

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARE GENOMUNDA BULUNAN KARBONİK ANHİDRAZ
İZOENZİM VE KARBOKSİLİZ ENZİM GENLERİNİN
cDNA' LARININ ÜRETİLMESİ, ANTİSENS mRNA SENTEZİ ve
İN SITU HİBRİDİZASYONU İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ**

Deniz EKİNCİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2006

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARE GENOMUNDA BULUNAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİM VE
KARBOKSİLİZ ENZİM GENLERİNİN cDNA'LARININ ÜRETİLMESİ,
ANTİSENS mRNA SENTEZİ ve *İN SITU* HİBRİDİZASYONU İLE GEN
EKSPRESYON ANALİZİ

Deniz EKİNCİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr.Şükrü BEYDEMİR

Hayvan genomunda bulunan genlerin büyük çoğunluğunun sekanslarının bulunması, biyolojik düzenlenmenin temelini teşkil eden kompleks genetik ve protein etkileşmelerini araştırma imkanlarına neden olmuştur. Gen ekspresyon örnekleri, RNA *in situ* hibridizasyonu ile kolaylıkla belirlenebilir. RNA *in situ* hibridizasyonu vasıtasıyla elde edilen gen ekspresyon verilerinin otomatik mikroskopik taranması için bilgisayar programı oluşturulmuştur. Bu çalışmada karbonik anhidraz izoenzim ve karboksilaz enzim genleri (Car1, Car2, Car3, Car4, Car5a, Car5b, Car6, Car7, Car8, Car9, Car10, Car11, Car12, Car13, Car14, Car15, Acaca, Acacb, Pcx, Pcca, Pccb, Mccc1, Mccc2, Ggcx, Paics) seçildi. Bu genler için spesifik primerler dizayn edildi. Spesifik primerler kullanılarak cDNA kalıpları hazırlandı ve kalıplardan antisens mRNA'lar (*in vitro* transkripsiyon) sentezlendi. Antisens mRNA'ların;14,5 günlük fare embriyosunda *in situ* hibridizasyonu yapıldı. Sonuç alınan genler için ekspresyon haritaları mikroskopta incelenerek internet ortamına aktarıldı (www.genepaint.org).

2006, 151 sayfa

Anahtar kelimeler: *In situ* hibridizasyon, gen ekspresyonu, karbonik anhidraz, karboksilaz.

ABSTRACT

Master Thesis

cDNA PRODUCTION, ANTISENS mRNA SYNTHESIS AND GEN EXPRESSION
ANALYSIS OF CARBONIC ANHDRASE IZOENZYME AND CARBOXYLASE
ENZYME GENES IN MOUSE GENOME BY *IN SITU* HYBRIDIZATION

Deniz EKİNCİ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assist.Prof.Dr.Şükrü BEYDEMİR

The availability of sequence data for many of the genes present in animal genomes, opens up opportunities to study complex genetic and protein interactions that underlie biological regulations. Gene expression patterns can readily be determined by RNA *in situ* hybridization. There are automatical systems that allow the determination and visualization of gene expression patterns on different tissues. In addition, computer programme was founded for microscopic scanning of gene expression datas obtained by *in situ* hybridization. In the present study, gene expression analysis of carbonic anhydrase isoenzyme and carboxylase enzyme genes present in mouse genome was carried out using an automatic robotic system by *in situ* hybridization in 14.5 days old mouse embryo. Specific primers were arranged for these genes. Specific cDNA templates were prepared with these specific primers. Antisense mRNAs (in vitro transcription) were produced with spesific cDNA templates. *In situ* hybridization in which was used these antisense mRNAs on mouse embryo (14.5 days) was made. Automated microscopic scanning of gene expression data for carbonic anhydrase isoenzyme and carboxylase enzyme genes was investigated and these results were transfered with software in internet (www.genepaint.org).

2006, 151 pages

Keywords: *In situ* hybridization, gene expression, carbonic anhydrase, carboxylase

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışması olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı, Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı ve Max-Planck Enstitüsü Deneysel Endokrinoloji Bölümünde (Hannover) gerçekleştirilmiştir.

Bu projede çalışmamı sağlayan ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Prof.Dr.Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU'na ve çalışmalarımın her aşamasında desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Şükrü BEYDEMİR'e sonsuz minnet ve şükran duygularımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarım esnasında değerli katkılarından dolayı Biyokimya çalışma grubu hocalarım Sayın Doç.Dr.Mehmet ÇİFTÇİ, Sayın Doç.Dr. Hasan ÖZDEMİR, Sayın Yrd.Doç.Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve başta Sayın Prof.Dr.Gregor EICHELE olmak üzere Max-Planck Enstitüsü Deneysel Endokrinoloji Bölümü (Hannover) çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim.

Katkılarından dolayı laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bana sağladığı maddi ve manevi imkânlardan ötürü aileme minnettarım.

Deniz EKİNCİ
AĞUSTOS 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi

1. GİRİŞ

1.1. Gen Ekspresyonu	1
1.1.1. Transkripsiyon	1
1.1.2. Translasyon	3
1.2. Gen Ekspresyonunun Denetimi ve Düzenlenmesi	6
1.3. Gen Ekspresyon Analiz Yöntemleri	13
1.4. Karbonik Anhidraz	16
1.4.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Fizyolojik Fonksiyonları	17
1.4.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	20
1.4.3. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları	22
1.4.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	24
1.5. Karboksilaz Enzimleri	27
1.5.1. Asetil koenzim A karboksilaz	27
1.5.2. Piruvat karboksilaz	30
1.5.3. 3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz	31
1.5.4. Gamma glutamil karboksilaz	34
1.5.5. Propiyonil koenzim A karboksilaz	35
1.5.6. Fosforibozilaminoimidazol karboksilaz	37
1.6. Amaç	38

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Karbonik anhidraz I	38
2.2. Karbonik anhidraz II	38
2.3. Karbonik anhidraz III	40
2.4. Karbonik anhidraz IV	41

2.5. Karbonik anhidraz VA	41
2.6. Karbonik anhidraz VB.....	42
2.7. Karbonik anhidraz VI.....	42
2.8. Karbonik anhidraz VII.....	44
2.9. Karbonik anhidraz VIII	44
2.10. Karbonik anhidraz IX.....	45
2.11. Karbonik anhidraz X	46
2.12. Karbonik anhidraz XI.....	46
2.13. Karbonik anhidraz XII.....	47
2.14. Karbonik anhidraz XIII	48
2.15. Karbonik anhidraz XIV	48
2.16. Karbonik anhidraz XV	49
2.17. Asetil koenzim A karboksilaz.....	50
2.18. Piruvat Karboksilaz	51
2.19. 3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz.....	52
2.20. Gamma-glutamil karboksilaz.....	52
2.21. Propiyonil CoA karboksilaz.....	53
2.22. Fosforibozilaminoimidazol karboksilaz	53
3. MATERİYAL ve YÖNTEM	
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	56
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	57
3.4. Spesifik Genler İçin İnternet Kullanılarak Primer Dizaynı	60
3.5. RNA İzolasyonu.....	72
3.6. cDNA Kütüphanesi Hazırlanması	73
3.7. Spesifik Genler İçin cDNA Problarının Hazırlanması	74
3.8. Antisens mRNA Üretimi.....	77
3.9. İn situ Hibridizasyon (ISH) Yönteminin uygulanması	79
3.10. Gen Ekspresyon Örneklerinin Değerlendirilmesi	87
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	
4.1. Çalşılan Genler İçin Primer Dizaynı Sonuçları	89

4.2. Spesifik Genler İçin Hazırlanan cDNA Problarının ve Spesifik Antisens

mRNA'larının AgaroZ Jel Elektroforez Sonuçları 93

4.3. *In Situ* Hibridizasyon Sonuçları 94

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

KAYNAKLAR

SİMGELER DİZİNİ

dd H ₂ O	Didestile Su
E.C.	Enzim kod numarası
cDNA	Komplementer DNA
mRNA	Messenger RNA
ISH	İn situ hibridizasyon
Tris	Trihidroksimetil amino metan
EDTA	Etilen diamin tetra assetat asidi
PK	Proteinaz K
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RT-PCR	Revers transkriptaz PCR
Bp	Baz çifti
Kb	Kilobaz
CA	Karbonik anhidraz
HCA	İnsan Karbonik Anhidraz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. 1,6-Alloaktoz ve IPTG	8
Şekil 1.2. Laktoz operonunda baskılama mekanizması	9
Şekil 1.3. Laktoz operonunda indüklenme mekanizması	9
Şekil 1.4. E.coli’de triptofan operonu	10
Şekil 1.5. Triptofan operonunda yapısal genlerin indüklenmesinin gösterimi	11
Şekil 1.6. Triptofan operonunda yapısal genlerin baskılanmasının gösterimi.....	11
Şekil 1.7. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi	17
Şekil 1.8. HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi	23
Şekil 1.9. Karbonik anhidraz enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi	25
Şekil 1.10. Asetil CoA karboksilazın tepkimesi	29
Şekil 1.11. Biyotinin piruvat karboksilaz tepkimesindeki rolü	31
Şekil 1.12. Lösin yıkılma yolu ve mevalonat yolu.....	33
Şekil 1.13. Gamaglutamil karboksilaz enziminin katalizlediği reaksiyon	34
Şekil 1.14. Propiyonil CoA enziminin katalizlediği reaksiyon	36
Şekil 1.15. Fosforibozilaminoimidazol karboksilaz’ın katalizlediği reaksiyon	37
Şekil 3.1. ncbi.nlm.nih.gov ana sayfası.....	62
Şekil 3.2. ncbi.nlm.nih.gov/entrezgen sayfası	63
Şekil 3.3. Aranılan fare geninin özellikleri ile ilgili sayfa	63
Şekil 3.4. Aranılan fare geninin sekansı	64
Şekil 3.5. Blastlamanın yapıldığı web sayfa	64
Şekil 3.6. Blastlamanın yapılacağı web sayfası.....	65
Şekil 3.7. Blastlamanın yapılacağı web sayfasının format kısmı.....	65
Şekil 3.8. Aranılan fare geni için yapılan blastlama sonucu	66
Şekil 3.9. Aranılan fare geni için, homoloji’nin gösterildiği sayfa	66
Şekil 3.10. Primer tasarlamak için kullanılan site	67
Şekil 3.11. Primer tasarlamak için kullanılan sitenin özellikleri.....	67
Şekil 3.12. Tavsiye edilen primerlerin olduğu sayfa	68
Şekil 3.13. Left (forward) primerin blastlama sonucu.....	68

Şekil 3.14. Left (forward) primerin blastlama sonucundaki homolojinin gösterimi.....	69
Şekil 3.15. Right (revers) primerin blastlama sonucu	69
Şekil 3.16. Right (revers) primerin blastlama sonucundaki homolojinin gösterimi.....	70
Şekil 3.17. cDNA'dan üretilcek olan DNA parçası (cDNA probu)	70
Şekil 3.18. cDNA probu için yapılan blastlama sonucu	71
Şekil 3.19. 14,5 günlük fare embriyosundaki organ ve yapıların yerlerinin gösterimi	80
Şekil 3.20. Tecan Genesis platformu	81
Şekil 3.21. Slaytların hazırlanma şekli	82
Şekil 3.22. (A) Slâyt kaplama makinesi, (B) Slâytları incelemede kullanılan mikroskop (C) Slâytların taramasının yapıldığı scanner cihazı	87
Şekil 3.23. Genepaint.org sorgu ve sonuç sayfası	88
Şekil 4.1. Spesifik CA genleri için yapılan cDNA problemlerine ait agaroz elektroforezi sonucu	93
Şekil 4.2. Spesifik karboksilaz genleri için yapılan cDNA problemlerine ait agaroz elektroforezi sonucu	93
Şekil 4.3. Car1 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	94
Şekil 4.4. Car2 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	95
Şekil 4.5. Car3 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	96
Şekil 4.6. Car4 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	97
Şekil 4.7. Car5a geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	98
Şekil 4.8. Car5b geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	99
Şekil 4.9. Car6 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	100

Şekil 4.10. Car7 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	101
Şekil 4.11. Car8 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	102
Şekil 4.12. Car10 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	103
Şekil 4.13. Car11 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	104
Şekil 4.14. Car12 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	105
Şekil 4.15. Car13 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	106
Şekil 4.16. Car14 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	107
Şekil 4.17. Car15 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	108
Şekil 4.18. Acaca geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	109
Şekil 4.19. Acacb geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	110
Şekil 4.20. Pcx geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	111
Şekil 4.21. Mccc1 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	112
Şekil 4.22. Pcca geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	113
Şekil 4.23. Pccb geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	114
Şekil 4.24. Ggcx geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	115
Şekil 4.25. Paics geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar	116

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	21
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	54
Çizelge 3.2 Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı	75
Çizelge 3.3. Antisens mRNA üretimi için eppendrof tüpüne yapılan pipetlemeler	77
Çizelge 3.4. Dnase karışımın hazırlanması	77
Çizelge 3.5 <i>In situ</i> hibridizasyon işlemlerinin basamaklar halinde gösterilmesi	85
Çizelge 4.1. Çalışılan genlere ait spesifik primerler ve cDNA probuna ait bilgiler	90
Çizelge 4.2. 14,5 günlük fare embriyosundaki <i>in situ</i> hibridizasyon sonuçları	95

1.GİRİŞ

1.1. Gen Ekspresyonu

Gen'den proteine bilgi akışı değişik adımları içermektedir. DNA'da saklanan kalıtsal bilginin, özgün yapı ve fonksiyonları olan polipeptidlere dönüştürülmesi gereklidir. Ancak DNA, bu iş için tek başına bir başlangıç oluşturamaz. Önce DNA'daki baz çiftlerinin dizileri, RNA'nın bilgi aktaran haberci moleküllerine geçirilir (Transkripsiyon). Bunlar gen ürünleri için bir başlangıç oluştururlar. Son basamakta oluşan polipeptidlerin amino asit dizilimleri, mRNA'daki kodon dizilimlerine karşılık gelirler (Translasyon).

1.1.1. Transkripsiyon

Bu işlem, DNA'daki nükleotid baz dizisinin, RNA'da karşıt gelen diziye çevrilmesidir. Önce, DNA'nın bir iplikçisindeki nükleotid dizisi, ona karşıt komplementer RNA molekülüne dönüştürülür, DNA heliksi açılır ve 3'-5' yönündeki DNA iplikçisi, RNA'ya dönüşüm için bir başlangıç oluşturur. RNA, 5'-3' yönünde sentezlenir. Translasyon için kullanılan RNA iplikçisi, kodlayan DNA iplikçisi ile aynı oryantasyona sahiptir. Transkripsiyon, kompleks enzimler aracılığı ile gerçekleşir.

