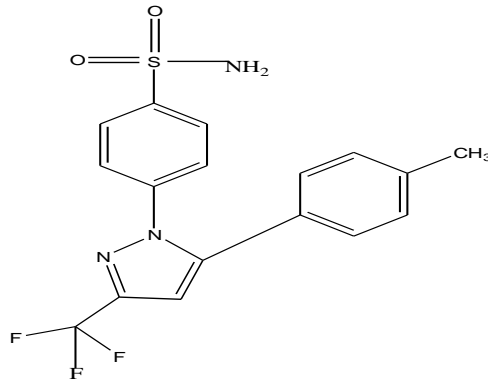


1,2-benzisokazol-3-metansülfonamid

Şekil 18. Zonisamid

1.5.13. Selekoksib

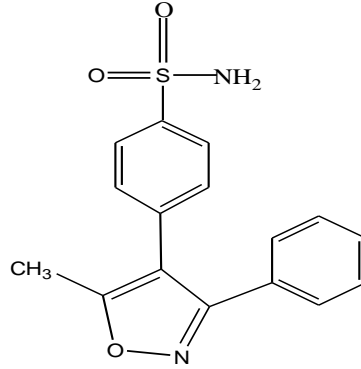
Selekoksib, COX-2 inhibitörü antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretikdir. Osteoartrit belirti ve semptomlarının tedavisinde, yetişkinlerde romatoid artrit belirti ve semptomlarının tedavisinde kullanılır. Yetişkinlerde akut ağrının giderilmesinde ve primer dismenorenin tedavisinde endikedir. Ayrıca, iki yaşından itibaren ve 10 kg'dan fazla ağırlığında juvenil romatoid aritri sahip olan çocuklarda kullanılabilir (Şekil 19) (URL-9, 2017).



4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il]benzensülfonamid
Şekil 19. Selekoksib

1.5.14. Valdekoksib

Valdekoksib, non-steroid sınıfında olan anti-enflamatuar ilaçtır ve seçici siklooksijenaz-2 inhibitörüdür. Osteoartrit, romatoid artrit ve ağrılı adet ve adet semptomlarının tedavisinde kullanılır (Şekil 20) (URL-13, 2017).

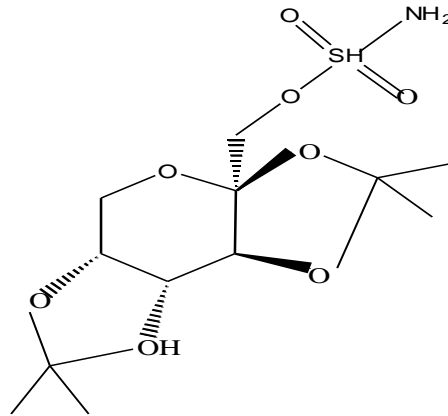


4-(5-metil-3-fenilisoksazol-4-il)benzensülfonamid

Şekil 20. Valdekoksib

1.5.15. Topiramate

Epilepsi tedavisinde ve migren profilaksisinde etkili olduğu gösterilen sülfamat sübstitüsyonlu monosakkarid türevi bir ajandır. Çocuklarda Lennox Gastaut sendromu, nöbetler ve gelişimsel gecikmeye neden olan bir rahatsızlığın tedavisi için de endikedir (Şekil 21) (URL-14, 2017).



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

Şekil 21. Topiramate

1.6. Mezgıt Balıklarının Genel Özellikleri

Mezgit balığı, ılıman ve soğuk denizlerde, Atlas okyanusunda, yurdumuzun bütün denizlerinde yaşayan bentik bir türdür (Şekil 22). Genellikle, 20-50 cm uzunluğunda yassı, ince derili ve yumuşak pulludur. Çeşitleri; Akdeniz Manş denizi, Atlas Okyanusu ve Kuzey Denizde rastlanan 4 türü vardır. Bayağı mezgit ve sarı mezgit en bilinenleridir. Kemikli balıklar takımının, Mezgitgiller familyasından (Gadidae), orta boylu, yumuşak vücutlu bir balıktır. 30-300 m arasındaki derinliklerde yaşarlar (Aydın vd., 2008; URL-15, 2017).



Şekil 22. Mezgıt balıklarının (*Merlangius euxmus*) görünümü

Anavatanları Atlas Okyanusu olup Atlas Okyanusu ile irtibatlı denizlerde, yurdumuzda ise bütün denizlerde bulunur. Kış aylarında kuvvetli akıntı sebebiyle Karadeniz'den Marmara'ya sürüler halinde göç ederler. İnce uzun gövdeli bir balık olan mezzitin boyu çeşitlerine göre 20-50 cm arasında değişir. Ağırlığı 1-2 kilogramı bulanları vardır. Sırtında üç, karnında iki yüzgeç bulunur. Kuyruk yüzgeci az çatallı, yüzgeçleri dikensiz, gözleri iricedir. Bilinen dört türü vardır ve renkleri türlere göre değişiklik göstermekle beraber umumiyetle sırtları sarımsı kahverengi, karnı altın sarısı benekli, yanları pembe-mor renkli olup renkler çok parlaktır. Öldükten sonra zamanla bu parlaklık kaybolur. Göğüs yüzgeçlerinin dibinde bulunan birer siyah leke de mezzite

has bi özelliğidir. Geniş ağızlı olup, ağızındaki dişleri kuvvetlidir. Bazılarının alt çenesinde bir bıyık teli bulunabilir. Dişi mezigitler erkeklerine nazaran daha iri olup, vücut kalınlıkları da erkeklerinden fazladır (Aydın vd., 2008; URL-15, 2017).

Mezgit, sürüler halinde yaşar. Deniz dibine yakın ve deniz dibinin çamurlu veya kumlu olduğu yerlerde besinlerini ararlar. Üremeleri, kasım-mayıs ayları arasında 30 m derinlikteki sularda bıraktıkları yumurtalarla olur. Büyük sürüler halinde kıyıya yakın yerlerde çiftleşirler. Yumurtlamak için yine sürüler halinde ılık denizlere göç ederler. Bir dişi mezgit, yaklaşık 200.000 yumurta yumurtlar. Yumurtaların bırakılmasından sonra büyük sürüler, küçük gruplara ayrılarak beslenme dönemine geçerler (Aydın vd., 2008; URL-15, 2017).

1.7. Hamsi Balıklarının Genel Özellikleri

Hamsi (*Engraulis encrasicolus*), Engraulidae familyasına ait bir balık türüdür. Hamsi adı arkaik Kolh dili kökenlidir ve orijinal prototipi "Küçük Sivri Balık" anlamındadır. Vücut ip şeklinde hafif yassılaşmış olup yanlarda yuvarlaktır. Alt dudak mevcut değildir, üst çene ise uzun olup, sırt rengi koyu mavi siyahımsı, alt taraf açık renklidir. Yan tarafları parlaktır. Kuyruk yüzgeci homoserk yapıdadır. Karadenizin insan yaşamıyla birleşen balığıdır (Satılmış ve Bat, 2010).

Marmara Denizinde de bulunur. Sürüler halinde yaşar ve 18 cm'e kadar büyür. Ocak-Mart ayları arasında beslenmek için sahillere yaklaşır. Gündüzleri 30-40 m. derinlerde, geceleri yüzeye yakınlarda dolaşır. 1 yaşından itibaren olgunluğa erişip 18°-20 °C sularda, 25-60 m. derinliklerde ve az tuzlu sularda üreyip yaklaşık 40.000 yumurta döker. Ömürleri 4 yıl kadardır (Satılmış ve Bat, 2010; Zehiroğlu, 2014).



Şekil 23. Hamsi balıklarının (*Engraulis encrasicolus*) görünümü

Hamsi, genellikle bütün tropik ve subtropik denizlerde yaşayıp, kıyı kesimlerinde sürüler oluşturuyorlar (Şekil 23). Hatta zaman zaman nehir deltalarında da görülebiliyorlar. Hamsi özellikle Karadeniz ve Azak Denizinde bol miktarda bulunan bir balık türüdür. Bu balığın Karadeniz’deki türleri, *Engraulis encraicolus* ve *Engraulis encrasicolus maeticus*dur (Satılmış ve Bat, 2010).

Hamsi, planktonla beslenen bir balıktır. Beslediği organizmaları, *Calanus cinsi* Copepoda (Kürekayaklılar), *Cirripedia* (Dolaşıkayalılar) ve *Mollusca* (Yumuşakçalar) larvaları oluşturuyor. Hamsi, aynı beslenme basamağında olan çaça, tirsi, sardalya, taraklılar ve medüzler gibi diğer organizma ve organizma grupları ile aynı besin maddesi için yarışır (Satılmış ve Bat, 2010).

Sürüler Mart’ta Türkiye kıyılarındaki kışlama alanından kuzeydeki beslenme ve üreme alanına göçe başlarlar. Nisan ortasından Ekim’e kadar tüm denize yayılmış olan hamsi özellikle Karadeniz’in kuzey kesiminde bulunur. Sıcaklık ve iklimsel değişmelere bağlı olarak genellikle Kasım’da güney göçü başlar. Güneye göçün başlama zamanları ile göçün şiddet ve miktarlarında yıldan yıla önemli farklılıklar söz konusudur. Hamsi kuzey-güney-kuzey göçünde ya kıyıyı izler ya da doğrudan denizi karşıdan karşıya geçer (Satılmış ve Bat, 2010).