Gen ekspresyonundaki ilk adım, bir DNA iplikçisinin, komplementer RNA'ya dönüşümü yani 'transkripsiyon'dur. Transkripsiyon faktörleri denilen bir çok protein bir transkripsiyon kompleksi oluşturur ve bu kompleks, DNA'ya bağlanır. Transkripsiyon, RNA polimeraz enzimi ile katalizlenir. Ökaryotlardaki RNA polimerazlar kompleks proteinlerdir ve üç farklı enzim ihtiva ederler. Transkripsiyon, DNA'nın spesifik bir pozisyonundan başlar. Bu pozisyon, bir genin hemen başlangıcında (5' ucunda)'dır. Transkripsiyon başlangıç noktası "promoter" olarak isimlendirilir. Promoter kısa bir DNA nükleotid dizisi olup, RNA polimeraza bağlanarak, transkripsiyonun başlamasını düzenlemektedir. Transkripsiyon başlama noktasının hemen üzerinde iki belirgin

promoter bölgesi tanımlanabilir. Bu diziler, çok iyi korunmuşlardır (consensus sequences). Prokaryotlarda, altı bazlık (TATAAT) ve (TTGACA) şeklinde diziler, genin başlangıcından sırasıyla 10 ve 35 bazlık mesafelerde yer alırlar ve "box" (kutu) olarak tanımlanırlar. Ökaryotlarda, bu promoter dizilerde farklılık bulunmaktadır. Başlangıçta, RNA polimeraz, DNA çift sarmalına bağlanır. Bu noktada DNA açılmaya başlar ve RNA sentezi uzama ile devam eder. Polimeraz DNA boyunca hareket ettikçe, RNA oluşur. Polimerazın hemen ardından, DNA tekrar kapanmaya başlar. Sonunda, RNA polimeraz, DNA'dan uzaklaştırılır. Bu noktada, durağan olmayan öncül transkriptin oluşması tamamlanır. Durağan olmadığından hemen modifikasyona uğrar.

Ökaryotların, üç tane RNA polimerazı vardır, bunlar pol I, pol II, pol III'dür. Bu enzimler üç farklı gen sınıfını transkribe ederler. Düzenleyici diziler, oldukça kısa DNA dizilerinden oluşurlar. Her dizi, transkripsiyon faktörleri olan bir spesifik protein için bir bağlanma noktası oluşturur.

RNA polimeraz I, nükleolde bulunur, 5S, 8S, 18S ve 28S'lik ribozomal RNA'ların karşılığı olan genleri kopya eder. Nükleol aynı zamanda ribozomların olduğu mekandır. Sitoplazmada sentezlenen ribozomal proteinler buraya taşınarak ribozomlar inşa edilir. Ribozomlar daha sonra nükleus membranındaki gözeneklerden (pores) geçerek sitoplazmaya yani görev yaptıkları bölmeye transfer olurlar. 5S rRNA ve diğer bütün tRNA'larla birlikte bazı küçük nükleer ve sitoplazmik RNA'lar nükleoplazmada bulunan RNA polimeraz III tarafından sentezlenir. mRNA'ların ön bileşikleri olan büyük uzun RNA zincirleri ise (hnRNA'lar), yine nükleoplazmada yer alan RNA polimeraz II tarafından yapılır. Küçük nükleer RNA genlerinin önemli bir bölümü de yine RNA polimeraz II tarafından transkripsiyona uğrar. Bakteriyal RNA polimeraz ise bütün RNA çeşitlerini sentezler (Keha and Küfrevioğlu 2004).

1.1.2. Translasyon

mRNA'daki, kodonları oluşturan nükleotid dizileri, translasyon sırasında amino asit sekansına dönüştürülür. Translasyon başlangıç kodonunda (AUG) başlar. Amino asitler transfer RNA (tRNA) ile sıralanarak dizi tanımlanır. Her amino asidin, kendine spesifik tRNA'sı vardır. Bu tRNA'nın antikodon kısmı, mRNA'daki kodona antiparalel komplementerdir (anti-kodon). Yapılan araştırmalar, farklı hücre tiplerinde 30 ve 50 çeşit tRNA bulunduğunu göstermiştir. mRNA üzerinde amino asitleri şifreleyen 61 çeşit kodon mevcut olduğuna göre, 2 alternatif ortaya çıkmaktadır: ya her kodon her mRNA'da kullanılmaktadır veya bir tRNA birden fazla kodona bağlanabilmektedir. İncelemeler ikinci şıkkın doğru olduğunu göstermiştir. Mesela, antikodon dizilişi GAA olan tRNA^{Phe} hem UUU, hem de UUC kodonlarına bağlanabilmektedir. Kodon-antikodon eşleşmesinin antiparalel olduğu göz önüne alındığında,

tRNA	3' AAG 5'	3' AAG 5'
mRNA	5' UUU 3'	5' UUC 3'

eşleşmelerinden, antikodonun 5' bazının bazen Watson-Crick tarzından sapma gösterdiği görülmektedir. Yapılan araştırmalar antikodonun 5' bazlarının mRNA kodonlarının 3' bazlarıyla aşağıdaki gibi eşleşerek, bir çeşit tRNA'nın birden fazla kodona bağlanabilmesini sağlamaktadır. Bu olaya "wobble" hipotezi, antikodonun 5' bazına da "wobble" bazı denilmektedir (Keha and Küfrevioğlu 2004).

<u>Wobble bazı</u>	<u>3' kodon bazı</u>
G	U veya C
U	G veya A
I	U, C veya A
A	yalnız U
C	yalnız G

Translasyon (protein sentezi) hücre çekirdeği dışında, sitoplazmada ribozomlarda oluşur. Ribozomlar, protein ve RNA moleküllerinden (rRNA) meydana gelir. Translasyon başlangıcında mRNA, ribozom ve tRNA kompleksi oluşur. Bu olay prokaryotlarda IF1, IF2, IF3 vb. başlatıcı faktörlere ihtiyaç duyar.

İkinci basamak elongation (uzama) evresidir. Bir sonraki kodon tarafından belirlenen amino asit, diziye eklenir ve üç fazlı bir uzama siklusu gelişir. Kodon tanınması, bir sonraki amino aside peptid bağlanması ve ribozomun mRNA'nın 3' yönüne doğru hareketidir. mRNA'da stop kodonlarından (UAA, UGA ve UAG) birisine ulaşıldığında translasyon sona erer. Oluşan polipeptid zinciri, ribozomu terk eder.

Polipeptid zincirlerinin çoğunda kovalent modifikasyon (değişim) lar meydana gelir. Bu değişimler ya polipeptid zinciri ribozom üzerindeyken veya sentez tamamlanıp ribozomdan ayrıldıktan sonra olabilir. Değişimler translasyon başladıktan sonra ortaya çıktığı için, bunlara “post-translasyonel (translasyon sonrası) modifikasyonlar” denmiştir. Polipeptid zincirinden bazı amino asit dizilerinin uzaklaştırılması, protein aktivitesi için gerekli bazı kimyasal grupların kovalent bağla eklenmesi gibi değişimler olabilir. Post-translasyonel modifikasyonlara ait bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

Hücre dışına salgılanmak üzere sentezlenen proteinlerin çoğu önce büyük, öncül moleküller halindedir. Bu öncül moleküller hücre içinde inaktiftirler. Özelleşmiş bazı endoproteaz enzimleri ile protein zincirlerinden bazı kısımlar uzaklaştırılır. Böylece aktif protein molekülü oluşur ve hücre dışına salınır. Zimojenler salgılanan enzimlerin inaktif halidir. Zimojenler etki edecekleri yere gelince kırılarak aktifleşirler. Örneğin; pankreatik bir zimojen olan tripsinojen ince bağırsaklarda aktif tripsin haline dönüşür. Enzimlerin zimojen halinde sentezlenmesi, hücrenin kendi ürünleri tarafından hazmedilmesini önler.

Enzimler ve yapısal proteinlere çeşitli kimyasal gruplar, kovalent olarak bağlanabilir. Böylece bu maddeler aktiveşebilir veya inaktifleşebilirler. Böyle modifikasyonlara ait bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

Protein yapısında bulunan serin, treonin amino asitlerinin hidroksil gruplarında daha az olarak da tirozinde fosforilasyon görülür. Bu fosforilasyon reaksiyonlarını bir grup protein kinaz enzimleri katalizler. Defosforilasyonu ise yine hücre içinde bulunan protein fosfatazlar gerçekleştirir. Fosforilasyon sonrası proteinin fonksiyonel aktivitesi artabilir veya azalabilir.

Hücre zarının yapısına katılacak veya hücre dışına salgılanacak proteinlerin çoğunda karbohidrat zincirleri vardır. Karbohidrat'lar serin veya treonin amino asitlerinin hidroksil gruplarına (O-bağı) veya asparagin'in amino grubuna (N-bağı) bağlanmıştır. Endoplazmik retikulum ve Golgi cihazında şekerler sırasıyla takılırlar. Bu olaya glikozilasyon denir.

Kollajen'in α -zincirlerinde bulunan prolin ve lisin amino asitleri endoplazmik retikulumda hidroksillenir. Bu olaya hidroksilasyon denir.

Diğer kovalent modifikasyonlar arasında bir proteinin fonksiyonel aktivitesi için gerekli olan modifikasyonlar sayılabilir. Örneğin; bir vitamin olan biyotin, karboksilaz enzimlerine kovalent olarak bağlanır. Ancak bundan sonra bu enzimler katalitik aktif olurlar (Champe and Harvey 1997).

1.2. Gen Ekspresyonunun Denetimi ve Düzenlenmesi

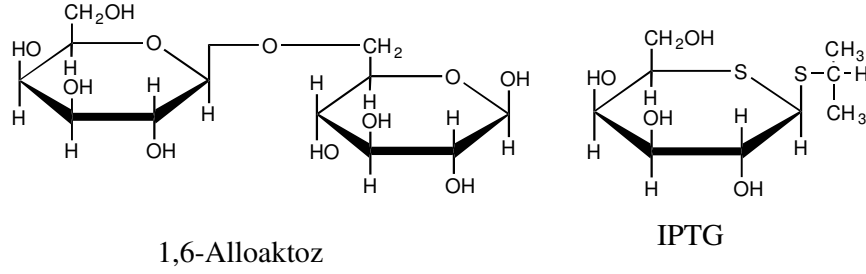
Ökaryot ve prokaryotlardaki genetik bilgilerin proteine dönüştürülmesinin, yani, genetik ifadenin (genetic expression) denetimi ve düzenlenmesinde, en önemli basamak transkripsiyonun başlangıç safhasıdır. Hücrelerin her proteine, her anda aynı oranda ihtiyacı bulunmaz. Beslenme ortamının, içinde bulunduğu şartların, dışarıdan alınan sinyallerin ve özellikle çok hücrelilerdeki her bir hücrenin fonksiyon ve yapı farklılığının sonucu olarak, bazı metabolik yolların hızlanması ve bazılarının da yavaşlaması icap eder. Dolayısıyla buralarda görev alan proteinlerin ve enzimlerin sentezlerinin baskılanması veya aktif hale getirilmesi gerekir (Küfrevioğlu 2003).

Prokaryotlarda "operon" modeliyle bazı örnekleri açıklanan transkripsiyonun bu düzenlenme mekanizması, çok hücreli ökaryotlarda çok daha karmaşık ve bir çok faktörün rol aldığı bir olaydır. Aslında bir genin yapısında, transkripsiyonunu düzenleyen "transkripsiyon elementlerini (TE)" de içinde bulundurur. Promoterler, RNA polimerazları bağlayan ve transkripsiyonun başlangıç noktasını belirleyen; transkripsiyon elementleri ise, transkripsiyon faktörleri (TF) adı verilen çeşitli proteinleri bağlayarak transkripsiyon hızını düzenleyen DNA üzerindeki dizilişlerdir. TE'ler ökaryotik protein genlerinde +1 noktasından önce, mRNA kodlayan dizilişlerinden sonra ve hatta bu dizilişlerin içindeki intronlar da bile yer alabilir. Bazen TE, promoter bölgeden binlerce baz ötede bulunabilir ve daha başka genlerin kontrolünde de rol oynayabilir. TE'ler; bazı hormon ve sinyallere cevabın (HRE-hormone response element), transkripsiyonun hızlandırılmasının (enhancers) ve yavaşlatılıp, baskılanmasının (silencers, repressors) düzenlendiği DNA bölgeleri olarak sınıflandırılabilir. Bu bölgelere, hormon-reseptör komplekslerinin de aralarında bulunduğu, birbirinden farklı yapıda olan ve farklı şekillerde aktiveleştirilen yüzlerce çeşit transkripsiyon faktörlerinden bir veya birkaçı bağlanarak, ökaryotik genetik ekspresyonu düzenler (Küfrevioğlu 2003).

Ökaryotlardaki gen ekspresyon regülasyonu, potansiyel olarak pek çok seviyede olabilir; (1) transkripsiyonel kontrol (2) transkripsiyon sonrası kontrol (öncül-mRNA'nın işlenmesi gibi), (3) sitoplazmaya aktarım, (4) mRNA kararlılığı, (5) translasyonel kontrol (hangi mRNA'nın translasyona uğrayacağını seçimi), (6) protein ürünlerinin translasyon sonrası değişiklikleridir (Klug 2000).

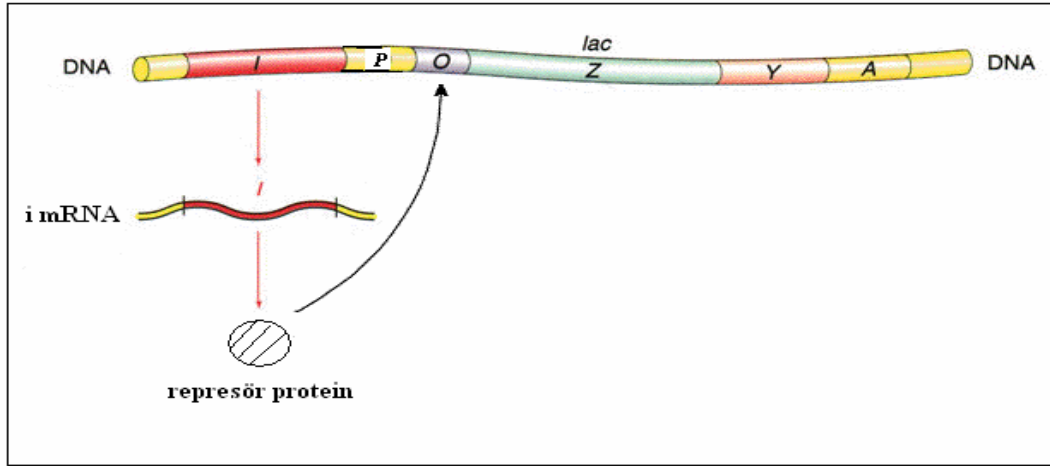
Prokaryotlardaki genetik ifadenin düzenlenmesi mekanizmasının operon modeliyle açıklandığı yukarıda ifade edilmişti. Operonlar bakterilerde çok sayıda genlerin kümелendiği ve bu genlerin regülasyonunu da sağlayan dizilişleri taşıyan DNA bölgeleridir. Bakterilerde açıklığa kavuşturulan ilk operon *E.coli*'deki laktoz operonudur (lac operon). *E.coli*, karbon kaynağı olarak laktozu kullanabilir. Bu şekerin metabolizmasında rol alan en önemli enzim, laktozu galaktoz ve glukozu hidrolizleyen β -galaktozidaz'dır. Laktozlu bir ortamda yaşayan bir *E.coli* hücresi bu enzimden binlerce molekül ihtiva eder. Karbon kaynağı olarak gliserol veya glukoz gibi başka bileşikler kullanan bakterilerde β -galaktozidaz moleküllerinin sayısı çok daha azdır. Yani β -galaktozidaz indüklenebilir bir enzimdir. Bu enzim ile birlikte, aynı gen tarafından galaktosit permeaz ve tiyogalaktosit transasetilaz enzimleri de sentezlenir. Permeaz, laktozun bakteri hücresi membranından geçişini sağlayan bir transport proteini iken, transasetilazın hücrede laktozun sindirilmesi ile ortaya çıkan toksik yan ürünlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Küfrevioğlu 2003; Klug 2000).

E.coli'de bu enzimlerin fizyolojik indükleyicisi olarak laktozun transglukasyonu ile oluşan allolaktoz görev yapmaktadır (Şekil 1.1). Bu bileşiğin oluşumu indüksiyon öncesi hücrede mevcut olan az miktarda β -galaktozidaz molekülleri tarafından katalizlenmektedir. Yapılan çalışmalar izopropiltiyogalaktosid (IPTG) gibi metabolize olmayan bazı bileşiklerin de indükleyici olduğunu göstermiştir (Küfrevioğlu 2003).

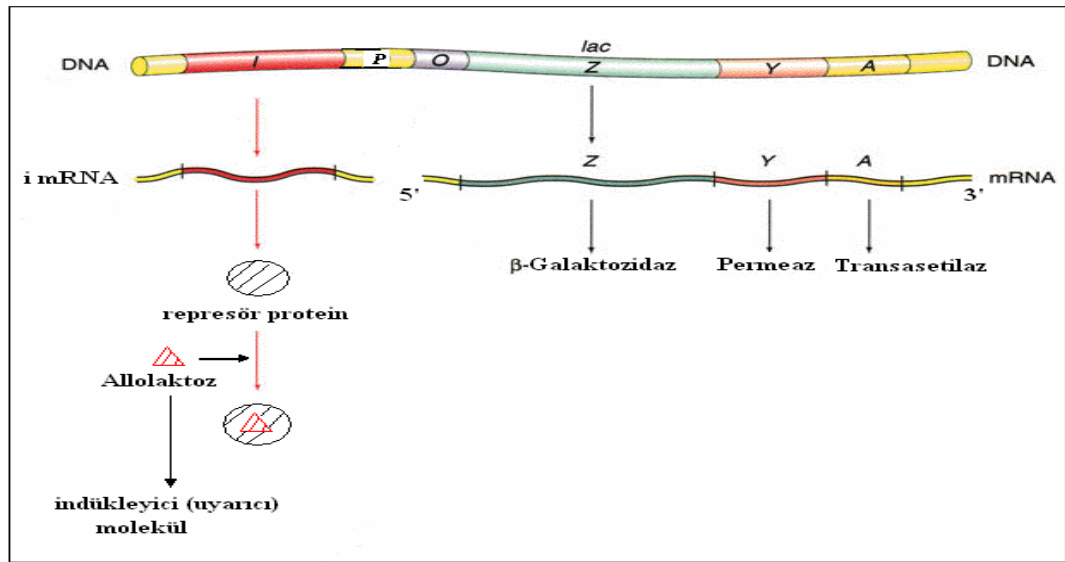


Şekil 1.1. 1,6-Allolaktoz ve IPTG'nin açık formülleri.

Söz konusu olan laktoz operonunun genetik elemanlarını bir regülatör (düzenleyici) gen, bir operatör gen ve bir seri yapısal genler oluşturmaktadır. Regülatör gen, operatör genle etkileşebilen ve protein yapısında molekül olan bir represör meydana getirir. Operatör gen kontrol ettiği yapısal genlerin bitişiğinde bulunur. Operatör gen ve beraberindeki yapısal genlere bir arada operon adı verilir. Laktoz operonunda “i geni” regülatör geni, “o geni”, operatör geni, “z, y ve a” genleri de yapısal genleri temsil etmektedir. Ayrıca RNA polimerazın bağlanması için “p” ile gösterilen bir promoter bölgesi vardır. *E.coli* ortamında laktoz yoksa “i geni”nden mRNA sentezlenir bundan da represör protein oluşur represör protein “o” operatör gene bağlanması RNA polimerazın aktivitesini engeller ve böylece z, y, a yapısal genlerin transkripsiyonu engellenir (Şekil1.2). Laktozlu ortamda *E.coli*'nin laktozu içeri taşıması ve sindirmesi gerektiğinden hücre içerisinde allolaktoz sentezlenir allolaktoz represör proteine bağlanarak onu ortamdan uzaklaştırır uzaklaşan represör “o geni”ne bağlanamayınca yapısal genler transkripsiyona uğrar daha sonra proteinler sentezlenir (Şekil 1.3). Bu durumda laktozun, bu enzimler ile hücreye taşınması, parçalanması ve sindirimi gerçekleşmiş olur (Lehninger 2005; Lodish 2001; Keha and Küfrevioğlu 2004; Klug 2002).



Şekil 1.2. Laktoz operonunda baskılama mekanizması.



Şekil 1.3. Laktoz operonunda indüklenme mekanizması.

P : promoter bölge (RNA polimerazın bağlandığı bölge).

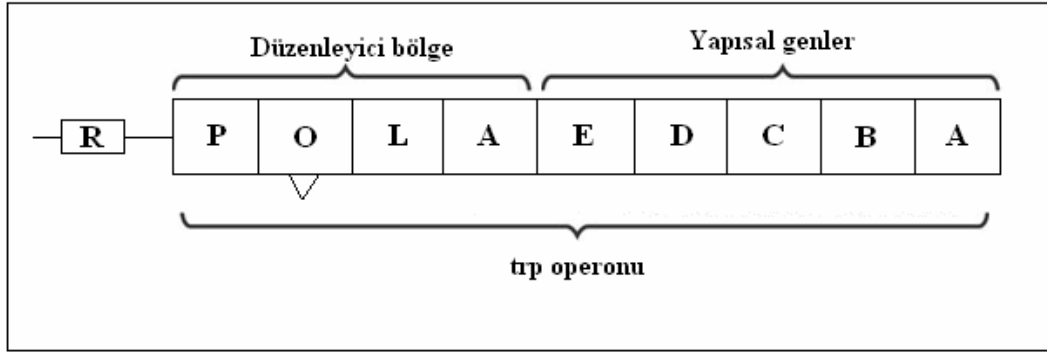
O : operatör bölge

lacZ : β-galaktozidaz geni

lacY : permeaz geni

lacA : transasetilaz geni

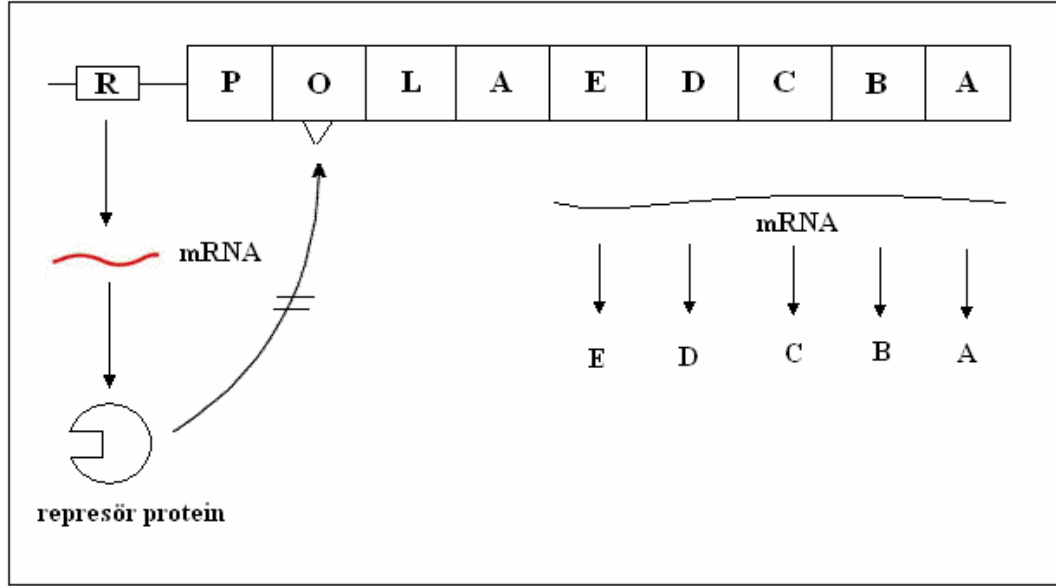
E.coli'de triptofan biyosentezinde yer alan enzimlerin genleri farklı bir operon oluşturur. Enzimlerin ortamda bulunuşunu bu operon kontrol eder. Uyarılabilen *lac* operonunun aksine *trp* operonu baskılanabilen bir sistemdir (Şekil 1.4). Ortamda triptofan varsa, oluşan aktif baskılayıcı, yapısal genlerin ekspresyonunu kapatır (Klug 2002).



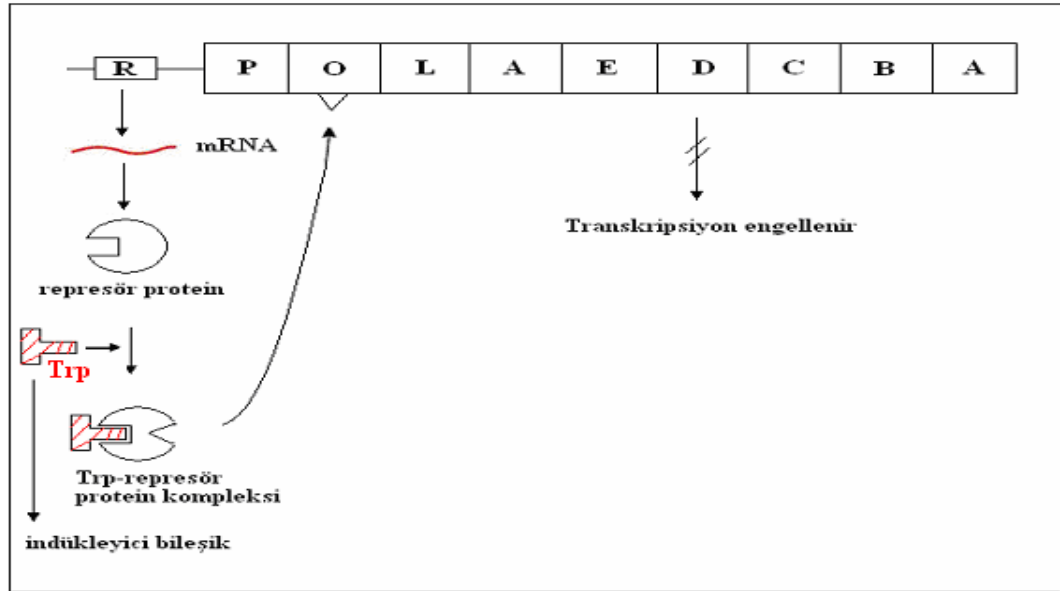
Şekil 1.4. *E.coli*'de triptofan operonu.

- R : represör proteini kodlayan gen
- P : promoter bölge
- O : operatör bölge
- L : lider dizi
- A : attenuatör
- E, D, C, B ve A : yapısal genler

Triptofanın sentezini sağlayan başlıca beş yapısal gene karşılık gelen protein tek başına sentezlenir. Triptofan operonu *lac* operon modelinden farklılık gösterir. *Lac* operonunda “I” genine karşılık gelen represör protein oluşuktan sonra “O” genine bağlanarak yapısal genlerin transkripsiyonunu önlemekteydi. Triptofan operonunda ise “R” genine karşılık represör bir protein oluşur. Ortamda triptofan yoksa bu “O” genine bağlanamaz bağlanamayınca yapısal genlerin transkripsiyonu gerçekleşir (Şekil 1.5). Triptofanın varlığında ise direkt olarak triptofanın represör proteine bağlanmasıyla konformasyonu değişerek “O” genine bağlanır ve bunun sonucu olarak yapısal genlerin transkripsiyonu engellenir (Şekil 1.6).



Şekil 1.5. Triptofan operonunda yapısal genlerin indüklenmesinin gösterimi.



Şekil 1.6. Triptofan operonunda yapısal genlerin baskılanmasının gösterimi.

Triptofan operonunda düzenleyici bölgede lider dizisi (L) adı verilen bir bölgenin olduğu ve lider dizi içerisinde Attenuatör (A) adı verilen bir bölgenin olduğu belirlenmiştir. Attenüasyon güç kaybı anlamına gelmektedir. Yüksek triptofan konsantrasyonunda attenuasyon gerçekleşir. Prokaryotlarda transkripsiyon ve translasyon eş zamanlı olarak gerçekleşir. Buna göre, yüksek triptofan konsantrasyonunda lider dizinin üzerinde transkripsiyonun devam ettiği ancak 140 nükleotid sentezlendikten sonra mRNA sentezinin sonlandığı görülmüştür, bu sırada eş zamanda translasyon gerçekleşmekte translasyon sırasında triptofana karşılık gelen UGG kodonlarının bulunduğu bölgeden geçilerek protein sentezi UGA stop kodonunda durmaktadır. Bu olay lider dizi üzerinde olur bu olay sonunda lider diziye karşılık gelen mRNA saç tokası şeklini alan bir yapı kazanarak transkripsiyonun devamı engellenir. Düşük triptofan konsantrasyonunda ise yine lider dizi üzerinde transkripsiyon devam ederken eş zamanlı olarak translasyon da devam etmektedir.

Triptofana karşılık gelen UGG kodonlarına gelindiğinde bunlara karşılık amino asit taşıyan tRNA olmadığından ribozom duraklar ve protein sentezi hemen gerçekleşmez. Bunun sonucu olarak mRNA üzerinde saç tokası yapısı oluşmaz attenuasyon aşılar, lider diziden sonraki beş yapısal gen birbiri ardına transkripsiyona uğrar (Lodish 2001; Klug 2002; Keha and Küfrevioğlu 2004; Lehninger 2005).

1.3. Gen Ekspresyon Analiz Yöntemleri

Gen ekspresyonunu belirleyecek klasik yöntemler hala önemlerini taşımaktadırlar. Bu yöntemler, bir spesifik genin ekspresyonunu belirleyecek biyokimyasal veya fenotipik değişiklikleri ortaya çıkarır. Teknolojik ilerlemeler, spesifik bir genin ürününü veya protein molekülünü incelememizi mümkün kılmaktadır.

DNA teknolojisinin gelişmesiyle; herhangi bir genin transkripsiyonel ürününü analiz etmek ve belirlemek mümkün hale gelmiştir. Spesifik RNA moleküllerini incelemek için; *În situ* hibridizasyon, northern blotting tekniği, gen arrayleri, dot veya slot-blotting tekniği, S-1 nükleaz incelemesi, RNA'az protection incelemesi ve PCR gibi yöntemler kullanılabilir.

Gen ekspresyonunun kantitatif ölçümü için kullanılan northern blotting tekniğinin daha duysız olması, mikrogram düzeyinde RNA'ya gereksinme göstermesi gibi dezavantajları bulunduğundan, PCR tekniği ile gen ekspresyonunun kantitatif ölçümü geliştirilmiştir.