Karadeniz hamsisi cinsel olgunluğa bir yılda ulaşır. Mayıs-Eylül ayları arasında 10 ve daha çok batıda yumurtlama gerçekleşir. Bir yaşındaki genç balıklar ilk kez yumurtlama sezonunun sonuna doğru yumurta bırakırlar. Bireysel ortalama doğurganlık 42.000 yumurta olarak bulunmuştur (Zehiroğlu, 2014).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

2.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan alet, cihazlar ve markaları

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

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan çözeltiler taze hazırlandı ve buzdolabında +4 °C’de muhafaza edildi. Kullanılan çözeltilerin konsantrasyonları, hazırlanış şekilleri ve ne amaçla kullanıldıkları Tablo 4’ de verildi.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanıldığı yerler

Çözelti adı	Hazırlanışı	Kullanıldığı Yer
1 M Tris-SO ₄ , pH 7,2-9,1	30,02 g Tris 100 mL saf suda çözüldü ve pH’sı 1 M H ₂ SO ₄ ile istenen pH ya ayarlandı.	Esteraz aktivitesinde ve pH çalışmasında
0,2 M NaHCO ₃ , pH 8,8	8,2 g NaHCO ₃ 200 mL saf suda çözüldü ve 1 N NaOH ile pH’sı ayarlandı, 500 mL’ye tamamlandı.	Sepharoz-4B matriski üzerinde afinite jeli hazırlanırken
25 mM Tris-HCl/0,1 M Na ₂ SO ₄ , pH 8,7	1,51 g Tris ve 7,10 g Na ₂ SO ₄ , 250 mL saf suda çözüldü ve 1 M HCl ile pH’sı ayarlanıp 500 mL’ye tamamlandı.	Afinite jeli dengelenmesinde
25 mM Tris-HCl/ 22 mM Na ₂ SO ₄ , pH 8,7	1,5 g Tris ve 1,56 g Na ₂ SO ₄ saf suda çözüldü, 1 M HCl ile pH ayarlandı ve 500 mL’ye tamamlandı.	Hemolizati tatbikatından sonra afinite jelinin yıkanmasında
0,1 M NaCH ₃ COO/ 0,5 M NaClO ₄ , pH 5,6	3,40 g NaCH ₃ COO.3H ₂ O ve 15,25 g NaClO ₄ 150 mL saf suda çözüldü ve 1 M HCl ile pH’sı ayarlandı 250 mL’ye tamamlandı.	Afinite kolondan enzimin elüsyonu için
% 0,9 NaCl	4,5 g NaCl alınıp saf suyla 500 mL’de çözüldü.	Eritrosit homojenatının yıkanmasında
%30’luk Akrilamid Çözeltisi	29 g Akrilamid’in 25 mL’deki çözeltisiyle 1g N,N’-metilenbisakrilamid’in 25 mL’deki çözeltileri birbirine karıştırılarak karışımın hacmi deiyonize suyla 100 mL’ye tamamlandı. Çözelti koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklandı.	SDS PAGE
1,5 M Tris-HCl Tamponu (pH 8,8):	181,7100 g Trizma bazı 800 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH’ı 8,8 olacak şekilde ayarlandı ve hacmi 1000 mL’ye tamamlandı.	SDS PAGE
1,0 M Tris-HCl Tamponu (pH 6,8):	121,140 g Trizma bazı 800 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH’ı 6,8 olacak şekilde ayarlandı ve hacmi 1000 mL’ye tamamlandı.	SDS PAGE

Tablo 4 (devamı). Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanıldığı yerler

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

Tablo 4 (devamı). Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanıldığı yerler

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

Tablo 4 (devamı). Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanıldığı yerler

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

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Mezgit ve Hamsi Balıklarının Temini

Bu çalışmada kullanılan mezgit balığı ve hamsi balığı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne şoklanmış bir şekilde getirilerek, -70 °C'de muhafaza edildiler.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaç Homojenatlarının Hazırlanması

Solungaçlar neşter yardımıyla zedelenmeden dikkatlice alınarak kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için % 0,9'luk NaCl ile 3 defa yıkandı. Her iki balıktan da elde edilen solungaçlar, 3 mL/g olacak şekilde 25 mM Tris HCl/0,1 M Na₂SO₄ (pH= 8,7) tampon çözeltisinin içinde blender ile parçalanarak homojenize edildi. Elde edilen solungaçlar sıvı azot içinde 5 dakika bekletildikten sonra tekrar çözününceye kadar oda sıcaklığında bekletildi. Homojenatlar buz banyosu içinde 5 şer dakika olmak üzere sonikasyona tabi tutuldular ve elde edilen süspansiyonlar 60 dakika 14500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanıldı (Wistrand., 2002; Pullan ve Noltmann., 1985).

2.2.2. Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarından CA Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları İle İlgili Yöntemler

2.2.2.1. Sepharose-4B Afinite Kolonunun Hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi ile hazırlanır. Bu dolgu materyaline L-tirozin kovalent olarak takılmış olup sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlenmiştir. Bu durumda tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmı oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik inhibitörü olup afinite jelinin yapısına girerek enzimin yüksek oranda saflaştırılmasına yardımcı olmaktadır (Arslan vd.,1996).

CNBr ile aktivite edilmiş olan Sepharose-4B matriksi üzerinde enzimin ligandı takıldı. Matrikse önce L-tirozin spacer arm (uzatıcı kol) takılır ve daha sonra sülfanilamid ise ligand olarak takıldı. Sülfanilamid CA'nın spesifik bir inhibitörü olup jelin yapısına bağlanarak enzimle yüksek oranda etkileşimi sağlamak ve enzimin saflaştırılmasında en çok kullanılan yöntem olarak da bilinmektedir (Bülbül vd.,2003).

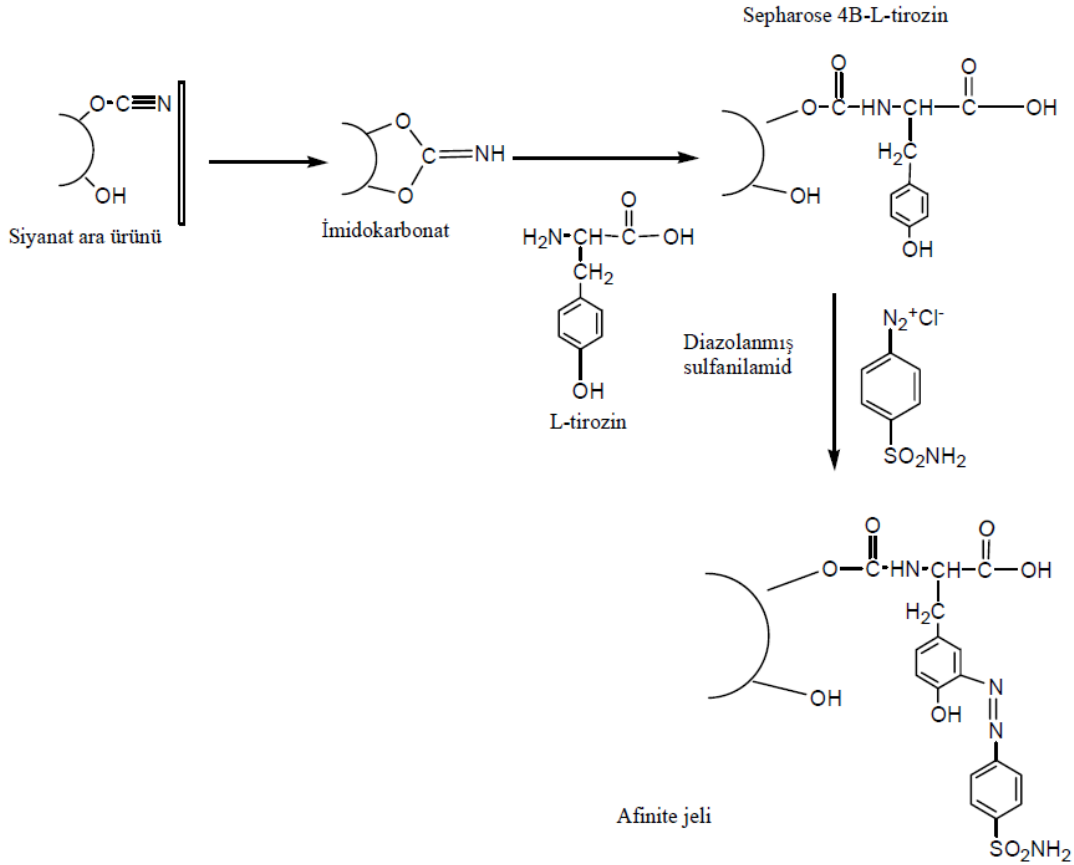
2.2.2.1.1. CNBr ile Aktive Edilmiş Sepharose 4B'ye L-Tirozin Takılması

Ticari olarak satın alınan CNBr ile aktifleştirilmiş 5 g Sepharose 4B, 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. 80 mg tirozin soğuk NaHCO₃ tamponunun 20 mL'sinde çözüldü ve behere ilave edildi. Yıkama, tirozin ilavesi ve karıştırma işlemleri çok hızlı olarak, 90 saniyeden fazla olmayacak şekilde yapıldı ve 4 °C' de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 16 saat 4 °C' de bekletildikten sonra bağlanmayan tirozinlerin uzaklaştırılması amacıyla pH:8,8 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar yıkama yapıldı. Böylece tirozin takılı jel elde edildi. Tirozin takılı jel aynı tamponun içine alınıp saklandı.

2.2.2.1.2. Sülfanilamid Kenetlendirilmesi

25 mg sülfanilamid, 0°C' de (buz banyosunda) 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü ve içine damla damla soğuk 75 mg NaNO₂ bulunan 5 mL sulu çözelti ilave edildi. 10 dakikalık reaksiyonun gerçekleşmesinden sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH 9,5'a çıkartılarak sabit tutuldu ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Süspansiyon daha sonra Buchner hunisinden süzüldü, önce 1 L saf su sonra 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) tamponu ile yıkandı. Bu işlemler sırasında jelin tamamen kurumamasına dikkat edilmelidir.

Jel, yıkamaları takiben aynı tampon içersine alınarak kolona yüklenene dek +4°C' de bekletildi (Şekil 24) (Söyüt., 2006).



Şekil 24. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların açık formülleri (Söyüt vd., 2006).

2.2.2.2. Mezgıt ve Hamsi Balıklarının Solungaç Homojenatlarının Afinite Kolonuna Sırasıyla Tatbiki ve Elüsyonu

Sülfanilamid ile kenetlenmesi yapılan afinite jelinin üst kısmındaki çözelti dekante edilerek uzaklaştırılır ve jele dengeleme tamponu (25 mM Tris/0,1 M Na₂SO₄, pH 8,7) ilave edilir. Alt ucunda camdan oluşmuş süzme sistemi bulunan kolona dengeleme tamponu dolduruldu ve peristaltik pompa çalıştırılarak boruların tamponla dolması sağlandı. Tüm işlemler sırasında kolonun dış kısmına soğuk buz torbası bağlanmak suretiyle kolonun sıcaklığının yükselmemesine dikkat edildi. Sonra kolonun üst kısmı kapatılarak borunun ucu dengeleme tamponuna daldırılarak boru sisteminin tamponla dolması ve hava kabarcığının kalmaması sağlandı. Daha sonra peristaltik pompa dönüş hızı, 20 mL/saat olacak şekilde ayarlandı ve borunun ucu jel süspansiyonu içine daldırılarak jel kolona yavaşça yüklendi. Kolonun paketlenmesi esnasında jelde kabarcık ve çatlak oluşmamasına özen gösterildi. Jelin kolona tatbikini takiben jel dengeleme tamponu ile 24 saat dengelemeye bırakıldı. Bu sırada elüat akış hızı yine 20 mL/saat olarak sabitlendi.