Bir genin ne zaman, nerede ve ne kadar ekspresyona uğrayacağı, transkripsiyonel ve translasyonel düzenlenmeye, mRNA ile protein transferine ve gen ürünlerinin yarılanma ömürlerine bağlıdır. Geniş bir genom skalası üzerinde ekspresyon haritalarını belirlemek için teknolojiler geliştirmek için çok gayretler sarf edilmektedir. En yaygın teknolojik metotlardan biri mikroarraylerdir (Küfrevioğlu 2003). Bu metodun özünde bir cam lam veya naylon zar üzerine kısa yüzlerce/binlerce DNA hedef dizilimlerinin yerleştirilmesi ve incelenecek cDNA'nın fluoresans/radyoaktif işaretlemenin ardından mikroarray yüzeyine yerleştirilmiş DNA ile hibridize edilmesi yatmaktadır. Bu yöntemde farklı dokulardan (Örnek olarak kanserli ve sağlıklı doku) mRNA'lar saflaştırılır, revers transkriptaz enzimi ve diğer kimyasallar yardımıyla cDNA'lar üretilir. Her bir doku türü farklı fluoresans madde ile işaretlenir ve

mikroarray yüzeyindeki DNA'lar ile hibridize edilir. Daha sonra mikroarray lazer tarayıcı ile taranır ve sonuçlar biyoinformatik yöntemlerle analiz edilir.

RNA *in situ* hibridizasyonu, sistematik olarak 1980'lerin ortasından itibaren kullanılmaktadır. Bu metod temel olarak basit bir prensibe dayanmaktadır; dokular veya dokuların bir kısmı, işaretlenmiş sentetik DNA veya işaretlenmiş antisens RNA problemleri ile muamele edilir. Doku içerisindeki mevcut sens mRNA, prob ile hibridizasyona uğrar; daha sonra otoradyografi veya immunohistokimya gibi belirleme reaksiyonları ile transkriptin doku ve sellüler lokalizasyonu ortaya çıkarılır. RNA *in situ* hibridizasyonu, örnek yeterince küçükse örneğin bütün miktarında (fare embriyosu gibi) veya örneğin belirli kısımlarında (fare beyni gibi) gerçekleştirilir (Küfrevioğlu 2003).

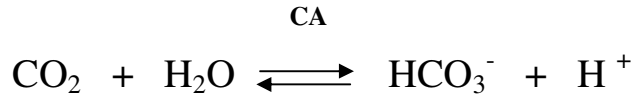
Antikorlar, doku örneklerinde proteinleri lokalize ve karakterize etmek için kullanılmaktadır. Prensip olarak proteinlerin antikor lokalizasyonu, RNA *in situ* hibridizasyonuna tercih edilir; çünkü gen fonksiyonu mRNA'larda değil, proteinlerde ortaya çıkar. RNA ve proteinlerin lokalizasyonları, sekresyona uğrayan proteinlerde olduğu gibi, farklılık gösterebilir. RNA, gen ekspresyonu yapan hücre içinde bulunurken; protein, sentezlendiği kısımdan belirli bir mesafe uzaklıkta olan dokularda mevcut olabilir. Örnek olarak, peptid hormonları kanda mevcut olmasına karşılık, özelleştirilmiş endokrin bezlerinde sentezlenir. Protein dağılımı ve mRNA'ların böyle özel farklılıklarına ek olarak geçici farklılıklar da vardır. Ritmik genler olan mPer1 ve mPer2, 24 saatlik bir ritimle yüksek bir ekspresyonla bir periyodik harita içerisinde ekspresyona uğrarlar. Bu siklik ekspresyon, karşılık gelen proteinlerde de gözlenir; ancak protein pik ekspresyonu yaklaşık 6 saatlik bir fark ile mRNA'ya kıyasla gecikmelidir. Bu yüzden spatiotemporal mRNA ile protein ekspresyon haritaları arasında farklı durumlar bulunmaktadır ve mRNA'ya dayalı ekspresyon verileri yorumlandığında bu durum akılda tutulmalıdır. Buna karşılık, bir hücredeki özel bir transkriptin varlığı, karşılık gelen proteini sentezlemek için potansiyelin var olduğunun bilinmesi gerektiğini vurgulamak gerekir (Albrecht 1998; Gassen 1999; Küfrevioğlu 2003).

Antikor oluşturmak, hem zaman israfı hem de pahalıdır. İdeal olarak doğru posttranslasyonel modifikasyonlu olan protein, immunizasyon için kullanılmak zorundadır ve ayrıca antiserum üretimi için hayvanlar gerekmektedir. Bununla birlikte antikorlar içerisinde sadece bir fraksiyon, immunohistokimyasal lokalizasyon prosedürü için uygundur. Antikorum bu teknik zorluklarına karşılık, RNA problemlerinin kullanımı çok kolaydır. Kısmi gen sekansı bilindiğinde, bunlar hemen *in vitro* reaksiyonlarla basitçe ve ucuz olarak sentezlenebilir (Albrecht 1998; Klug 2002; Küfrevioğlu 2003).

In situ hibridizasyon ve proteinlerin immunolokalizasyonu birçok biyolojik alanda olağanüstü bilgiler sağlar. Örneğin normal ve mutant embriyonlarda gen ekspresyon harita analizleri, embriyonik gelişmenin bütün safhalarını ortaya çıkarmaktadır. Aynı şekilde birçok bileşen ihtiva eden düzenleyici metabolik ağın anlaşılması için, herbir komponentin ekspresyon zamanının ayrıntılı bir şekilde bilinmesi önemli bir avantaj sağlar (Albrecht 1998; Gassen 1999).

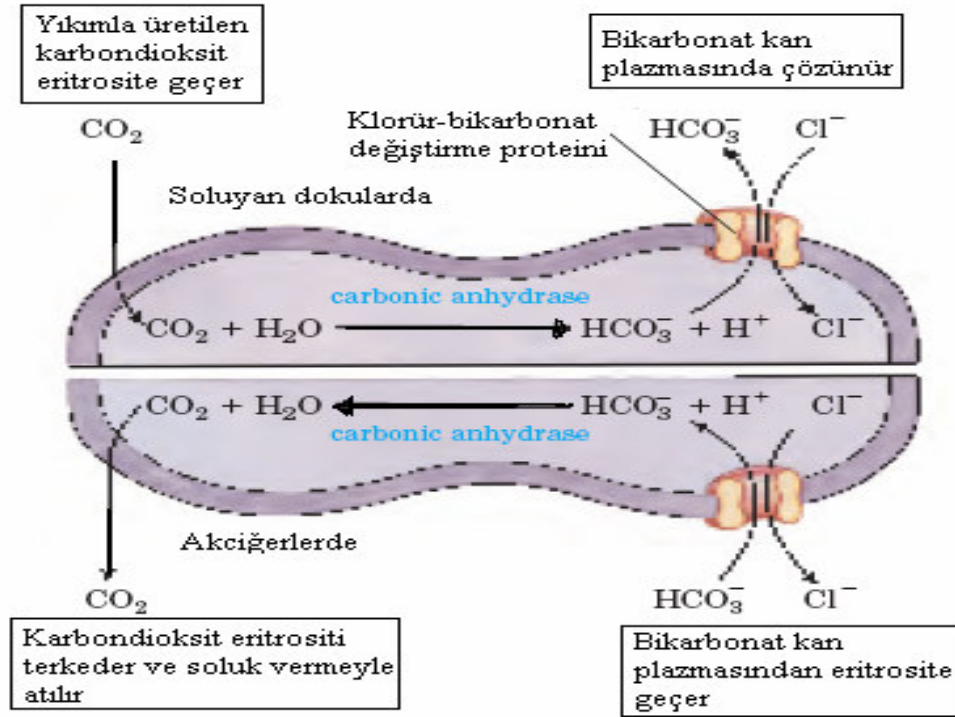
1.4. Karbonik Anhidraz (CA)

Karbonik anhidraz bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir (karbonat hidroliyaz E.C.4.2.1.1). İlk defa sıgır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz (CA), canlılarda CO_2 'nin hidratasyonu ve HCO_3^- 'ın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (Supuran and Scozzafava 2001).



CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir, daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükrüğü, sıgır kemiği, sıgır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Demir *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004).

CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku / organlar ile akciğer arasındaki CO_2 / bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda (Şekil 1.7), pH ve CO_2 homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Chegwidden *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000).



Şekil 1.7. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değişiricisi. Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan HCO_3^- 'ın giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın CO_2 taşıma kapasitesini artırmaktır (Lehninger 2005).

1.4.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Fizyolojik Fonksiyonları

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere izoenzim veya izozim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik pH değerinin farklı olması, her bir alt ünitenin ayrı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler (Devlin 2002).

Hayvanlar aleminde karbonik anhidraz'ın 16 izoenzimi vardır. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi

nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Supuran *et al.* 2003, Supuran *et al.* 2004). CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izozimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimori 2004; Hilvo *et al.* 2005).

İnsanda farklı izoenzimlerin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu dokular arasında; akciğer, böbrek, gastrik mukoza, göz lensi, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokular başta gelmektedir ve bunların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır (Hewett-Emmett 2000; Sugrue 2000).

Genelde insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu izoenzimler ortaya çıkarılmıştır. HCA-I , insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır. Eritrositlerde HCA-I izoenzimi yanında HCA-II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları ise, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO₂'i, HCO₃⁻'a, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO₃⁻ 'ın CO₂ 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır (Şekil 1.7). HCA-I izoenziminin turnover sayısı 2,5 x 10⁵ s⁻¹ 'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu HCA-II kadar açık değildir. HCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Ren and Lindskog 1992; Sly and Hu 1995; Supuran and Scozzafava 2001).

HCA-II izoenzimi karbonik anhidrazın en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 25 °C de 10⁶ s⁻¹ olarak bulunmuştur. İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan HCA-II izoenzimi miktarı 2 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır ve bu değeri HCA-I'e kıyasla daha azdır.

Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, HCA-II ve HCA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan HCA-II izoenziminin önemi, glaucoma

hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. (Renzi *et al.* 2000). Böbrek korteksinde ise membrana yapışık halde olan HCA-II izoenzimi ile Na^+ ve H_2O ' nun geri emilimi sağlanmaktadır. HCA-II izoenzimi ile ilgili olarak CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da; kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da HCA-II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Maren *et al.* 1997).

İskelet kasında CA enzimi olarak HCA-III izoenzimi bulunmuş ve laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kırmızı kas dokusuna CA-III enzimi zayıf bağlı olup, doku kapilerine CO_2 'nin difuzyonunu kolaylaştırıcı bir görev yapmaktadır (Cabiscol and Levine 1996). Düşük aktiviteli bir izoenzimdir ve bu enzimin turnover sayısı $8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Kırmızı kas dokusuna zayıf bağlı olduğundan dolayı, büyük oranda çözünebilir bir proteindir. Aynı zamanda bu izoenzimden yağ dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. HCA-I ve HCA-II izoenzimleri gibi HCA-III de *p*-nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Diğer yandan HCA-III izoenziminin fosfataz aktivitesi de vardır (Engberg *et al.* 1985).

HCA-IV ve HCA-VI ise, iki sinyal sekans izoenzimleri olup, sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasını sağlarlar. HCA-IV izoenzimi membrana bağlı bir enzimdir ve böbreklerin membranına bağlı olarak bulunduğu gibi, bazı epitel hücrelerin membranlarına bağlı olarak ve akciğerde kapiler hücrelerinin plazma yüzeylerine yerleşmiş olarak bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığını göstermiştir. Bu durum mitokondriyal CA enzimi olan HCA-IV 'ün, sitrulin sentezi için gerekli olan HCO_3^- iyonunu, sitrik asit devrinden gelen CO_2 'den sağlayarak, üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanmaktadır. Bu enzim glikozilfosfatidil inositol bileşiğinin Ser-284'e bağlanmasıyla membrana tutunmaktadır. Bu bağlanma bir 28 rezidümlük C-terminal fragmenti tarafından gerçekleştirilir (Okuyama *et al.* 1995).

HCA-V izoenzimi de, bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunur. Karbamoil fosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlamasından dolayı, üre devri ve glukoneogenez’de rol oynadığı öngörülmektedir. Bu izoenzimin ayrıca lipogenez olayında da etkili olduğu bildirilmiştir (Hazen *et al.* 1996). Tükrük bezinde CA enzimi olarak HCA-VI ve HCA-VII izoenzimi vardır. HCA-VI izoenzimi, tükrük bezlerinden salgılanan bir enzimdir. İnsan tükrüğünden izole edilmiş olup, tükrüğün pH dengesini sağladığına inanılmaktadır. HCA-VII izoenzimi ise, tükrükte bikarbonat salgılanması için katkıda bulunmaktadır (Lakkis *et al.* 1996).

Yapılan çalışmalar sonucunda; insan CA-I, CA-IV ve CA-VII izoenzimlerinin gen ve amino asit dizilişlerinin oldukça birbirine benzer olduğu gözlenmiştir. Bu CA izoenzimlerinin fonksiyonlarına ilaveten, homolog proteinlerin amino asit dizilişlerinin pek çoğu tespit edilmiştir. Bunlardan ilki Vaccinia virüsünden elde edilen 32 kdal’ luk bir membran proteininin N-terminal bölgesiyle ilgili olduğu belirlenmiştir. Bu, proteine bağlı bir enzimdir (CARP) (Maa *et al.* 1990). CA-VIII enzimi de sıçan beyninden elde edilen bir cDNA kütüphanesinde keşfedilmiştir. İnsan cDNA homologlarının amino asit dizilişleri de tespit edilmiştir (Sjoblom *et al.* 1996).

CA enzimi balıkların solungaçlarında bulunmakta ve solunumun gerçekleşmesini sağlamakta ve aynı zamanda salgı organlarında da büyük görev yapmaktadır. Bazı hayvanların böbreklerinde ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde bu enzimin değişik rolleri olduğu belirlenmiştir (Henry and Swenson 2000).

1.4.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO_2 'in hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir (Çizelge 1.1) (Supuran and Scozzafava 2001).

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

(1)	$\text{O}=\text{C}=\text{O}$	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	HCO_3^-	+	H^+
(2)	$\text{HN}=\text{C}=\text{NH}$	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	H_2NCONH_2		
(3)	RCHO	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	RCH(OH)_2		
(4)	RCOOAr	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	RCOOH	+	ArOH
(5)	RSO_3Ar	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	RSO_3H	+	ArOH
(6)	ArOPO_3^{-2}	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	HPO_3^{-2}	+	ArOH
(7)	ArF	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	HF	+	ArOH
(8)	PhCH_2OCOC	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	PhCH_2OH	+	$\text{CO}_2 + \text{HCl}$
(9)	RSO_2Cl	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	RSO_3H	+	HCl

(R = Me ; Fenil)

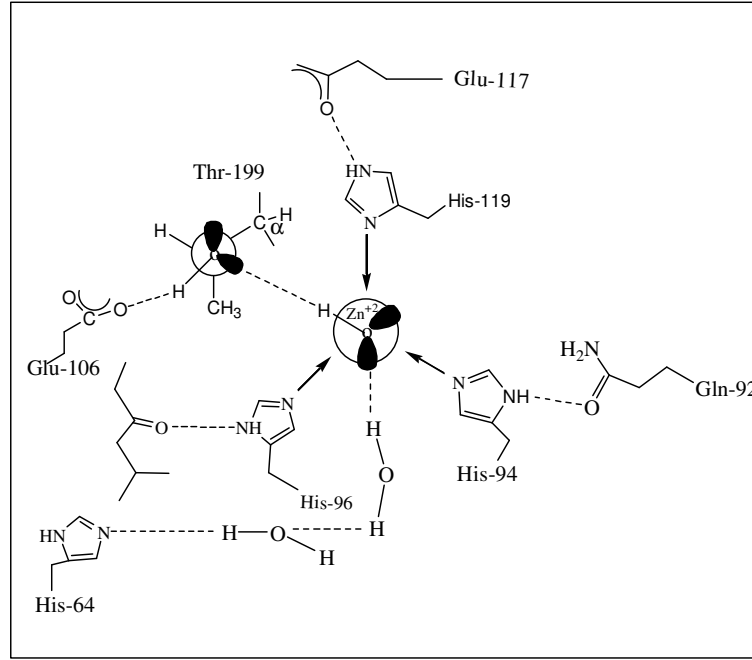
(Ar = 2,4-dinitrofenil)

1.4.3. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları

Karbonik anhidrazlar, α -CA, β -CA ve γ -CA olmak üzere üç farklı familyada incelenmiştir. Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimler arasında önemli bir fark yoktur, aksine bunların hepsinde çinko iyonu vardır. Bundan dolayı bu familyaların hepsi, katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapılardadır (Hewett-Emmett 2000).