Mezgit ve hamsi balıklarının solungaç homojenatları ayrı kolonlarda, aynı işlemler yapılarak, dengelenmiş kolona tatbik edildi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra sistemden yıkama tamponu geçirilerek homojenattan kaynaklanan ve istenmeyen bileşikler kolondan uzaklaştırıldı.

Kolona tutturulmuş karbonik anhidraz enziminin afinite kolonundan elüsyonu için (Aslan vd., 1996) tarafından kullanılan CA II elüsyon çözeltisi 0,1 M CH₃COONa/ 0,5 M NaClO₄, pH 5,6 tatbik edilmiştir. 20 mL/saatlik akış hızında elüatlar 5'er mL'lik fraksiyonlar halinde bir fraksiyon toplayıcı yardımıyla alındı. Elüatlarda tek tek hidrataz aktivitesi gözlemlenemediği için birleştirilerek amicon ultrafiltrasyon membranı (10.000 MWCO) kullanılarak 4.000xg'de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu ile yıknarak tampon değiştirildi ve enzim çözeltisi aynı tamponun 5 mL'si ile çözülerek hazırlandı.

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

Mezgit ve hamsinin solungaç homojenatlarının Sepharose 4B afinite kolonu ile karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılmasından sonra sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli (1970), tarafından açıklandığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi.

CA enziminin saflaştırma derecesinin belirlenmesi ve yaklaşık olarak moleküler ağırlığının belirlenmesi için % 12'lik SDS-poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) uygulandı (Laemmli, 1970). Ayırma Jeli (toplam hacim 20 mL) 6,6 mL deiyonize su, 8,0 mL %30'luk akrilamid çözeltisi, 5 mL 1,5 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8), 0,2 mL %10'luk SDS çözeltisi, 0,2 mL %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0,008 mL TEMED karışımının hazırlanmasıyla elde edildi. TEMED ilave edildikten sonra karışım hızlı bir şekilde karıştırılarak bir şırınga yardımıyla levhalar arasına aktarıldı ve jelin üst yüzeyi düzgün olması için üzerine dikkatlice su ilave edildi. Polimerizasyonun tamamlanması için 30 dakika beklendi. Ayırma jelinin donmasından sonra yükleme jeli hazırlanıp levhaya tatbik edildi. Yükleme jeli (toplam hacim 5 mL) 3,4 mL deiyonize su, 0,83 mL %30'luk akrilamid çözeltisi, 0,63 mL 1,0 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8), 0,05 mL %10'luk SDS çözeltisi, 0,05 mL %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0,005 ml TEMED karışımının hazırlanmasıyla elde edildi. TEMED ilave edildikten sonra karışım hızlı bir şekilde karıştırılarak bir şırınga yardımıyla levhalar arasına aktarıldı ve kuyucukları oluşturmak üzere tarak yerleştirildi. Jelin donmasından sonra tarak yerinden çıkarılarak, birkaç kez jel dikkatlice saf suyla temizlendi. Hazırlanan jel Elektrofrez düzeneğine yerleştirilerek, yürütme tamponu ilave edildi. Protein standardı ve numuneler eşit hacimlerde tamponla muamele edilip 3 dk kaynar su banyosunda bekletildikten sonra kuyucuklara bir Hamilton şırıngasıyla aktarıldı. Elektrofrez düzeneği bir güç kaynağına bağlanarak, kuyucuk başına 2 mA akım uygulanacak şekilde güç kaynağı ayarlandı. Jel, Comomassie Brilliant Blue R250 boyası ile 3 saat oda sıcaklığında boyandı. Jel yıkama çözeltisi ile birkaç kez muamele edilerek bantların belirlenmesi sağlandı ve jel % 20 gliserol içeren saf su içinde saklandı.

2.2.4. Kantitatif Protein Tayini

Protein miktarı Lowry yöntemi ile yapıldı (Lowry vd., 1951). 10 µL kültür ekstraktı 490 µl 0,1 N NaOH, %0.1 sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren çözelti ile 500 µL ye seyreltilerek bazikleştirildi. Bu karışıma, eşdeğer oranlarda karıştırılmış %2 Na₂CO₃'ın 0,1 N NaOH içerisindeki çözeltisi (12,5 mL) ve %2 sodyum-potasyum tartaratın %1 lik CuSO₄'daki çözeltisinden (0.25 mL) 1 ml ilave edildi ve 5-10 dakika çözeltinin iyice karışması sağlandıktan sonra, 1:1 oranında saf su ile seyreltilmiş folin reaktifinden 100 µL ilave edildi. 30 dakika olgunlaşmaya bırakılmasının ardından 650 nm deki absorbansları okundu. Aynı reaktiflerle hazırlanan sığır serum albumini, standart protein çözeltileri içinde elde edilen kalibrasyon grafiği yardımıyla solungaç homojenatlarının ve saf enzim çözeltisinin protein içerikleri tayini yapıldı.

2.2.5. Elüatlarda Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayini

Karbonik anhidraz aktivitesi monomerik, kolorometrik, elektrometrik olarak üç ayrı yöntemle hesaplanabilir. Bu çalışmada CA aktivitesinin ölçümü için bir elektrometrik yöntem tanımlanmıştır. Karbondioksitle doyurulmuş aparatlar ve veranol tamponu otomatik olarak ölçülüp şırınga edilir ve pH değişimi cam bir elektrotla ölçülür. İndikatör konsantrasyonları inhibisyon etkisi nedeniyle %0-11 arasında tutulması uygundur. Bu yöntem Roughton ve Booth yöntemlerinin modifikasyonudur. Dokularda genelde enzim konsantrasyonu kolorometrik yöntemle basitlikten dolayı da monomerik teknikler kullanılarak hesaplanır. Monomerik yöntemin dezavantajı indikatörlerin inhibitör etkisi olmasıdır (Wilbur ve Anderson, 1948).

Bu nedenle kolorometrik yöntemde CA aktivitesine etki etmeyen veronal tamponu kullanılır ve brom timol mavisıyla bu işlem gerçekleştirilir (Roughton ve Booth, 1945).

Yukarıdada ifade edildiği gibi enzimin aktivitesi klasik olarak iki şekilde tayin edilmektedir. Bunlardan ilki enzimin fizyolojik substratı olan CO₂' in kullanıldığı ve kolorometrik bir test olan hidrataz aktivitesidir. İkincisi ise spektrometrik ölçümüne dayanan ve substrat olarak *p*-nitrofenilasetatın kullanıldığı esteraz aktivitesidir.

2.2.5.1. CO₂-Hidrataz Aktivitesi Tayini

Yöntem Maren ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve sonra pek çok bilim insanı tarafından modifiye edilen bir yöntemdir. Metodun temelinde substrat olarak bulunan CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin (10 ve 7,4) brom timol mavisi indikatörlüğünde renginin değişim süresinin ölçümüne dayanmaktadır. Bu yöntemle göre aktivite ölçümü aşağıdaki tablodaki sıraya göre yapılmaktadır. Ortamın pH'sının ayarlanmasında Veronal tamponu (0,25 M sodyum barbital, pH 8,15) kullanılmaktadır. Substrat çözeltisi olarak doymuş karbondioksit çözeltisi kullanılmıştır. Bunun için buz banyosu içinde saf suyun içine 40-50 dakika hızlı bir şekilde CO₂ geçirildikten sonra doymuş hale gelmiş çözeltilerden yine yavaş şekilde CO₂ geçirilmeye devam edilerek deneyde doymuş çözeltisi kullanılmıştır (Maren,1960). Yapılan hidrataz aktivitesi için pipetlemeler aşağıda verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. CO₂- hidrataz aktivitesi reaksiyon karışımı

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

Substrat ilavesinden hemen sonra vorteksleme yapılarak ve çözeltinin renginin karıştırma anından itibaren maviden sarımsı yeşile dönmesine kadar geçen zaman kronometre ile tespit edilir. Enzim ünitesi enzimsiz reaksiyon süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanır. Enzim aktivitesi ise aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Bu aktivite “*Wilbur-Anderson Aktivitesi*” olarak bilinir (5).

$$EU = (t_o - t_c) / t_c \quad (5)$$

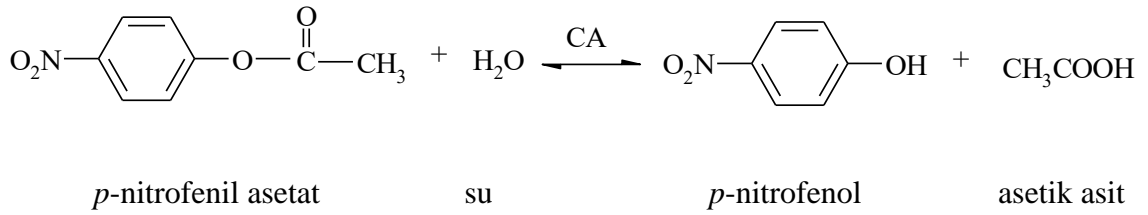
EU : Enzim ünitesi

t_0 : Enzimsiz denemede ölçülen süre

t_c : Enzim varlığında ölçülen süre

2.2.5.2. Esteraz Aktivitesi Tayini

Enzim, substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı *p*-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesiyle *p*-nitrofenil asetatın *p*-nitrofenola dönüşüm reaksiyonu aşağıda verildiği gibidir (Şekil 25).



Şekil 25. Esteraz aktivitesi reaksiyon mekanizması

Substratın 348 nm'deki absorbansının azalmasından aktivite tayin edilmektedir (Armstrong vd., 1966 , Verporte vd., 1967). Tayinde substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetat (P-NFA) günlük olarak taze hazırlanmıştır. Bunun için 27.2 mg substrat, 1 mL asetonda çözüldü ve çok hızlı karıştırılan 49 mL suya, çok yavaş olarak ilave edildi. 3 mM üzerinde konsantrasyonunda *p*-nitrofenil asetat hazırlamak mümkün olmadığı için ve çözücü olarak kullanılan aseton enzime minimum zarar verdiği için *p*-nitrofenil asetatın asetonda çözülmesi tercih edilmektedir. Aktivite ölçümü için aşağıdaki tablodaki pipetleme işlemleri yapıldı (Tablo 6).

Tablo 6. Esteraz aktivitesi için reaksiyon karışımı

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

Son pipetlemeden sonra her 15 saniyede bir absorbanans ölçülmüştür ve 3 dakika sonra 25 °C' de ve 348 nm' de saf suya karşı absorbanstaki azalma tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi ve spesifik aktivite şöyle hesaplandı (6,7).

$$U = \frac{\Delta A_{348 \text{ nm}} \times 0.001}{5.4} \text{ (}\mu\text{M/dk)} \quad (6)$$

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{EU / mL}}{\text{mg protein / mL}} \quad (7)$$

2.2.6. Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarındaki CA' ın Kinetik İncelenmesi

2.2.6.1. pH'ın Karbonik Anhidraz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

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

2.2.6.2. Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarından Saflaştırılan CA'nın Esteraz Aktivitesi İçin K_m, V_{max}, K_{kat} ve V_o Değerlerinin Bulunması

Mezgit ve Hamsi balıklarının solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidraz aktivitesinin ölçümünde kullanılan *p*-nitrofenil asetat substratının K_m ve V_{maks}

değerlerinin tayininde en az 5 farklı substrat konsantrasyonunda ve paralel çalışmak suretiyle esteraz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Değişen substrat konsantrasyonuna karşı hız Lineweaver-Burk grafiğine göre çizildi. Grafikten K_m ve V_{maks} değerleri bulundu.

Birim zamanda 1 mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanan K_{kat} , enzimin katalitik etkinliğini gösteren önemli bir sabittir. Aynı zamanda “turnover sayısı” olarak da bilinmektedir. Saflaştırılan enzim çözeltisinde protein tayini yapılarak toplam enzim miktarı (E_T) bulundu ve $K_{kat}=V_{max} / E_T$ den hesaplandı. V_o özgülük sabitinin hesaplanmasında ise $V_o=K_{kat} / K_m$ formülünden yararlanıldı. Enzimin katalitik etkinliğinde veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasında kullanılan V_o değeri bir sabittir (Nelson ve Cox, 2005).

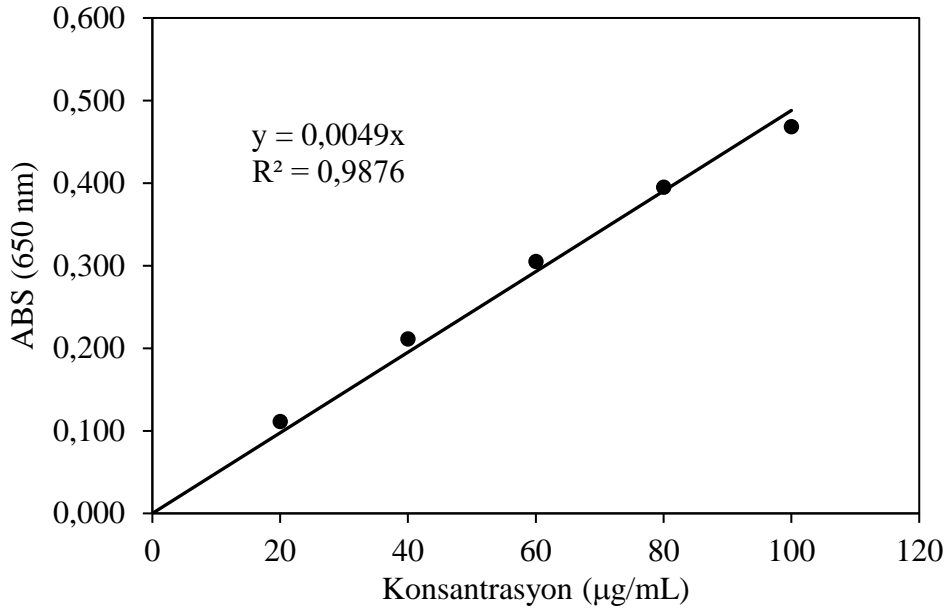
2.2.6.3. Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarından CA'nın İnhibisyon Çalışması

CA enziminin bilinen spesifik inhibitörleri sülfanilamid ve asetazolamid ile inhibisyon çalışması yapıldı. İnhibitör madde ile % inhibisyon arasındaki ilişki Excell programında R^2 değeri ve lineer denklem çıkarıldı. R^2 değeri 0,0 ile 1,0 arasında değişmektedir. ($y=ax+b$) doğru denkleminde % 50 inhibisyonu veren inhibitör konsantrasyonu IC_{50} belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Mezgıt ve Hamsi Solungaçlarında Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart alışma Grafiği ve Hidrataz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Mezgit ve Hamsi solungaçlarından elde edilen özütlerindeki protein miktarı Lowry protein tayin yöntemi kullanılarak belirlendi (Lowry vd., 1951). Standart alışma grafiği 1 mM stok BSA özeltisi seyreltilerek hazırlandı. Elde edilen grafiğin eğimi 0,0049 ve R^2 değeri 0,9876 olarak hesaplandı (şekil 26).



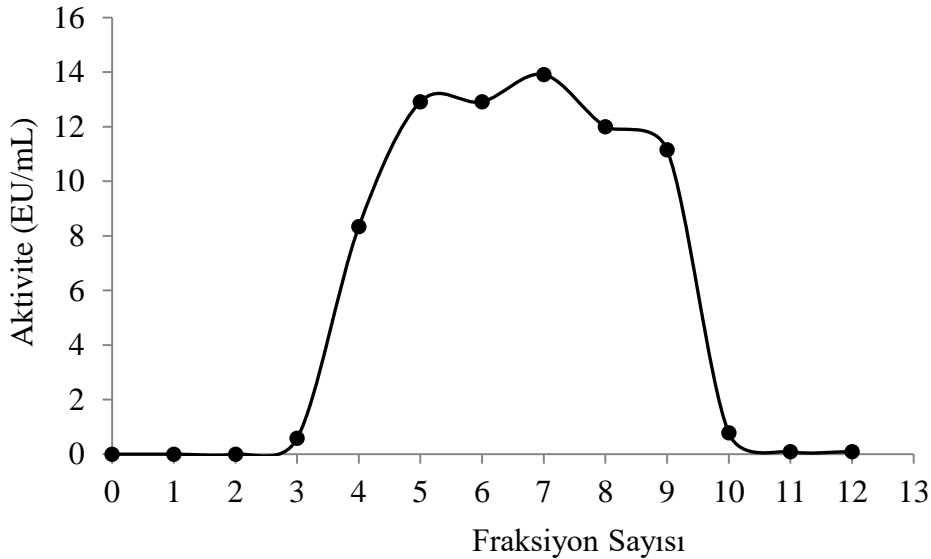
şekil 26. Protein standart çalışma grafiği.

Mezgit ve hamsi solungaçlarından elde edilen özütlerindeki protein miktarları sırasıyla 7,89 mg/mL ve 1,83 mg/mL olarak belirlendi.

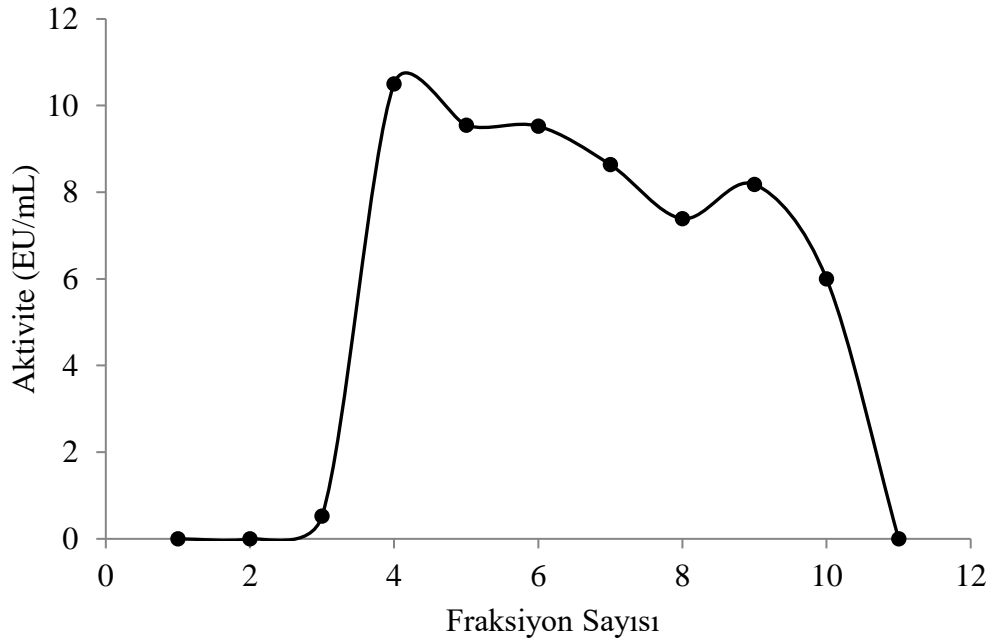
Mezgit ve hamsi solungaçlarından elde edilen zütlerdeki CA'nın hidrataz aktivitesi mezgit için 71,1 EU/mL, hamsi için 105,6 EU/mL olarak belirlendi.

3.2. Mezgit ve Hamsi Solungaçlarından Karbonik Anhidrazın Saflaştırılmasına Ait Bulgular

Mezgit ve hamsi solungaçlarından elde edilen özütlerin 25 şer mL'si pH 8,7 olan 25 mM Tris-HCl/0.1 M Na₂SO₄ tamponuyla dengeye getirilen iki farklı Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kolonlarına (1,0x10 cm'lik ve dolgu yüksekliği 15 cm) tatbik edildiler. Kolonlar 400 mL 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile yıkandılar. Daha sonra kolonlar 0,1M NaCH₃COO.3H₂O/0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) tampon çözeltisiyle CA'lar kolondan ayrılması sağlandı. Elüatlar dakikada 20 damla ve 5 şer mL olarak toplandılar. Aktivite gösteren fraksiyonlar (4-9. tüpler) birleştirilerek (toplam hacim 30 mL) (Şekil 27, Şekil 28) 10.000 Cutoff Amicon filtrede 4.000xg de santrifüj edildi ve enzim çözeltilerinin son hacim 8 mL olacak şekilde deriştirildi. Mezgit Balığı solungacı özütünden saflaştırılan karbonik anhidrazın 126,4 EU/mg protein özgül aktivite gösterdiği ve 14 kat saflaştığı belirlendi. Hamsi Balığı solungacı özütünden saflaştırılan karbonik anhidrazın 1.000,0 EU/mg protein özgül aktivite gösterdiği ve 17 kat saflaştığı belirlendi (Tablo 8).



Şekil 27. Mezgit Balığı solungacından elde edilen CA elüsyon grafiği.



Şekil 28. Hamsi Balığı solungacından elde edilen CA elüsyon grafiği.

Tablo 7. Mezgit Balığı solungacından saflaştırılan CA enziminin saflaştırma tablosu.