Üç boyutlu yapılardan ilki α -CA olup, insan CA-I ve CA-II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA-III, yassı formulu bir sığır CA-V 'i ve *E. coli* de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir. Bir yapı da Hindistan bufalosunun CA-II 'sinde bulunmuştur. Aktif bölge oyuk şeklindedir ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk hemen hemen molekülün merkezine kadar uzanır. Çinko iyonu bu oyukun alt kısmına bitişik durumdadır. Dört ligand gibi H₂O veya OH⁻ ile bir tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119 'daki üç azot atomuyla koordine edilmiştir. Ligandlar protein formundaki bir indirekt ligandın hidrojen bağı ile diğer gruplara bağlanmasıyla oluşurlar (Şekil 1.8) (Lesburg and Christianson 1995).

Metal iyonlu ligandlar ve indirekt ligandların α -CA amino asit dizilişleri sabittir. Bunun yanı sıra 17 amino asitli direkt ve çinko ligandlı indirekt ligandların bütün amino asit dizilişleri çok sıkı şekilde korunmaktadır. Bu rezidülerin bazıları protein yapısını stabilize ederken, bazıları da katalitik aktivite için önemlidir.



Şekil 1.8. HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi

β -CA 'nın yapısı ise şimdiye kadar henüz açıklanamamıştır. Bilinmeyen yapının çapraz bağlanmaları ve bezelye yapraklarındaki mutantların incelenmesi sonucu, bu yapının belirlenen bir alt ünitesinin oktametrik yapısında olduğunu ortaya çıkarmıştır. Mutasyonlar ve X-ray spektroskopisi absorpsiyon sonuçları; ısıpanaktaki Zn (II) iyonu α -CA 'dakinin aksine bir Cys-His-Cys-H₂O grubuyla koordine olmuş bir küre şeklinde olduğunu göstermektedir (Bjorkbacka *et al.* 1997).

γ -CA ise, son araştırmalarda *M. thermophila*'dan elde edilen bir yapı olarak ortaya çıkarılmıştır. Bu trimetrik molekül, α -CA 'daki katlanmalardan tamamen farklı katlanmalara sahip olup ve bu bölge kalıtsal bölgeyi ifade etmektedir. Her bir ünite, her dönüşteki üç kısa iplikçiğin sol el β -heliks yapısının 7 dönüşüyle oluşmaktadır. Bunun sonucunda birbirinin yanında üç tane yassı β -şeridi meydana gelir. Heliksin karşılıklı bölmeleri de üçgen yapısındadır. Çinko iyonu ise alt üniteler arasına yerleşmiş haldedir ve komşu bir alt üniteden His-117, diğer birinden His-122 ve His-81 ile ligand oluşturmuştur. Varsayılan bir su molekülü de bükülmeyi sağlayarak, tetrahedral

koordinasyon yapının oluşmasını sağlar. *M. thermophila* ve insan CA-II izoenzimindeki metal merkezli bu süper pozisyon, olağanüstü derecede benzerlik göstermektedir. Katalitik fonksiyonlarının birbirine yakın olması da, çinko bağlı bölgelerin birbirine benzer olmasından ileri gelmektedir (Kisker *et al.* 1996).

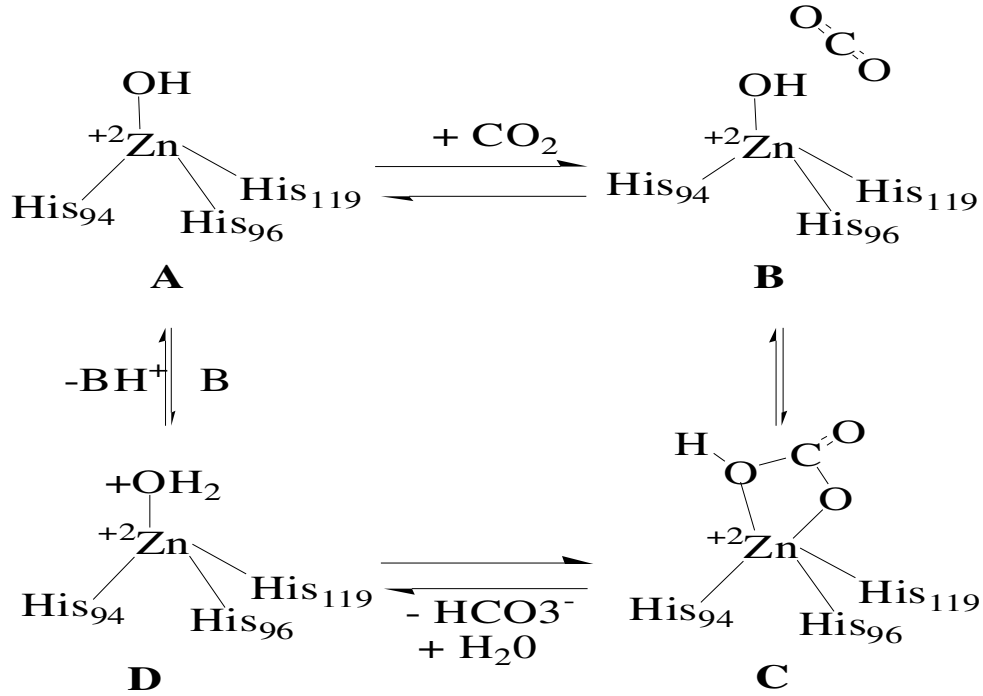
1.4.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son altmış yıldır yapılan çalışmalar sonucu karbonik anhidraz'ın kataliz mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre CA enziminin; metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Enzim kinetiği hakkında HCA-II üzerinde yapılan spesifik bölgenin mutasyonu ve X-ray kristalografisi çalışmalarında da, katalitik mekanizma oldukça ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmıştır. Diğer izoenzimlerin mekanizmaları genellikle bu mekanizma ile aynı olmasına rağmen, bazı spesifik detaylarda farklı olabilmektedir.

Bu çalışmalar sonucunda, karbonik anhidraz enziminin yapısal olarak iki önemli özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Bunlardan birincisi, aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. İkinci olarak da, aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmişlerdir.

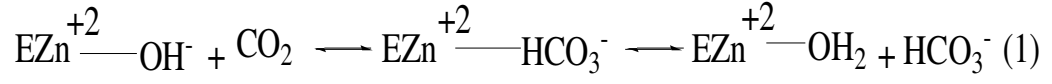
CA enziminin reaksiyonları katalizinde Zn (II) iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-ray kristalografi sonuçları; metal iyonunun bir H_2O veya OH^- iyonu ve üç histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 Å⁰ derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir. Çinko bağlı H_2O ; Glu-106' nın karboksilat grubuna sırayla köprü oluşturan Thr-199' un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır (Şekil 1.8). Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilitesini artırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO_2 ' e doğru hareket etmektedir (Supuran and Scozzafava 2001).

Zn (II) iyonuna, hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif bir formu oluşur (Şekil 1.9-A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO₂ molekülüne saldırır (Şekil 1.9-B). Bu da Zn (II) iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 1.9-C). Daha sonra HCO₃⁻ iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunun sonucunda Zn⁺² iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Şekil 1.9-D) (Stams *et al.* 1998).



Şekil 1.9. Karbonik anhidraz enziminin CO₂-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi

Tekrar bazik formu olan A formuna geçmek için, aktif bölgeden çevresine bir proton transferi gerçekleşir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesine His-64 gibi proton yakalayan aktif bölgeler ve ortadaki tampon bölgeler yardımcı olur. Bu proses (1) ve (2) eşitliğinde şematik olarak gösterilmiştir (Lindskog and Silverman 2000; Supuran and Scozzafava 2001).



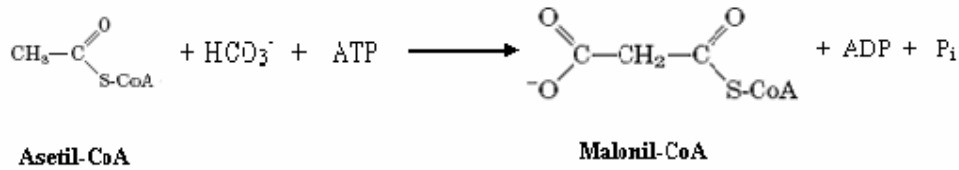
Proton transferiyle enzimin çinko-hidroksil formunun yeniden oluşması adımı, en hızlı katalizlenen reaksiyon basamağıdır. CA-II, CA-IV, CA-V, CA-VII ve CA-IX gibi katalitik olarak çok aktif izoenzimlerde bu proses, aktif bölgenin girişindeki His-64 rezidüsü yardımıyla gerçekleşmektedir ve böylece çok etkili bir proton transfer işlemi gerçekleştirilmektedir (Briganti *et al.* 1997). Bu da, çok aktif bir izoenzim olarak bilinen CA-II izoenziminin $k_{\text{cat}} / K_M = 1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ değeriyle doğrulanmaktadır.

1.5. Karboksilaz Enzimleri

Tez kapsamında çalışılan karboksilaz enzimleri ile ilgili bilgiler aşağıda özetlenmiştir.

1.5.1. Asetil koenzim A karboksilaz

Yağ asidi sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı asetil CoA'nın malonil CoA'ya karboksilasyonu tepkimesi, yapısında kovalent olarak bağlanmış biyotin taşıyan ve karbondioksit kaynağı olarak bikarbonatı kullanan asetil CoA karboksilaz enziminin katalizlenir.



Asetil CoA karboksilaz sitrat tarafından aktive edilebilen bir allosterik enzimdir. Yağ asidi sentezinde hızı kontrol eden bu enzim, mitokondriden asetatların serbest bırakıldığı form olan sitrat tarafından asetil CoA'ları kullanmak üzere hazırlanır. Oluşan karboksibiyotin enzim kompleksi, CO₂'i asetil CoA'ya aktarır. Biotin, enzime lizinin ε -amino grubu üzerinden bir amid bağı ile tutunmuştur (Montgomery 2000).

Asetil CoA karboksilaz, molekül kütlesi 4 x 10⁵ olan monomerik bir enzim kompleksinden, molekül kütlesi yaklaşık 6-8 x 10⁶ olan polimerik bir forma çevrilerek aktive edilir. Sitrat, enzimi aktif hale geçiren polimerizasyona, palmitoil CoA ise polimerin ayrışarak aktif olmayan monomerik hale dönüşmesine neden olur. Buna göre sitrat tepkimeyi hızlandırır, palmitoil CoA ise inhibe eder. Allosterik kontrolün yanı sıra bu tepkime, enzimin üretimi üzerinden de kontrol edilir. Karbohidratlarca zengin diyet ile beslenmek enzimin sentezini artırır (Montgomery 2000).

Asetil CoA karboksilaz eksik olduğu zaman malonil CoA sentez edilemez. Malonil CoA olmaksızın vücutta yağ asitleri sentezlenemez. Benzer şekilde yağ asidi zincir

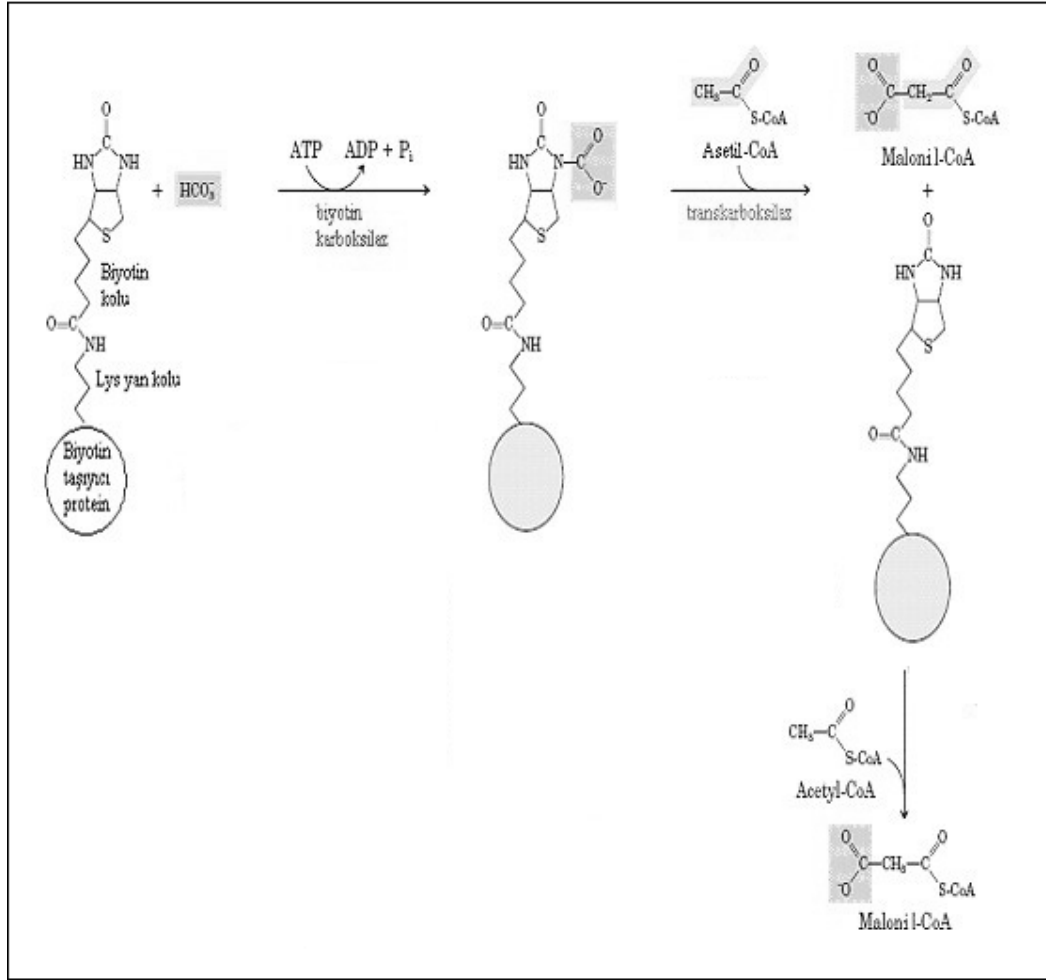
uzaması yolunda da hücre malonil CoA'yı kullanır. Bunun sonucunda, yağ asitlerinin zincir boyu uzaması işlemi de yapılamaz.