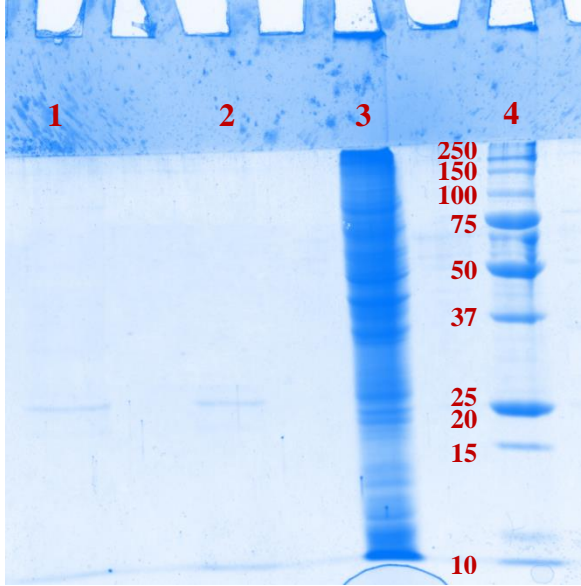
	Toplam hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam aktivite (EU)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Özgül Aktivite (EU/mg protein)	Verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat Afinite	25	71,1	1775,5	7,9	197,3	9,0	100	-
kolonundan elde edilen enzim çözeltisi	8	13,9	111,2	0,11	0,88	126,4	19,5	14

Tablo 8. Hamsi Balığı solungacından saflaştırılan CA enziminin saflaştırma tablosu.

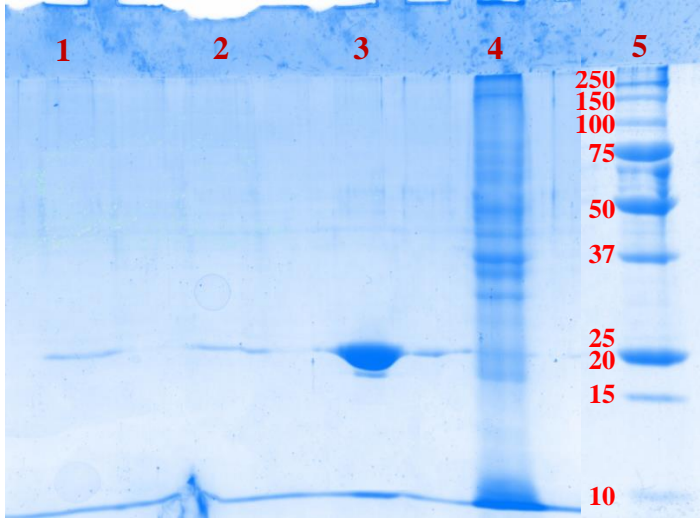
	Toplam hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam aktivite (EU)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Özgül Aktivite (EU/mg protein)	Verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat Afinite	25	105,6	2640	1,8	45	58,7	100	-
kolonundan elde edilen enzim çözeltisi	8	10	80	0,01	0,08	1.000,0	9,50	17

3.3. SDS-PAG Elektroforez bulguları

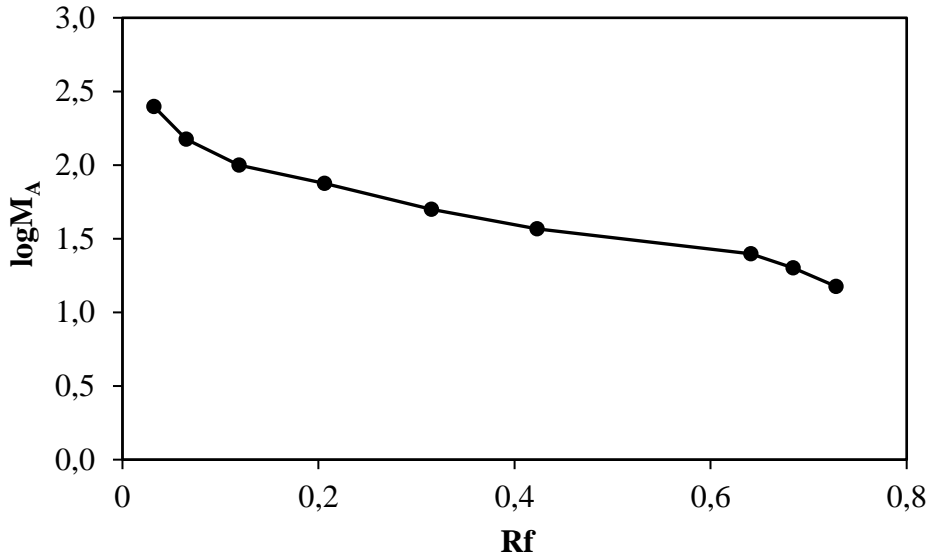
Mezgit ve Hamsi özütlerinden elde edilen karbonik anhidraz enzimi SDS-poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edildi. Elde edilen elektroforez jeli taranarak elektronik ortama aktarıldı. Yapılan SDS-PAG elektroforezleri sonucunda her iki enzim içinde tek protein bandı gözlemlendi. Elektroforez kromatogramlarından hesaplanan Rf değerlerinden mezgit ve hamsi solungaçlarından saflaştırılan her iki karbonik anhidraz enzimlerinde alt birim molekül kütlesi yaklaşık 29 kDa olarak hesaplandı (Şekil 29, Şekil 30).



Şekil 29. Mezgit solungacından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE (1 ve 2- saflaştırılmış CA; 3- Solungaç özütü; 4- protein standardı kDa cinsinden).



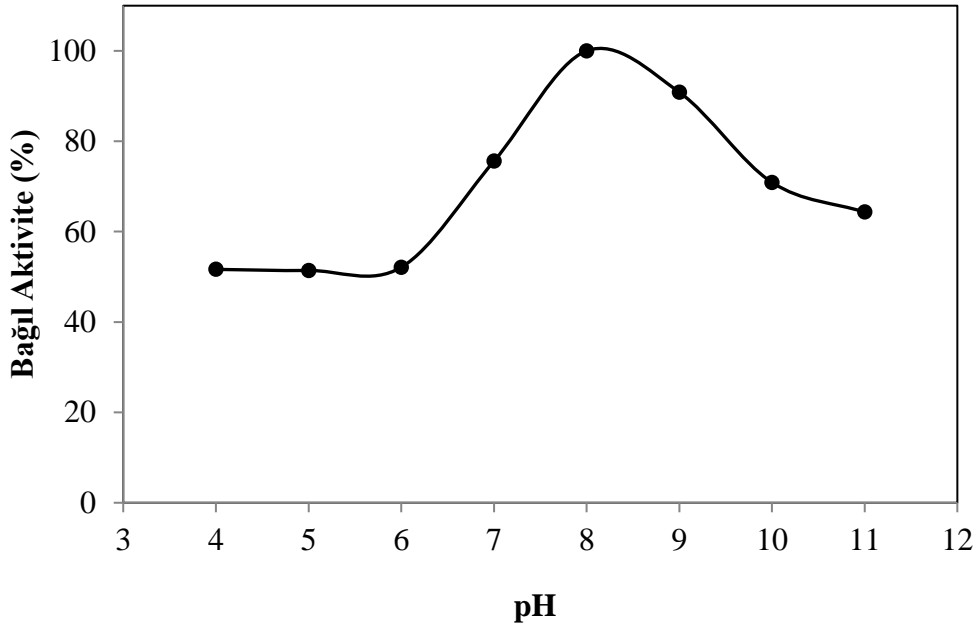
Şekil 30. Hamsi solungaçından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE (1 ve 2- saflaştırılmış CA; 3- Saf CA standardı; 4- Solungaç özütü; 5- protein standardı kDa cinsinden).



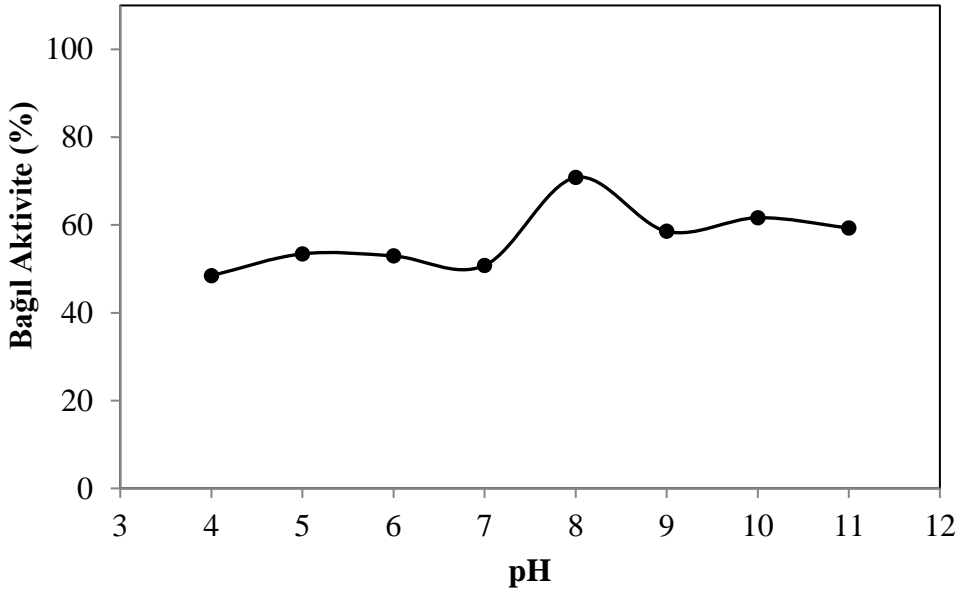
Şekil 31. Protein molekül ağırlığı standart çalışma grafiği.

3.4. Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaç Dokularındaki Karbonik Anhidrazın Optimum pH Değerleri

Mezgit ve Hamsi balıklarının solungaç dokuları CA enziminin hangi pH da maksimum aktivite verdiğini belirlemek için pH 4,0 ile 11,0 aralığında esteraz aktivitesi ile iki balık türü için ölçüldü. Solungaç dokularından izole edilen CA'nın esteraz aktiviteleri p-nitrofenil asetat substratı varlığında saflaştırılmış solungaç CA için optimum pH 8,0 olarak belirlenmiştir.



Şekil 32. Mezgit balığı solungacından saflaştırılan CA için pH grafiği.

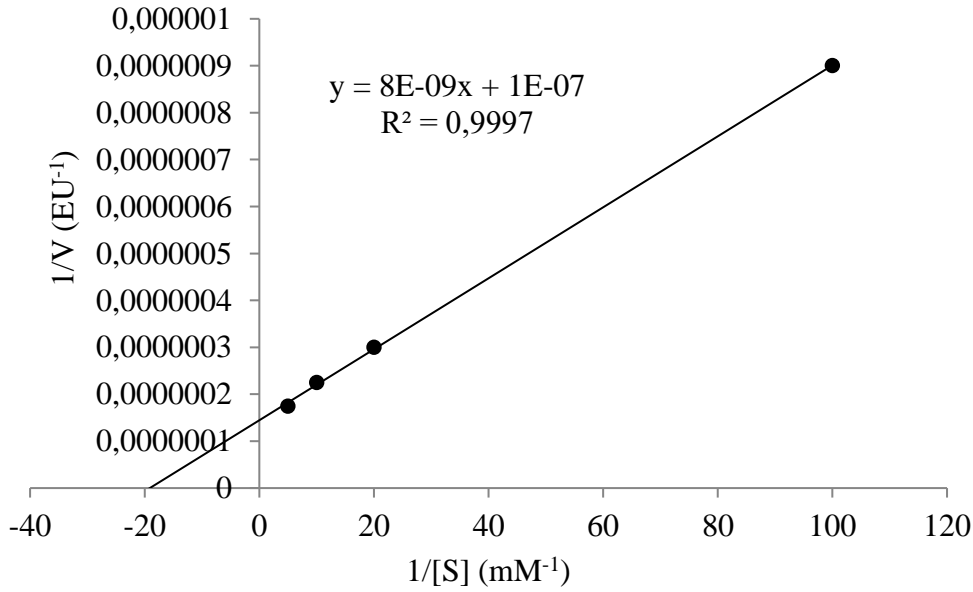


Şekil 33. Hamsi balığı solungacından saflaştırılan CA için pH grafiği.

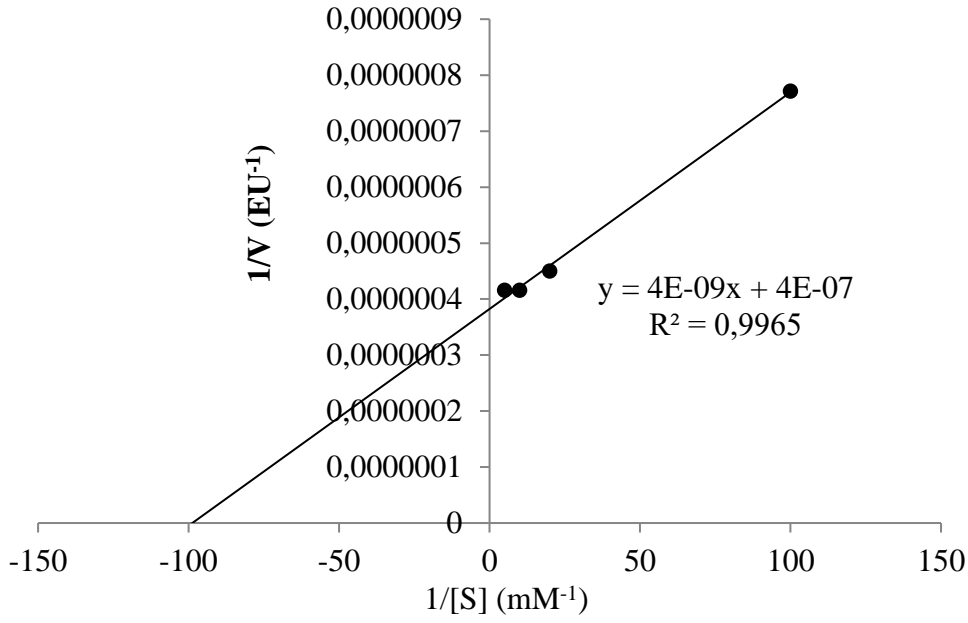
3.5. Mezgit ve Hamsi Solungaçlarından Saflaştırılan CA'nın Kinetik Verilerine Ait Bulgular

0,01-0,2 mM konsantrasyon aralığında değişen p-nitrofenil asetat substratı varlığında Mezgit ve Hamsi balıkları, ayrı ayrı işlemlere tabii tutularak esteraz aktivitesi spektrofometrik olarak 348 nm'de ölçüldü. 1/S ye karşı 1/V olacak şekilde çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden CA enziminin K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı (Şekil 34, Şekil 35).

Mezgit ve Hamsi balıklarının solungacından saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin p-NFA substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda Mezgit balığının V_{maks} değeri $1,0 \times 10^7$ $\mu\text{M}/\text{dak}$ ve K_m değeri 0,08 mM (Tablo 9) ; Hamsi balığının V_{maks} değeri $2,5 \times 10^6$ $\mu\text{M}/\text{dak}$ değeri ve K_m değeri 0,01 mM (Tablo 10) olarak belirlendi.



Şekil 34. Mezgit Balığından saflaştırılan CA'nın p-NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 35. Hamsi Balığından saflaştırılan CA'nın *p*-NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 9. Mezgit Balığı solungacından saflaştırılan CA için kinetik veriler.

Substrat	V_{maks} ($\mu\text{M}/\text{dak}$)	K_m (mM)	K_{kat} (s^{-1})	K_{kat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
<i>p</i> -nitrofenil asetat	1×10^7	0,08	$3,3 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$

Tablo 10. Hamsi Balığı solungacından saflaştırılan CA için kinetik veriler.

Substrat	V_{maks} ($\mu\text{M}/\text{dak}$)	K_m (mM)	k_{kat} (s^{-1})	k_{kat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
<i>p</i> -nitrofenil asetat	$2,5 \times 10^6$	0,01	$1,2 \times 10^{11}$	12×10^{12}

3.6. Mezgit ve Hamsi Solungaçlarından Saflaştırılan CA'nın İnhibisyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Karbonik anhidrazın hidrataz aktivitesi üzerine CA'nın bilinen inhibitörlerinden asetazolamid ve sülfanilamid etkisi incelendi. Elde edilen inhibisyon grafiklerine göre Mezgit balığı için asetazolamid IC_{50} değeri 2,0 μM , sülfonamid için 4,0 μM ; Hamsi balığı için asetazolamid IC_{50} değeri 2,0 μM , sülfonamid için 6,0 μM olarak bulundu (Tablo 11).

Tablo 11. Karbonik anhidrazın inhibitörleri varlığında elde edilen IC₅₀ değerleri.

İnhibitör madde adı	IC ₅₀	
	Mezgit	Hamsi
Asetazolamid	2,0 µM	2,0 µM
Sulfanilamid	6,0 µM	4,0 µM

4. TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) canlı sistemlerde pH düzenleyici, su elektrolit ve iyon transportunu düzenleyici olarak rol alan bir enzimdir. Fizyolojik olarak karbondioksidin hidrasyonunu ve bikarbonatın dehidratasyonunu dönüşümlü olarak katalizler. Enzim hemen hemen bütün dokularda mevcut olup hidrataz aktivitesinin yanında HCO_3^- ve H^+ oluşumunda da rol almaktadır (Beydemir vd. 2000). Enzim bitkilerde pH regülasyonu yanında Calvin çevriminde önemli rol aldığı bilinmektedir (Jebanathirajah ve Coleman, 1998).

İnsan eritrositlerden izole edilen ilk enzimler karbonik anhidraz I ve II enzimleridir. CA' nın izolasyonunda en çok kullanılan yöntem afinite kromatografisidir. Bu yöntem 1970 lerde uygulanmaya başlanmış ve sonrasında bu yöntem geliştirilerek karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir. Günümüzde CA' nın 16 tane izoenzimi olduğu bilinmektedir (Supuran, 2008; 2017).

Karbonik anhidraz canlılar için hayati öneme sahip bir enzimdir. CA her canlı ve dokuda farklı izoenzime ve farklı kinetik özelliklere sahiptir. Enzimin canlı organizmada nerelerde ve hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl fonksiyon gösterdiğini belirlemek için her canlı türünde ve dokularında ayrı ayrı CA' nın saflaştırılıp karakterizasyonu üzerine yüzlerce çalışma bulunmaktadır. Ancak bugüne kadar mezgit ve hamsi balıklarının eritrositlerinde ve diğer dokularında CA enziminin saflaştırılması ve karakterize edilmesi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca pelajik ve bentik bölgelerde yaşayan balık türlerinin CA aktiviteleri arasında bir farklılığın olup olmadığını ortaya koyan bir çalışma da bulunamamıştır. Bu hipotezle ortaya çıkarak bu çalışmada çok tüketilen pelajik bir balık olan hamsi ve bentik bir balık olan mezgit balıklarının solungaçlarından sepharose-4B afinite kolon matriksi kullanılarak karbonik anhidraz enzimleri saflaştırıldı ve karakterize edildi.

Mezgit ve hamsi balıklarının solungaçlarından elde edilen homojenatlardaki protein miktarı sırasıyla 7,89 mg/mL ve 1,83 mg/mL, olarak protein standart çalışma grafiğinden hesaplandı. Bu dokulardaki CA' nın hidrataz aktivitesi sırasıyla 71,1 EU/mL ve 105,6 EU/mL olarak belirlendi. Mezgit balığının solungacından saflaştırılan CA' nın 126,4 EU/mg protein özgül aktivite gösterdiği ve % 19,5 verimle 14 kat

saflaştığı tespit edildi. Hamsi balığının solungacından saflaştırılan CA' nın ise 1.000,0 EU/mg protein özgül aktivite gösterdiği ve % 9,5 verimle 17 kat saflaştığı belirlendi. Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimi Sefaroz-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonuyla, balık kanına göre 539 kat ve %29 verimle saflaştırılmıştır. Mersin balığı eritrositlerinde tek izoenzimin olduğu ve spesifik aktivitesinin 26943 EU/mg protein olduğu tespit edilmiştir (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011). Ayrıca bir başka çalışmada Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) solungacında CA' nın 222,2 EU/mg protein özgül aktivitesine sahip olduğu ve % 20,7 verimle ile 66 kat saflaştırıldığı belirtilmektedir (Dinçer vd., 2016). Çipura balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokuları karbonik anhidraz enzimleri Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak sırasıyla %9,1, %32,84 ve %83,6 verimlerle saflaştırılmıştır. Çipura balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokuları için tüm saflaştırma işlemleri boyunca saflaştırma kat sayıları sırasıyla yaklaşık 354, 841 ve 455 olarak bulunduğu ifade edilmektedir (Kaya vd., 2011). Gökkuşığı alabalığı karaciğer dokusundan, spesifik aktivitesi 4318 EU/mg protein olan, %38 verimle ve yaklaşık 2260 kat; böbrek dokusundan, spesifik aktivitesi 17285 EU/mg protein olan, %31,7 verimle ve yaklaşık 1800 kat; kas dokusundan, spesifik aktivitesi 2300 EU/mg protein olan, %19 verimle ve yaklaşık 1080 kat; beyin dokusundan spesifik aktivitesi 2275 EU/mg protein olan %22,5 verimle ve yaklaşık 1283 kat saflaştırılmıştır (Söyüt, 2006). Bir başka çalışmada gökkuşığı alabalık eritrositlerinden CA enzimini Sepharose-4B afinite kolonunun kullanılmasıyla 422,5 EU/mg protein spesifik aktivite, %20,9 verimle 222,4 kat saflaştırılmışlardır (Hisar vd., 2003). Hall ve Schaer (1983), kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Biogel iyon değişim kolonu kullanarak gökkuşığı alabalıkları eritrositlerinden CA enzimi 3,7 kat saflaştırmışlardır. Karbonik anhidraz enziminin aktivitesi ile saflaşma katsayısı organizma veya doku değişikçe farklılık göstermektedir. Çalışmada kullanılan balıklardan elde edilen CA' ların eritrosit CA' larına göre daha düşük aktiviteye sahip oldukları fakat solungaç CA' ları ile paralellik gösterdikleri belirlendi.