Normal olarak yağ asidi biyosentezi, karbohidratça zengin besinle beslenildiği zaman en aktif metabolik yoldur. Bu durumda glukoz önce piruvata, sonra sitrata, daha sonra asetil CoA'ya çevrilir. Asetil CoA karboksilaz yetmezliği sonucu, asetil CoA'ların malonil CoA'ya çevrilmesi önlenmiş olacağından, karaciğerde aşırı asetil CoA birikimi söz konusu olmaktadır. Bu durum, asetil CoA'ların asetik asite hidrolizine neden olur. Asetik asit plazmaya salınır ve aşırı miktarda asetik asit idrar ile atılır (Montgomery 2000).

Sürfaktan akciğerlerin alveollerinin tip II hücrelerince üretilen ve salınan bir lipoprotein materyalidir. Alveollerin yüzey gerilimini azaltarak, gaz değişimini kolaylaştırır. Yeterli miktarda sürfaktan olmaması yeni doğan bebeklerde rastlanan akut solunum yetmezliği sendromu (ARDS) nun en temel nedenidir. Sürfaktan yapısındaki lipit bileşen ise dipalmitoil fosfotidilkolindir. Palmitik asit, yağ asidi sentezinin son ürünüdür. Palmitik asit besinlerle dışardan da elde edilebilmesine rağmen, yaşamın bebeklik çağındaki beslenme düzeyinde yeterli miktarda doymuş yağ asidinin bu yolla sağlanabilmesi olasılığı azdır. Akciğerin, dipalmitoil fosfotidilkolin sentezi için yeterli palmitik asidi elde etmede yağ asidi biyosentezine bağımlı olması, asetil CoA karboksilaz yetmezliğinin solunum problemlerine yol açabileceğini göstermektedir (Montgomery 2000).

Bakteri asetil CoA karboksilazı üç farklı polipeptid alt birimine sahiptir (Şekil 1.10); hayvan hücrelerinde üç aktivitenin tümü de çok işlevli tek bir polipeptidin parçasıdır. Bitki hücreleri asetil CoA karboksilazın her iki formuna da sahiptir. Her durumda, asetil CoA karboksilaz enzim molekülünün üç bölgesinden birindeki lizinin ϵ -amino grubu amit bağıyla kovalent olarak bağlı bir biyotin prostetik grubu taşır.

İki kademeli tepkime, piruvat karboksilaz ve propiyonil CoA karboksilaz tarafından katalizlenen gibi diğer biyotin bağımlı karboksillenme tepkimelerine çok benzemektedir. Bikarbonattan (HCO_3^-) gelen karboksil grubu ATP-bağımlı bir tepkimede, önce biyotine taşınır. Biyotinli grup geçici bir CO_2 taşıyıcısı olarak hizmet eder; bunu, ikinci adımda, malonil CoA elde etmek üzere asetil CoA'ya aktarır (Şekil 1.10) (Lehninger 2005).



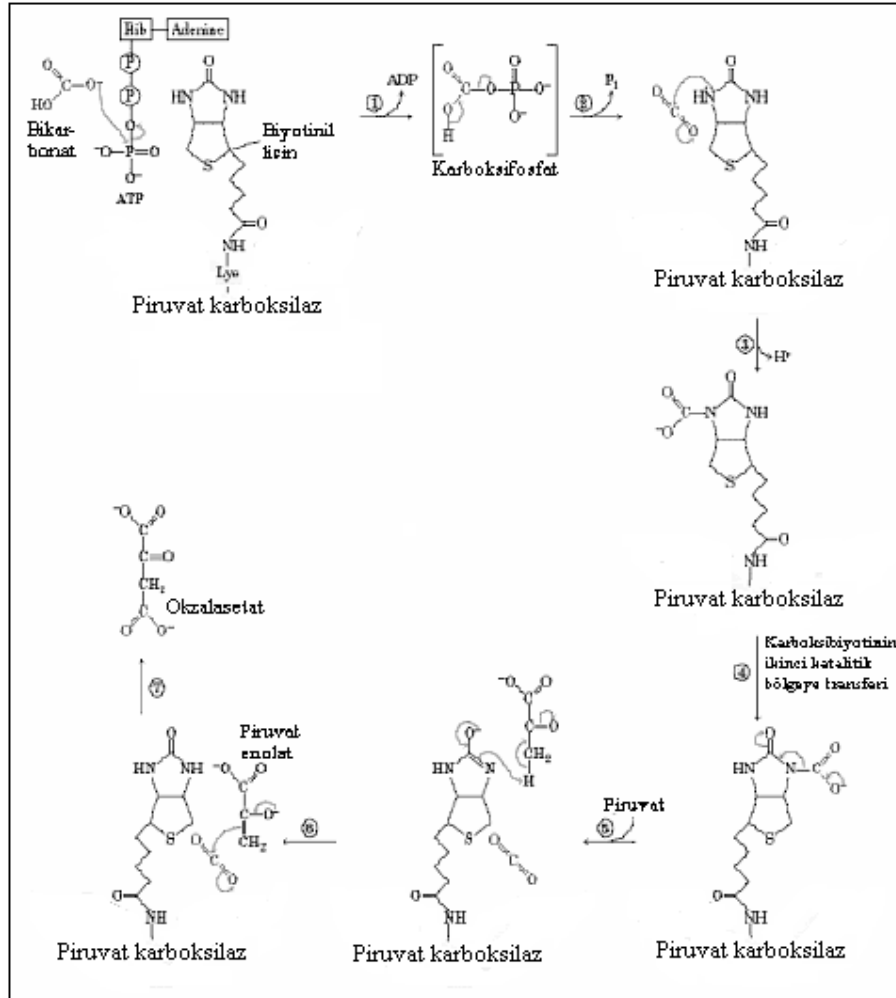
Şekil 1.10. Asetil Co A karboksilazın tepkimesi

1.5.2. Piruvat karboksilaz

Memeli karaciğer ve böbreğindeki en önemli anaplerotik tepkime, piruvat karboksilazla katalizlenen ve piruvatın okzalasetat oluşturmak için CO_2 ile tersinir karboksillenmesidir. Sitrik asit döngüsünün okzalasetat veya diğer herhangi bir ara maddenin eksikliği durumunda, piruvat daha çok okzalasetat oluşturmak için karboksillenir. Karboksil grubunun piruvata enzimatik olarak eklenmesi enerji gerektirir, bu da ATP ile sağlanır. Karboksil grubunun piruvata atak yapması için gerekli olan serbest enerji, yaklaşık olarak ATP'den elde edilen serbest enerjiye eşittir.

Piruvat karboksilaz tarafından üretilen okzalasetat; glukoneogenez (karaciğer ve böbrek korteksinde), de novo yağ asidi sentezi (karaciğer, adipoz doku ve meme bezi) ve glial hücrelerde nörotransmitter madde sentezi gibi çeşitli biyosentetik yollarda faydalanan önemli bir aracı moleküldür (Jitrapakdee *et al.* 1999). Piruvat karboksilaz'ın ayrıca pankreas β hücrelerinde suni glukoz ortamında insülin salınımında görev aldığı gösterilmiştir (Mac Donald 1995). Piruvat karboksilaz düzenleyici bir enzimdir ve gerçekten de kendinin pozitif allosterik modülatörü olan asetil CoA'nın yokluğunda inaktiftir. Sitrik asit döngüsünün bir yakıtı olan asetil CoA'nın aşırı varlığı piruvat karboksilaz tepkimesini daha çok okzalasetat oluşturmak için stimüle eder. Sonuçta döngünün sitrat sentaz tepkimesinde daha çok asetil CoA kullanılabilmesini olası kılar.

Yapılan çalışmalarda piruvat karboksilaz eksikliği olan hastalarda hipoglisemi, laktik asidosiz, hipersitruinemi'ye rastlanmıştır. Hiperamonnemi, hipernatremi, yüksek prolin ve lisin seviyeleri tespit edilmiştir (Garcia-Cazorla *et al.* 2006). Piruvat karboksilaz tepkimesi, enzimin prostetik grubu olan biyotin vitaminini gerektirir (Şekil 1.11). Biyotin birçok karboksilaz tepkimesinde anahtar rol oynar. Tek karbon gruplarının en yaygın oksitlenmiş formu olan CO_2 'nin özgülleşmiş taşıyıcısıdır. Karboksil grupları, ATP'nin yer aldığı ve CO_2 'nin enzime-bağlı biyotine katıldığı bir tepkimeyle aktifleştirilir. Bu aktifleştirilmiş CO_2 daha sonra bir karboksilasyon tepkimesinde bir alıcıya (burada piruvat) geçer (Lehninger 2005).



Şekil 1.11. Biotinin piruvat karboksilaz tepkimesindeki rolü.

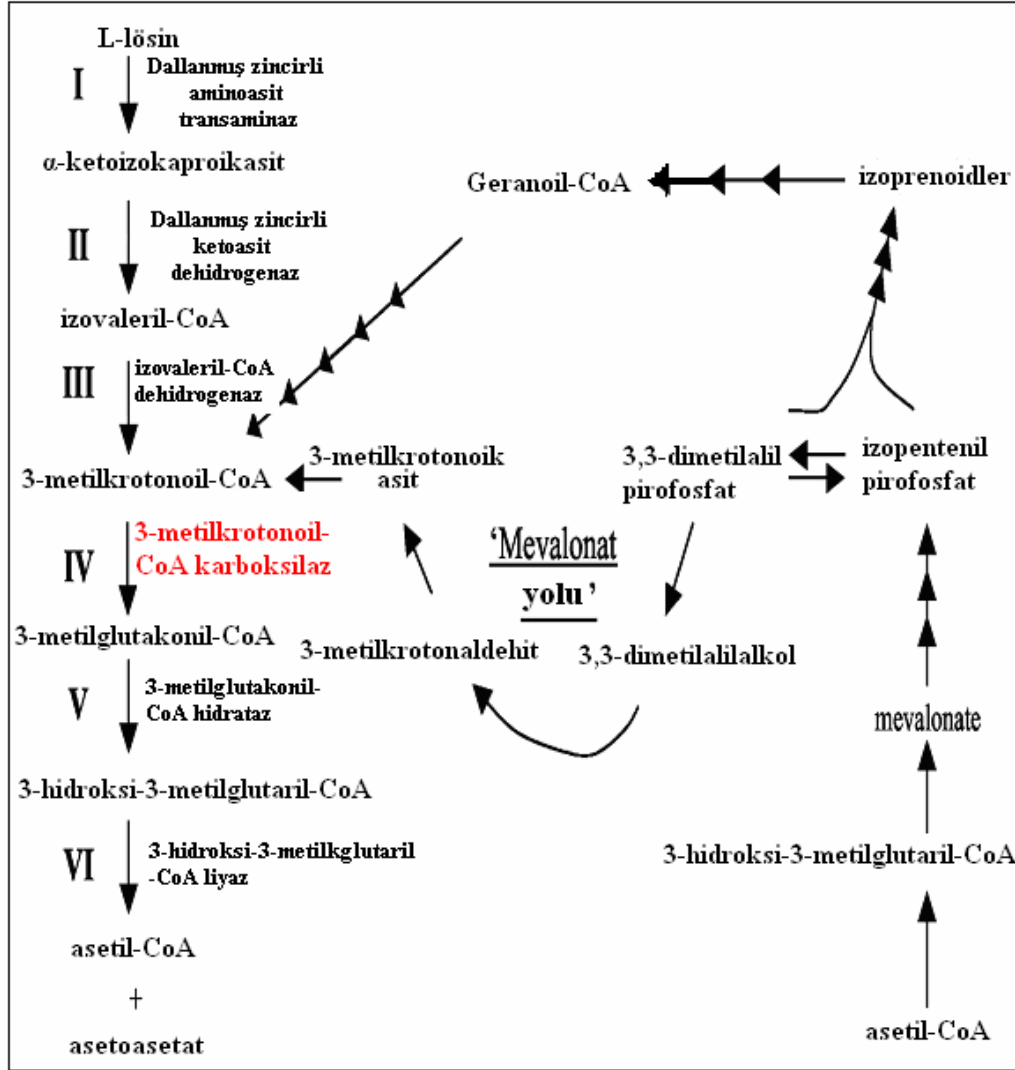
1.5.3. 3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz

3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz (Mccc ; E.C: 6.4.1.4) mitokondriyal bir biyotin enzimidir. Hayvanlarda, bakteriyal türlerde ve bitkilerde lösin ve izovalerat katabolizmasında önemli rol oynar (Şekil 1.12) (Rodwell, 1969; Moss and Lane 1971; Mazelis 1980). 3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz, biyotin içeren ve biyotin içermeyen iki alt üniteden oluşur. Bu alt ünitelerden sorumlu genler soya fasülyesi, *Arabidopsis thaliana* ve domatesten izole edilmiştir.

İnsanlarda 3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz eksikliği metilkrotonilglikinüri denen ve ilk defa 1976 yılında şiddetli nörogelişim problemlili bir kız çocukta tanımlanan, ölümcül bir durumla sonuçlanmaktadır (Finnie *et al.* 1976). Daha sonra 16 aileden 26 hasta literatürde açıklanmıştır (Ihara *et al.* 1997) ve 3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz eksikliği otozomal resesif bozukluk olarak tanımlanmıştır.

3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz eksikliği nadir bir metabolik hastalık olarak düşünülmüştür fakat geniş oranda klinik bulgular vardır ve şu anda önceki düşünüldüğünden çok yaygındır (Narisawa *et al.* 1986; Elpeleg *et al.*, 1992; Lehnert *et al.* 1996; Murayama *etal.* 1997).

Birçok hasta adelelerin istem dışı kasılması ve koma veya Reye sendromu benzeri yüksek protein alımıyla tetiklenen hastalıklar göstermiştir (Layward *et al.* 1989; Tsai *et al.* 1989). Biyotin takviyesi klinik sonuçları etkilememektedir. Son zamanlarda 3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz eksikliği yetişkin bayanlarda da aydınlatılmıştır (Gibson *et al.* 1998).



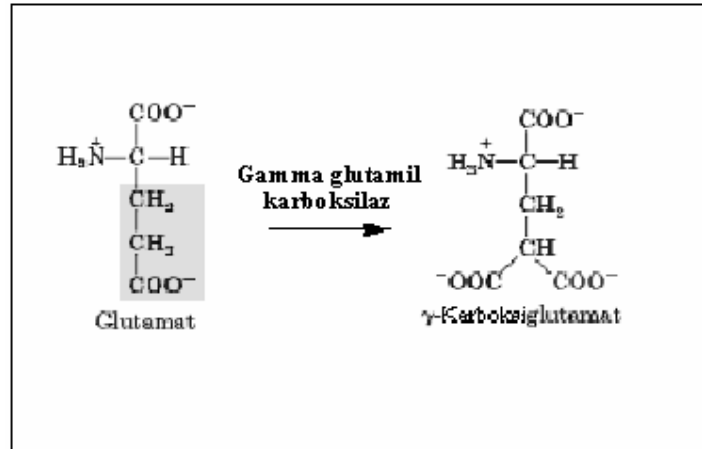
Şekil 1.12. Lösin yıkılma yolu ve mevalonat yolu.

Şekil 1.12’de gösterilen enzimler 3-metilkrotonoil CoA karboksilaz içeren diğer muhtemel metabolik yollarla birlikte *Aspergillus* ve insanlarda lösin katabolizmasında yer alan enzimlerdir. Lösin katabolizmasında enzim yetersizlikleri aşağıdaki hastalıklara yol açmaktadır: hipervalinemi/hiperlösin-izölösinemi (I); akçaağaç pekmezi üriner hastalığı (II); izovalerik asidemi (III); nadiren 3-metilkrotonoil CoA karboksilaz yetmezliği, metilkrotonilglükunüri (IV); metilglutakonik asidüri, tip 1 (V); 3-hidroksi-3-metilglutarik asidüri (VI) (Rodriguez *et al.* 2004).

1.5.4. Gamma glutamil karboksilaz

Bazı proteinlerin Glu kalıntılarına fazladan karboksil grupları eklenebilir. Örneğin, kan pıhtılaşması proteini protrombinin amino ucu bölgesinde C vitaminine gereksinim duyan bir enzim tarafından eklenen γ -karboksil glutamat kalıntıları bulunur. Bu karboksil grupları pıhtılaşma mekanizmasını başlatmak için gerekli Ca^{+2} 'yi bağlarlar (Lehninger 2005).

γ -glutamil karboksilaz endoplazmik retikulumda bulunan glutamatın γ -karboksil glutamata vitamin K bağımlı posttranslasyonel modifikasyonunu katalizleyen bir membran proteinidir (Şekil 1.13). Bu posttranslasyonel modifikasyon vitamin K bağımlı proteinlerin; kan pıhtılaşmasının düzenlenmesi, kemik metabolizması ve hücre büyümesindeki biyolojik aktiviteleri için gereklidir (Helgeland 1977; High and Roberts 1995).



Şekil 1.13. Gamaglutamil karboksilaz enziminin katalizlediği reaksiyon

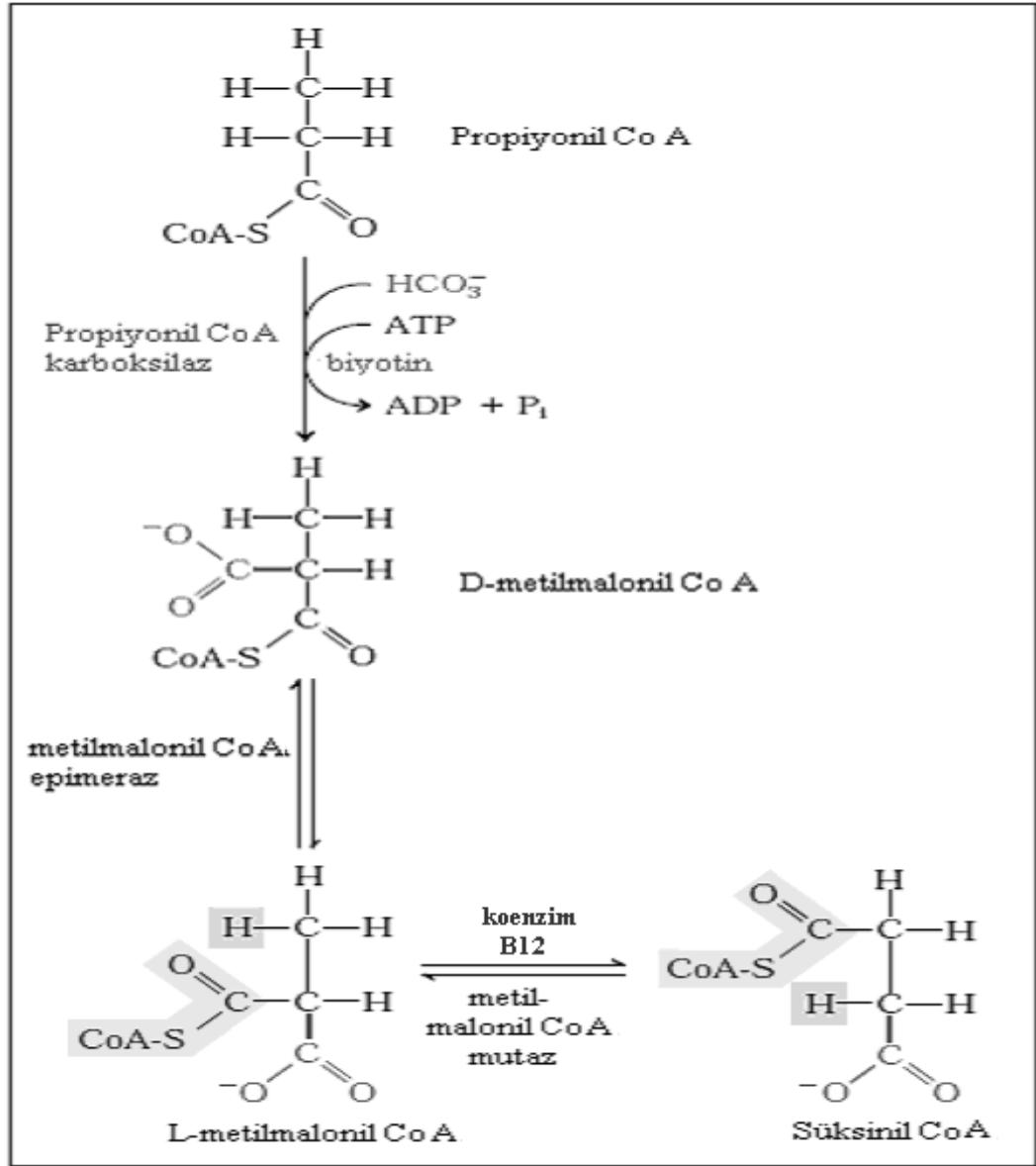
1.5.5. Propiyonil koenzim A karboksilaz

Propiyonil CoA karboksilaz (PCC, EC 6.4.1.3) mitokondri matriksinde propiyonil CoA'nın D-metilmalonil CoA'ya dönüşümünü katalizleyen enzimdir (Şekil 1.15) (Fenton *et al.* 2001). Bu enzim iki farklı nükleer gen tarafından şifrelenen özdeş olmayan iki alt üniteden (α ve β) oluşur. Sırasıyla Pcca ve Pccb olarak gösterilir. İnsan enzimi üzerindeki yapısal çalışmalar α Pcc 72 kDa, β Pcc 54 kDa büyüklüğünde olduğunu göstermiştir. Bütün propiyonil koenzim A karboksilaz'lar $\alpha_6\beta_6$ yapısına sahiptir (Haase *et al.* 1984; Fenton *et al.* 2001).

Propiyonil koenzim A karboksilaz çeşitli esansiyel amino asitler (metiyonin, izolösin, treonin, valin) ek olarak da tek zincirli yağ asitleri ve kolesterol katabolizmasında yer alır. Pcc yetersizliği propiyonik asidemi ile sonuçlanır. Propiyonik asidemi şiddetli ketoasidosiz, kusma, halsizlik ve hipotoni olarak karakterize edilen bir metabolik bozukluktur.

Pérez-Cerdá *et al.* 2004 Propiyonik asidemi'nin koryonda moleküler analiz kombinasyonunda direkt propiyonil koenzim A karboksilaz aktivitesi deneyi ile doğum öncesi teşhis edilmesinin hızlı ve güvenilir bir metot olduğunu önermiştir.

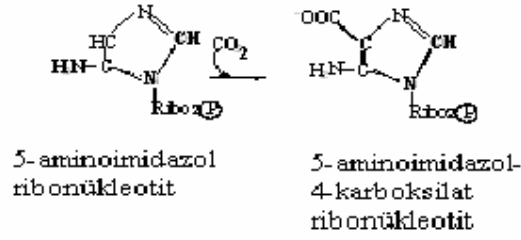
Prokaryot ve ökaryotlardaki bütün Propiyonil CoA karboksilazlar iki tanımlanmamış alt üniteden oluşur: Biotin karboksilaz ve karboksil transferaz. *Mycobacterium pheli*, *Mycobacterium smegmatis* ve *Streptomyces erythreus*'den elde edilen bakteryal açıl CoA karboksilazlar, propiyonil CoA ile maksimum karboksilasyon oranları göstermiştir, fakat enzimler asetil CoA'yı da iyi bir şekilde karboksilasyon yeteneğine de sahiptirler (Erfle 1973; Henrikson and Allen 1979).



Şekil 1.14. Propiyonil CoA enziminin katalizlediği reaksiyon (Lehninger 2005).

1.5.6. Fosforibozilaminoimidazol karboksilaz

Fosforibozilaminoimidazol karboksilaz (E.C.4.1.1.21) pürin biyosentezinde anahtar enzimlerden biridir. Maya fosforibozilaminoimidazol karboksilaz'larının iki domainden oluştuğu önerilmektedir. Bunlar: CO₂ bağlayıcı domain (Paics'ın N-bölgesi, yaklaşık olarak ilk 400 amino asit rezidüsü) ve katalitik domain (C bölgesi, polipeptidin kalan kısmı) (Hiep *et al.* 1993). İlgili enzim aktivitesi eksikliği olan mutant maya türleri adenin sentezleyemez.



Şekil 1.16. Fosforibozilaminoimidazol karboksilaz'ın katalizlediği reaksiyon.

1.6. Amaç

Metabolizmada reaksiyonlar enzimlerin katalizörlüğü eşliğinde cereyan etmektedir. Enzimlerin katalizledikleri reaksiyonlar vücutta % 100 verimle gerçekleşmektedir. Bu enzimler farklı genler tarafından şifrelenmektedir. Hayvan genomlarındaki genlerin büyük kısmı metabolizmada düzenleyici proseslerde gerekli olan proteinleri ve enzimleri kodlarlar. Bu genlerin büyük çoğunluğunun sekanslarının bulunması, biyolojik regülasyonun temelini teşkil eden kompleks genetik ve protein etkileşmelerini araştırma imkanlarına olanak sağlamıştır. Düzenleyici metabolik ağın anlaşılması için, genetik olarak insana benzerlik gösteren fareler kobay olarak kullanılarak bu enzimleri şifreleyen genlerin fare embriyosunun hangi safhasında ekspresyona uğradığını belirlemek önemli avantajlar sağlar. Gen ekspresyon örnekleri, RNA *in situ* hibridizasyonu ile kolaylıkla belirlenebilir.

Daha önceki çalışmalarda fare embriyosunun değişik safhalarında hibridizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada organ gelişimi ve boyut uygunluğu nedeniyle 14,5 günlük fare embriyosu tercih edilmiştir. Metabolizmada çok önemli işlevlere sahip karbonik anhidraz izoenzimleri ve karboksilaz enzimlerini şifreleyen genlerin hangi bölgelerde ekspresyona uğradığını belirleyerek bu önemli metabolik enzimlerin fonksiyonlarının genetik açıdan aydınlatılmasına katkıda bulunmak amacıyla mRNA düzeyinde gen ekspresyon analizi yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Karbonik anhidraz I (Gen simgesi : Car1)

CA-I 30 kDa molekül ağırlıklı düşük aktiviteli sitoplazmik bir enzimdir (Bundy 1977; Lindskog *et al.* 1984). Kapiler endotelyum, korneal endotelyum, göz lensi, plasenta ve memeli fetal membranlarında bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Lönnerholm *et al.* 1985; Venta *et al.* 1987; Sasaki *et al.* 1993; Mühlhauser *et al.* 1994). CA-I geni insan genomik cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır (Tashian 1989).

Sitoplazmik CA-I 'in insan beslenme sisteminde özofagus epitelyumunda (Christie *et al.* 1997), boşbağırsak, kıvrımbağırsak (Lönnerholm *et al.* 1985), kolon ve pankreatik Langerhan adacıklarının A-hücrelerinde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca epitel altı kapiler endotel hücrelerinde eksprese olmuştur (Lönnerholm *et al.* 1985; Parkkila *et al.* 1994).

2.2. Karbonik anhidraz II (Gen simgesi : Car2)

Fizyolojik koşullarda $1,3-1,9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ turnover sayısına sahip CA-II izoenzimi bilinen en verimli enzimlerden biridir (Khalifah 1971; Sanyal and Maren 1981; Wistrand 1981). İnsan CA-II geni, CA-I ve CA-III genleri gibi kromozom 8 üzerindedir (Nakai *et al.* 1987; Tashian 1989). Hemen hemen tüm insan doku ve organlarında bulunan CA-II karbonik anhidraz gen familyasında en fazla dağılmış izoenzimdir (Tashian 1992). İlk olarak CO₂ 'nin hidratasyonunda yer aldığı eritrositlerde bulunmuştur (Meldrum and Roughton 1933; Wistrand 1981).

CA-II birçok sindirim sistemi organında eksprese olmuştur (Lönnerholm *et al.* 1985; Parkkila and Parkkila 1996). Paratoid ve Mandibula altı bezleri seröz acinar hücrelerinde bulunur ve bikarbonat iyonlarını saliva içerisine serbest bıraktığı düşünülür (Parkkila *et al.* 1990, 1991; Parkkila *et al.* 1994). Özofagusun skuanöz (pullu)

epitelinin CA-II ihtiva ettiği görülmekte ve özofagusta endojen bikarbonat üretimine katıldığı düşünülmektedir (Meyers and Orlando 1992; Parkkila *et al.* 1994; Christie *et al.* 1997). Mide’de mide öz suyunun asiditesini düzenlediği gastrik mukozanın çepere ait ve yüzey epitel hücrelerinde eksprese olmuştur (Davenport and Fisher 1938; Davenport 1939; O’Brien *et al.* 1977; Parkkila *et al.* 1994; Parkkila and Parkkila 1996).

Duodenumun yüzey epitel hücreleri ve Brunner’s bezleri de CA-II içerir ve gastrik ve duodonal yüzey epitel hücreleri, epitelyumu örten ve sindirimden koruyan, HCO_3^- içeren mukus jel tabakasını şekillendirmek için mukus ve bikarbonat salgılar (Kivilaakso and Silen 1981; Richardson 1985; Flemström 1986; Allen and Carrol 1985; Swenson *et al.* 1991; Parkkila and Parkkila 1996; Takeda *et al.* 1997). İmmunohistokimyasal teknikler, boş bağırsak ve kıvrımlı bağırsak yüzey epitel hücrelerinin CA-II ihtiva ettiğini açığa vurmuştur (Lönnerholm *et al.* 1985; Sasaki *et al.* 1993), ayrıca NaCl reabsorpsiyonunun düzenlendiği memeli kolonunun (Binder *et al.* 1987; Goldfarb *et al.* 1988; Charney and Egnor 1989; Swenson 1991) non-goblet epitel hücrelerinde de bulunmuştur (Lönnerholm *et al.* 1985; Parkkila S *et al.* 1994).

Karaciğer’de hepatositlerde ve safra kanallarının epitel hücrelerinde CA-II bulunduğu ispatlanmıştır (Dodgson *et al.* 1984; Carter *et al.* 1989; Parkkila *et al.* 1994). Bilinen en önemli fizyolojik fonksiyonu safra’nın alkalizasyonu için HCO_3^- üretmektir (Swenson 1991). Ayrıca safra konsantrasyonunda asidifikasyonunda görev aldığı safra kesesinin epitel hücrelerinde de eksprese olmuştur (Juvonen *et al.* 1994; Parkkila and Parkkila 1996). Pankreas’ta CA-II, bikarbonatın pankreas öz suyuna salgılanmasındaki rolünün iyice yerleştiği epitel kanal hücrelerinde yer alır (Kumpulainen and Jalovaara 1981; Spicer *et al.* 1982; Kumpulainen 1984; Swenson 1991).