Mezgit ve hamsi solungaçlarındaki CA' ların her ikisinde de SDS-PAGE jelinde yaklaşık 29 kDa molekül kütlesine sahip tek protein bantları gözlemlendi. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından izole edilen CA enzimlerinin

sırasıyla alt birim molekül kütlelerinin yaklaşık olarak 29,4 kDa, 28,7 kDa, 30,3 kDa ve 29 kDa olduğu belirtilmiştir (Söyüt, 2006). Mersin Balığı eritrositi (Karahalil, 2009; Kolaylı, 2011) ve solungacındaki (Dinçer, 2016) CA'nın molekül kütlelerinin yaklaşık 29 kDa olduğu tespit edilmiştir. Farklı organizmalardan elde edilen CA'ların 18,9-29,3 kDa arasında değişen altbirim molekül kütleleriyle mono, trimer, tetramer ve oktamer yapılaraya sahip oldukları belirtilmektedir (Smith ve Ferry, 1999).

Mezgit ve Hamsi balıklarının solungaçlarından izole edilen CA'ların p-NFA substratı varlığında en yüksek esteraz aktivitesini sırasıyla pH 8,0 ile 9,0' da ve her ikisinde 40 °C' de gösterdiği belirlendi. Mezgit balığı solungacından saflaştırılan CA'nın p-NFA substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri $1,0 \times 10^7$ $\mu\text{M}/\text{dak}$, K_m değeri 0,08 mM, k_{kat} $3,3 \times 10^7$ s^{-1} , k_{kat}/K_m $4,2 \times 10^8$ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak hesaplandı. Hamsi balığı solungacından saflaştırılan CA ile yapılan kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri $2,5 \times 10^6$ $\mu\text{M}/\text{dak}$, K_m değeri 0,01 mM, k_{kat} $1,2 \times 10^{11}$ s^{-1} , k_{kat}/K_m $12,0 \times 10^{12}$ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak hesaplandı.

Mersin Balığı eritrositinde saflaştırılan CA esteraz aktivitesine göre pH 9,0' da 30 °C sıcaklıkta en yüksek esteraz aktivitesini gösterdiği belirtilmiştir. Enzimin K_M ve V_{maks} kinetik değerleri p-nitrofenil asetat (p-NFA) substratı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğine göre hesaplanmış ve sırasıyla K_m 4 mM ve V_{maks} 20.000 mM/dak, k_{cat} değeri 20,8 s^{-1} olarak tespit edilmiştir (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011). Karaca Mersini balığı solungacından saflaştırılan CA'nın en yüksek esteraz aktivitesini pH 6,0'da ve 40 °C'de gösterdiği, kinetik çalışmalar sonucunda 2,5 mM K_m , 5×10^6 $\mu\text{M}/\text{dak}$ V_{maks} ve 144408,6 s^{-1} k_{kat} değerine sahip olduğu belirtilmiştir (Dinçer, 2016). Gökkuşığı alabalık CA esteraz aktivitesi optimal pH karaciğer dokusu için pH 8,5 olarak belirlenirken, böbrek, kas ve beyin için pH 9,0 olarak bulunduğu ve tüm dokularda 40 °C'de en yüksek aktivitenin olduğu tespit edilmiştir. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesinde substrat olarak kullanılan p-NFA için K_m , V_{maks} , k_{kat} ve özgülük sabiti (V_0) değerleri belirlenmiştir. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin K_m değerleri sırasıyla 0,66, 0,40, 1,29 ve 0,92 mM olarak, V_{maks} değerleri sırasıyla 0,126, 0,097, 0,173, 0,207 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein dak, k_{kat} değerleri sırasıyla 32,8, 15,2, 28,8, 43,6 s^{-1} ve özgülük sabitleri sırasıyla 5×10^4 , 4×10^4 , $2,2 \times 10^4$ ve $4,7 \times 10^4$ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak belirtilmiştir (Söyüt, 2006). Hamsi balığı solungacının CA

enzimi mezzit balığı solungacı CA'ına göre hidrataz ve esteraz aktivitelerrinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Literatürlerde yer alan diğer CA'lara göre iki CA nında oldukça hızlı katalizleme yeteneğinin olduğu görölmektedir.

Mezzit ve Hamsi balıklarının solungaçlarından izole edilen CA enziminin hidrataz akvitesiyle yapılan inhibisyon çalışması sonucunda, asetazolamid varlığında her ikisinin de IC₅₀ değeri 2,0 µM olduğu, sülfonamid varlığında ise sırasıyla IC₅₀ değeri 6,0 µM ve 4,0 µM olduğu tespit edildi. Mersin Balığı eritrositinden saflaştırılan CA enziminin sülfanilamid ve asetazolamid inhibitörlerine karşı 4,0 µM ve 0,1 µM gibi oldukça düşük IC₅₀ değeri (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011), solungacından elde edilen CA'nın ise sırasıyla 13 µM ve 0,1 µM IC₅₀ değeri sahip olduğu belirtilmiştir (Dinçer, 2016). Her iki solungaçtan izole edilen CA'ların CA'ın bilinen inhibitörlerine karşı oldukça duyarlı olduğu gözlemlendi.

5. SONUÇLAR

Yaptığımız çalışmada tuzlu su balıklarından Mezgıt (bentik) ve Hamsi (pelajik) solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidraz (CA), karakterize edilerek farklılıkların olup olmadığı ortaya konuldu. Balıkların solungaçlarından Sepharose-4B-L tirosin-sülfanilamid kolonuyla CA enzimi ayrı ayrı saflaştırıldı. Saflaştırılan CA enziminin asetazolamid ve sülfanilamid varlığında inhibisyonları çalışılarak, IC₅₀ değerleri tespit edildi.

Mezgıt ve Hamsi balıklarının solungaçlarının homojenatlarında protein miktarları Lowry protein tayin yöntemi kullanılarak sırasıyla 7,89 mg/mL ve 1,83 mg/mL olarak belirlendi.

Mezgıt ve Hamsi balıklarının solungaçlarından elde edilen özütlerde karbonik anhidrazın hidrataz aktivitesi sırasıyla 71,1 EU/mL ve 105,6 EU/mL olarak tespit edildi. Her iki balığın solungaçlarından saflaştırılan CA'ların esteraz aktivitesinin optimum pH'ı 8,0 olarak belirlendi.

Mezgıt ve Hamsi balıklarının solungaçlarından elde edilen özütler, hazırlanan Sepharose-4B afinite kolonu içerisine ayrı ayrı tatbik edilerek CA enzimi saflaştırıldı. Saflaştırılan CA'ların sırasıyla 126,4 EU/mg protein ve 1.000,0 EU/mg protein özgül aktivite gösterdiği, mezgıt solungaç özütü % 19,5 verimle 14 kat saflaştığı, hamsi solungaç özütü % 9,5 verimle 17 kat saflaştığı belirlendi. Mezgıt ve Hamsi balıklarının solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin p-nitrofenil asetat (p-NFA) substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda sırasıyla V_{maks} değerleri 1x10⁷ µM/dak ile 2,5x10⁶, K_m değerleri 0,08 mM ile 0,01 mM, k_{kat} 3,3x10⁷ s⁻¹ ile 1,2x10¹¹ s⁻¹ özgülük sabiti k_{kat}/ K_m 4,2x10⁸ mM⁻¹s⁻¹ ile 12x10¹² mM⁻¹s⁻¹ olarak belirlendi.

SDS-PAG Elektroforezi sonucunda Mezgıt ve Hamsi balıklarının solungaçlarından saflaştırılan CA'nın altbirim molekül kütlesi yaklaşık olarak 29 kDa olarak tespit edildi.

Karbonik anhidrazın hidrataz aktivitesi üzerine CA'nın bilinen inhibitörlerinden asetazolamid ve sülfanilamid etkisi incelendi. Mezgıt balığı solungacı CA' sı için IC₅₀ değeri asetazolamid varlığında 2,0 µM, sülfanilamid varlığında 6,0 µM, Hamsi balığı

solungacı CA' sı için IC₅₀ değeri asetazolamid varlığında 2,0 µM, sülfanilamid varlığında 4,0 µM olarak bulundu.

Sonuç olarak yapılan çalışmada mezgıt ve hamsi balıklarının yaşama alanlarının denizde farklı olması münasebetiyle solungaçlardan izole edilen karbonik anhidrazları da davranış olarak farklılık arz ettiği belirlendi. Solungaçlardan elde edilen CA'ların sülfanilamid inhibitörü bağlı sepharose 4B afinite kolonundan birbirlerine yakın saflaşma katsayısına sahip olmalarına rağmen CA nın, fizyolojik substratı CO₂ olduğu ve p-NFA karşı ilgilerinin birbirinden farklı olduğu tespit edildi. Her iki enzimde hidrataz ve esteraz aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu, bununla birlikte hamsi CA'sının mezgıt CA'sına göre daha hızlı çalıştığı görüldü. Ayrıca enzimin bilinen inhibitörleri olan sülfanilamid ile asetazolamid karşı her iki CA'nında oldukça duyarlı olduğu tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada Mezgit (bentik) ve Hamsi (pelajik) balıklarının solungaçlarında karbonik anhidraz (CA) enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi. Tuzlu su balıklarından olan ve denizde farklı bölgelerde yaşayan bu balıkların solungaçlarındaki CA' ların davranışlarında farklılık olup olmadığı ortaya konuldu. Her ne kadar iki enzim arasında farklılıklar olsa da, istatistiksel veriler elde edebilmek için her iki ortamda da yaşayan (bentik-pelajik) balık türlerinin sayısı arttırılmalıdır.

Solungaçlardan saflaştırılan karbonik anhidraz enzimleri, hangi CA'nın izoenzimi olduğunu belirlemek için farklı tamponlar kullanılarak elüatlar toplanabilirdi. Bu şekilde Mezgit ve Hamsi balıklarının solungaçlarından saflaştırılan CA'nın izoenzim sayısı ve türleri tespit edilebilirdi.

KAYNAKLAR

- Akincioglu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, I. and Supuran, C.T., 2013.** Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorg. Med. Chem*, 21, 1379-1385.
- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. and Edsall, J.T., 1966.** Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 5137-5145.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfreliloğlu, İ., 1996.** New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography. *Turk J Medical Science*, 216-219.
- Aydın, İ., Eroğlu, O. ve Küçük, E., 2008.** Karadeniz'in Demersal Balıkları. *Yunus Araştırma Bülteni*, 8:2, 4-8.
- Becker, B., 1954.** Decrease in Intraocular Pressure in Man by a Carbonic Anhydrase Inhibitör. *37*, 13-17.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Özmen, İ., Okuroğlu, M.E., Özdemir, H. and 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, 187-19.
- Bülbül, M., Hisar, O., Beydemir, B., Çiftçi, M. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003.** The in vitro and in vivo inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18 (4), 371-375.
- Chegwidden, W.R., Dodgson, S.J. and Spencer, I.M., 2000.** In the Carbonic Anhydrase New Horizons. *Chemistry Medicinal Research Reviews*, 23: 146-189.
- Dinçer B., Ekinci, A.P., Akyüz, G. and Kurtoğlu, I.Z., 2016.** Characterization and inhibition studies of carbonic anhydrase from gill of russian sturgeon fish (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31:6, 1662-1665.
- Esposito, S., Mangano, G., Melchiorri, A., Miele, G. and Pisanti, O., 2001.** Testing standard and degenerate big bang nucleosynthesis with boomerang and Maxima-1. *Physical Review D*, 63(4).
- Falkbring, S.O., Göthe, P.O., Nyman, L. and Parath, J., 1972.** Affinity Chromatography of carbonic anhydrase, 24-229.

- Franchi, M., Vullo, D., Lallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava, A., Pastorekova, S. and Supuran, C.T., 2003.** Carbonic anhydrase inhibitors, inhibition of cytosolic isozymes I and II and transmembrane cancer-associated isozyme IX with lipophilic sulfonamides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18(4), 333-8.
- Gilmour, K.M., 2010.** Perspectives on carbonic anhydrase. *Comparative Biochemistry and Physiology. Molecular & Integrative Physiology*, 157, 193–197.
- Gülçin, I., Beydemir, S. and Büyükkuroğlu, M., 2004.** In vitro and in vivo effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 613-616.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S. and Parkkila, S., 2005.** Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, 15, 392.
- Hisar, O., Hisar, Ş., Yanık, T. ve Aras, M., 2003.** Balık kan karbondioksitinin taşınması ve atılmasında karbonik anhidraz izoenzimlerinin fonksiyonları. *Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34(4), 387-393.
- Işık, S., 2008.** Maya Karbonik Anhidrazının Ekspresyonu, Saflaştırılması, Elektroforetik ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Türkiye.
- Iverson, T.M., Alber, B.E., Kisker, C., Ferry, J.G., and Rees, D.C., 2000.** A Closer look at the active site of γ -class carbonic anhydrases high resolution crystallographic studies of the carbonic anhydrase from *methanosarcina thermophila*. *Biochemistry*, 39, 9222-9231.
- Jebanathirajah, J.A. and Coleman, J.R., 1998.** Association of carbonic anhydrase with a calvin cycle enzyme complex in *nicotina tabacum*. *Planta*, 204, 177-82.
- Karahalil, F., 2009.** Mersin Balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon, Türkiye.
- Kaya, Y., Çebi, A. and Demir, H., 2011.** Determination of erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in patients with coronary artery disease. *Gulhane Med. J.*, 254-257.
- Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B.E., Ferry, J.G. and Rees, D.C., 1996.** A left-hand beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *methanosarcina thermophila*, 2323–2330.

- Kolaylı, S., Karahalil, F., Şahin, H., Dinçer, B. and Supuran, C.T., 2011.** Characterization and inhibition studies of an α carbonic anhydrase from the endangered sturgeon species *Acipenser gueldenstaedti*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 26(6), 895-900.
- Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227-259, 680-5.
- Leppilampi, M., 2006.** Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX, ISSN: 1796-2234.
- Lindskog, S. and Silverman, D.W., 2000.** In the carbonic anhydrase-new horizons, 175-196.
- Lowe, N., Edwards, Y.H., Edwards, M. and Butterworth, P.H., 1991.** Physical Mapping of the human carbonic anhydrase gene cluster on chromosome, 882.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193:265.
- Maren, T.H., 1960.** A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 130 s.,26.
- Moroney, J.V., Bartlett, S.G. and Samuelsson, G., 2001.** Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant, Cell & Environment*, 24: 141–153.
- Nelson, D. and Cox, M., 2005.** *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Palme Yayıncılık Ankara, Türkiye.
- Pullan, L.M. and Noltmann, E.A., 1985.** Purification and properties of pig muscle carbonic anhydrase III. *Biochimica et Biophysica*, 17, 839 (2),147-54.
- Pushkas, M., Inui, K., Zahan, H. and Yukawa, A., 2000.** Periplasmic α -type carbonic anhydrase from *Rhodospirillum rubrum* is essential for bicarbonate uptake, 2957–2966.
- Roughton, F.J.W. and Booth, V.H., 1946.** The manometric determination of the activity of carbonic anhydrase under varied conditions, 40, (2): 309–319.
- Roughton, J.W. and Booth, V.H., 1945.** The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 309 s., 40.
- Satılmış, H. ve Bat, L., 2010.** Planktondaki Hamsi. *Yunus Araştırma Bülteni*, 10:2, 1-3.

- Schcer, A. and Dietsch, P. 1984.** A 54.000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes in biology and chemistry of the carbonic anhydrase. Annals , New York Academy Science.
- Sharma, A., Bhattacharya, A. and Singh, S., 2009.** Purification and characterization of an extracellular carbonicanhydrase from *Pseudomonas fragi* .
- Smith, K.S. and Ferry, J.G., 1999.** A plant-type carbonic anhydrase in the thermophilic methanoarchaeon. Journal of Bacteriology, 181, 20:6247-6253.
- Smith, K.S. and Ferry, J.G., 2000.** Prokaryotic carbonic anhydrases. FEMS Microbiology, 24,335-366.
- Song, B., Park, H. and François, M., 2007.** Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. Environmental Microbiology., 9(2), 403-413.
- Sowden, J., Edwards, M., Morrison, K., Butterworth, P.H.W. and Edwards, Y.H., 1992.** Erythroid expression and DNAase-Hypersensitive sites of the carbonic anhydrase 1 Gene.
- Söyüt, H., 2006.** Gökkuşuğu Alabalık Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2007.** Carbonic anhydrases as targets for medicinal.
- Supuran, C.T., 2003.** Indisulam: an anticancer sulfonamide in clinical development. Expert Opinion on Investigational Drugs, 12(2): 283-287.
- Supuran, C.T., 2008.** Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and Activators, 1-14.
- Supuran, C.T., 2017.** Bortezomib inhibits mammalian carbonic anhydrases. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 25,64-67.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2001.** Carbonic anhydrase inhibitors, 1: 61-97.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. and Conway, J., 2004.** Carbonic anhydrase: Its inhibitors and activators. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2-20.
- Tripp, B, Smith, K. and Ferry, J., 2001.** Carbonic anhydrase: New insight for an ancient enzyme. Journal of Biological Chemistry, 10, 1074.
- URL-1, 2017.** <http://www.sanofi.com.tr/urunler> (15 Mart 2017).
- URL-2, 2017.** <http://www.e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/raporlar> (15 Mart 2017).

- URL-3, 2017.** <http://www.cancer.gov/Templates/drugdictionary> (15 Mart 2017).
- URL-4, 2017.** <http://en.wikipedia.org> (15 Mart 2017).
- URL-5, 2017.** <https://en.wikipedia.org/wiki/Sultiame> (15 Mart 2017).
- URL-6, 2017.** <https://tr.wikipedia.org/wiki/Sakarın> (15 Mart 2017).
- URL-7, 2017.** <http://www.psikofarma.info/antipsikotik-ilaclar/sulpirid-sulpiride> (15 Mart 2017).
- URL-8, 2017.** <https://en.wikipedia.org/wiki/Zonisamide> (15 Mart 2017).
- URL-9, 2017.** <https://en.wikipedia.org/wiki/Celecoxib> (15 Mart 2017).
- URL-10, 2017.** <http://www.wikiwand.com/bs/Etoksizolamid> (15 Mart 2017).
- URL-11, 2017.** <http://www.wikipedia.org/wiki/Dorzolamid> (15 Mart 2017).
- URL-12, 2017.** <http://www.wikipedia.org/wiki/Brinzolamid> (15 Mart 2017).
- URL-13, 2017.** <http://www.wikipedia.org/wiki/Valdekoksib> (15 Mart 2017).
- URL-14, 2017.** <http://www.wikipedia.org/wiki/Topiramate> (15 Mart 2017).
- URL-15, 2017.** <http://www.hayvansitesi.com/balik-ozellikleri/mezgit-baligi-ozellikleri-merlarigi-us-xmus> (28 Nisan 2017).
- Verporte, J.A., Mehta, S.T. and Edsall, J., 1967.** Esterase activities of human carbonic anhydrases. B. and C. *Biol. Chem.*, 242,4221-4229.
- Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948.** Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J Biol Chem.*, 176, 147-154.
- Winum J.Y., Scozzafava. A., Montero. J.L. and Supuran, C., 2004.** Carbonic Anhydrase Inhibitors. Design of Fluorescent Sulfonamides as Probes of Tumor-Associated Carbonic Anhydrase IX That Inhibit Isozyme IX-Mediated Acidification of Hypoxic Tumors, 48(15):4834-41.
- Wistrand, P.J., 1981.** The importance of carbonic anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte. s.343.
- Wistrand, P.J., 2002.** Carbonic anhydrase III in liver and muscle of male rats purification and properties. *Medical Science*, 107(2): 77-88.
- Zehiroğlu, A.M., 2014.** Hamsi Etimolojisi. www.academia.edu/9331292 (15 Mart 2017).

ÖZGEÇMİŞ

16.08.1991 yılında Bursa'da doğdu. İlk öğrenimini Trabzon'da tamamladı. Orta öğreniminin üç yılını Maçka Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi, son yılını Cumhuriyet Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesinde Kimya bölümünü kazandı. 2015 yılında mezun oldu. 2015 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.