Karbonik anhidraz II eksikliği osteopetroz olarak bilinen büyüme bozukluğu, çiğneme sırasında dişlerin kapanmaması ve zihinsel gecikme ile birlikte böbrek tübüler asidosiz ve beyinsel kireçlenmeyi de içeren birincil bir kusurudur (Sly *et al.* 1983; Sly and Hu 1995a; Sly and Hu 1995b; Strisciuglio *et al.* 1990). Şimdiye kadar bu tehlikeli fakat nispeten az rastlanan hastalıkla sonuçlanan beş mutasyon belirlenmiştir (Venta *et al.*

1991; Hu *et al.* 1992; Hu *et al.* 1994; Strisciuglio *et al.* 1998). CA-II alimenter sistemde en bol bulunan izoenzim olmasına rağmen, CA-II eksikliği olan hastalarda mide ve bağırsaklarla ilgili hiçbir semptom belirtilmemiştir. Lai *et al.* (1998) son zamanlarda sitomegalovirüs promotör ekspresyon kasetine konjuge edilmiş normal insan CA-II cDNA'sının CA-II eksikliği olan fareye enjekte edildiği ve gen transferinden sonra üç hafta süren fakat altı hafta sonunda kaybolan idrarı asidikleştirme yeteneğinin geliştirilmesine sebep olan başarılı bir gen terapi deneyini belirtmiştir.

2.3. Karbonik anhidraz III (Gen simgesi : Car3)

CA-III iskelet kası tip 1 fiberlerinin stoplazmasında bol miktardadır (Holmes 1976; Register *et al.* 1978; Vaananen *et al.* 1985; Laurila *et al.* 1991) bunun yanında insan ve fare karaciğerinde de bulunur (Carter *et al.* 1989; Kelly *et al.* 1991). Molekül kütlesi 30 kDa'dır ve gen mimarisi CA-II geni için tanımlanana çok benzerdir (Tashian 1989; Edwards 1991). CA-III çok düşük CA aktivitesine sahiptir ve asetazolamid'e karşı nispeten daha dirençlidir (Tashian 1989). Ayrıca karboksil esteraz ve fosfataz aktivitelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Koester *et al.* 1981; Cabiscol and Levine 1995).

Karaciğerde CA-III ekspresyonu androjenler tarafından düzenlenmektedir (Carter *et al.* 1989), ek olarak aşırı etanol tüketimi perivenöz hepatositlerde ekspresyona neden olmaktadır, CA-III'ün reaktif aldehit ürünlerinin eş zamanlı olarak indüklendiği yer olan hepatositleri oksidatif hasara karşı koruduğu önerilmektedir (Niemala *et al.* 1991; Chen *et al.* 1992; Halsted *et al.* 1993; Niemala 1993; Niemala *et al.* 1994; Parkkila *et al.* 1999). İlginç olarak Cabiscol and Levine (1995), CA-III'ün oksitleyici çevrede fonksiyonlarını ve karaciğerde oksidatif olarak en fazla modifiye edilen protein olduğunu göstermiştir. Son yıllardaki bir çalışmada (Raisanen *et al.* 1999), CA-III NIH3T3 hücrelerinde eksprese olmuştur. Ayrıca CA-III cDNA'sıyla transfekte edilen hücrelerin kontrol hücrelerine nazaran proliferasyon (çoğaltma) denemelerinde daha hızlı büyüdüğü ve H₂O₂'nin sitotoksik konsantrasyonlarına karşı daha dirençli olduğu görülmüştür. Bu sonuç CA-III'ün oksidatif hasardan korunmayı sağladığını önermektedir.

2.4. Karbonik anhidraz IV (Gen simgesi : Car4)

CA-IV, tanımlanan ilk membrana bağlı izoenzimdir (Whittney and Briggles 1982). 35 kDa'luk protein üreten insan böbrek CA-IV enzimini kodlayan cDNA, COS-7 hücrelerinde eksprese edilmiş, klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır (Zhu and Sly 1990; Ghandour *et al.* 1992; Waheed *et al.* 1992; Fleming *et al.* 1995; Okuyama *et al.* 1995).

CA-IV'ün insan ve fare gastrointestinal sisteminde ekspresyonu ilk olarak, immunohistokimyasal blotlama ve Northern blot teknikleri kullanılarak, Fleming *et al.* (1995) tarafından incelenmiştir. Gastrik epitelyumda hiçbir sinyal gözlemlenmemiştir oysa kolonik epitelyumun apikal plazma membranında güçlü blotlanma tespit edilmiştir. Küçük bağırsağın epitel hücrelerinde çok zayıf bir pozitif reaksiyon gözlemlenmiştir. Gastrointestinal kanalın bütün segmentlerinde alt epitel kapiler endotelyum güçlü sinyal göstermiştir. Safra kesesi lümenal plazma membranı ve safra kanalı epitelyumu CA-IV'e şiddetli bir immuno reaksiyon ifade etmiştir (Parkkila *et al.* 1996). Karaciğerde sadece biliyer epitel hücreler CA-IV için pozitif sinyal göstermiştir (Parkkila *et al.* 1996). Fujika-Adachi *et al.* (1999a), son yıllarda CA-IV'ün normal insan karaciğerinde ekspresyonunu moleküler biyolojik metodlarla incelediler; RT-PCR ve Northern blot analizleri negatif olduğu halde, sadece RT-PCR-Southern blot kombinasyonu bunu aydınlatmaya yeterli oldu. Bu bulgular bir önceki gözlemle açıklandı CA-IV sadece intrahepatik safra kanalı biliyer epitel hücrelerinde bulunmuştur ve hepatositlerde eksprese olmamıştır (Parkkila *et al.* 1996; Fujika-Adachi *et al.* 1999a).

2.5. Karbonik anhidraz VA (Gen simgesi : Car5A)

CA-VA sadece mitokondriyal matrikse lokalizasyona sahip bir izoenzimdir (Vaananen *et al.* 1991; Nagao *et al.* 1993). Varlığı insan ve kemirgenlerin karaciğer ve pankreasında bilinmektedir (Nagao *et al.* 1993; Nagao *et al.* 1994; Sly and Hu 1995a; Parkkila *et al.* 1998) ve cDNA'sı insan karaciğer cDNA kütüphanesinden klonlanmış ve

geni kromozom 16'ya haritalanmıştır (Nagao *et al.* 1993). CA-VA düşük CA aktivitesine sahiptir, fakat hepatositlerin mitokondrisinde üre devri ve glukoneogenez gibi iki önemli metabolik proseste görev aldığı düşünülmektedir. Üre siklüsünün ilk enzimi olan karbamoil fosfat sentaza ve piruvat karboksilazın piruvatı okzalasetata dönüştürdüğü glukoneogenezin ilk basamağı için bir bikarbonat iyonu sağlar (Dodgson 1991; Heck *et al.* 1994). CA inhibitörlerinin ekvator domuzları ve fare karaciğerinde bu prosesleri yavaşlattığı gözlemlenmiştir (Dodgson *et al.* 1993; Metcalfe *et al.* 1985; Dodgson 1991). CA-VA'nın pankreas langerhan adacıklarında eksprese olduğu gösterilmiştir. CA inhibitörü asetazolamid glukoz uyarımlı insülin salgılanmasını inhibe etmiştir ve CA-VA'nın insülin salgılanmasında önemli rol oynadığı konusunda öneri sunmuştur (Parkkila *et al.* 1998).

2.6. Karbonik anhidraz VB (Gen simgesi : Car5B)

Yeni bir mitokondriyal karbonik anhidraz izoformu olan CA-VB, son zamanlarda klonlanmış ve kromozom X'e haritalanmıştır. Northern blot, CA-VB'in mRNA'sının normal insan kalp ve iskelet kasında eksprese olduğunu açığa vurmuştur. Ayrıca pankreas, böbrek ve salgı bezlerinde hassas RT-PCR tekniğiyle pozitif sinyal belirlenmiştir, karaciğerde gözlenmemiştir. Deneysel yaklaşımlarla kanıtlanmamasına rağmen mitokondriyal CA-VA ve CA-VB izoenzimlerinin farklı dağılımları, değişik fizyolojik roller oynadıklarını önermektedir (Fujikawa-Adachi K *et al.* 1999b; Shah *et al.* 2000).

2.7. Karbonik anhidraz VI (Gen simgesi : Car6)

CA-VI'e ilk olarak memelilerde tükürük bezleri ve tükürükte rastlanmıştır (Fernley *et al.* 1979; Feldstein and Silverman 1984; Kadoya *et al.* 1987; Murakami and Sly 1987; Parkkila *et al.* 1990). Biyokimyasal ve immunokimyasal özellikleriyle sitozolik izoenzimlerden önemli derecede farklılık gösterir, 34-36 kDa molekül ağırlığında bir glikoproteindir (Feldstein and Silverman 1984; Murakami and Sly 1987; Fernley *et al.*

1991; Parkkila *et al.*1991). Polipeptid zinciri diğer birçok ekstraselüler proteinler gibi disülfid bağlarıyla stabilize olur (Murakami and Sly 1987). İmmunohistokimyasal çalışmalar CA-VI'nın memeli kulak altı bezi ve mandibula altı bezlerinin seröz acinar ve demülin hücrelerinde eksprese olduğunu göstermiştir (Kadoya *et al.* 1987; Parkkila *et al.*1991; Ogawa *et al.* 1992; Ogawa *et al.* 1993). CA-VI'nın başlangıçta tükürükte bikarbonat seviyelerinin sürekliliğinde uzmanlaşmış bir rol oynadığı düşünülüyordu (Fernley *et al.* 1988). İlginç olarak Kivela *et al.* (1997a), bu enzimin tükürükte direkt olarak pH ve tamponlama kapasitesini düzenlemede görev almadığını fakat belki mine pelkülünde (dişi kaplayan ince protein tabakası) fonksiyonu olduğu, ihtimal olarak da karyojenik (çürütücü) bakteri tarafından üretilen asitin nötralizasyonunu katalizleyerek dişi çürümeye karşı koruduğu düşünülmüştür (Kivela *et al.* 1997b; Kivela *et al.* 1999; Leinonen *et al.* 1999).

Daha önceki bir araştırma CA-VI'nın yüksek konsantrasyonları günlük olarak tükürükle mideye yutulduğunu göstermiştir (Parkkila *et al.*1993). CA-VI'nın yüzey epitel hücrelerde eksprese olmamasına rağmen mide yüzey epitel hücrelerindeki mukus tabakası CA-VI içerir (Parkkila *et al.*1997). Bu da tükürük orjininde gastrik CA-VI bulunmadığını gösterir. Tükürük CA-VI, karbondioksit ve su üreten nötralizasyon reaksiyonunu hızlandırarak pH gradientinin sürekliliğine katkıda bulunabilir. Bu manzara gözlemler tarafından desteklenmiştir ki CA-VI muhtemelen gastrik lümende sert ortamda aktivitesini sürdürmektedir. Özofajit, gastrik veya duodenal ülseri olan hastaların normal insanlara nazaran düşük tükürük CA-VI konsantrasyonlarına sahip oldukları belirlenmiştir (Parkkila *et al.*1997).

Son yıllardaki bir çalışmada Fujikawa-Adachi *et al.* (1999a), insan pankreasında CA-VI mRNA'sının ekspresyonunu Northern Blot ve immunohistokimyasal yöntemlerle pozitif bir sinyal alınamadığı halde RT-PCR ve RT-PCR-Southern Blot tekniklerini kullanarak ispatlamıştır. Pozitif sonuçlar; eğer pankreasta ekspresyon olmuşsa, sekretuar CA-VI'nın pankreas kanal sisteminde lümenal pH düzenlemede görev alabileceğini önermektedir.

2.8. Karbonik anhidraz VII (Gen simgesi : Car7)

İlk kez Montgomery *et al.* (1991) tarafından aydınlatılmıştır, CA-VII izoenziminin CA-I, CA-II ve CA-III gibi sitoplazmik bir enzim olduğu aydınlatılmıştır. Rekombinant CA-VII, CA-II'ye bağlandığında yaklaşık % 4 CA aktivitesine sahip olmuştur (Lakkis *et al.* 1996) ve sülfonamidler tarafından inhibe edilmiştir (Earnhardt *et al.* 1998).

CA-VII'nin aminoasit sekansı, memelilerde en fazla korunan enzim olduğunu göstermiştir (Lakkis *et al.* 1997; Earnhardt *et al.* 1998). İnsan tükürük bezlerinde (Montgomery *et al.* 1991), fare akciğerlerinde (Ling *et al.* 1994) ve fare beyinde (Lakkis *et al.* 1996; Lakkis *et al.* 1997) bu enzimin mRNA'sı belirlenmiştir.

2.9. Karbonik anhidraz VIII (Gen simgesi : Car8)

Son yıllarda yeni CA izoenzimlerini kodladığı düşünülen en az dört memeli geni sekans edilmiştir. CA bağlantılı genler insan ve fare genomik kütüphanelerinden izole edilmiş ve karbonik anhidraz türünden proteinleri (CA-RPs) keşfetmek ve isimlendirmek için numaralandırılmıştır. CA-RP VIII, ilk olarak fare beyni cDNA kütüphanesinden tanımlanmıştır (Kato 1990), karbondioksit hidrasyon aktivitesi yoktur (Bergenheim *et al.* 1998). mRNA'sının ekspresyonu fare beyinde tespit edilmiştir (Lakkis *et al.* 1997). CA-VII'ninkine benzer amino asit sekansı (%98) ve ekspresyon modeline sahiptir. CA-VIII sekansı ayrıca PCR ile insan salgı bezleri, testis, plasenta ve akciğeri cDNA kütüphanelerinden tanımlanmıştır (Skaggs *et al.* 1993).

Yine yapılan çalışmalarda beyin, kalp, iskelet kası, böbrek, pankreas, serebellum ve koroid pleksusta ekspresyonu gözlemlenmiştir (Akisawa *et al.* 2003; Taniuchi *et al.* 2002).

2.10. Karbonik anhidraz IX (Gen simgesi : Car9)

CA-IX ilk olarak tümöre bağlı yeni bir antijen olarak tanımlandı (MN), insan serviks kanser hücrelerinde ekspresyonu yapıldı. MN/CA-IX geni 11 ekzon ve 10 introndan oluşur (Opavský *et al.* 1996). MN proteinin kodlayan cDNA ilk defa Pastorek *et al.* (1994) tarafından klonlandı, translasyon olan protein 459 amino asit içerir ve 49,7 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Opavský *et al.* 1996). Amino asit sekansı MN molekülünün bir N-terminal sinyal peptid (aa 1-37), bir ekstraselüler bölge (aa 38-414), bir transmembran çengel (aa 415-434) ve C-terminusta bir intraselüler kuyruk (aa 435-459). Büyük ekstraselüler domain iki farklı kısımdan oluşur : bir CA domaini ve proteoglikan benzeri domain. CA domaini aktif CA'larla yüksek amino asit kimliği gösterdiğinden MN proteini CA-IX olarak adlandırıldı (veya MN/CA IX).

Filogenetik olarak MN/CA IX membrana bitişik (CA-IV, XII, XIV) ve salgı (CA-VI) izoenzimlerinin farklı bir koluna aittir. CA domaini (aa135-391) insan CA-VI'sıyla % 40,8 amino asit özdeşliği gösterir (Opavský *et al.* 1996). Zavada *et al.* (1993) immunoblotlama metodlarını kullanarak uterus serviks, yumurtalık ve endometriyum karsinomalarında MN proteininin ekspresyonunu tanımladı. MN proteinine ait ilk immunohistokimyasal çalışmada % 90 dan fazla displastik ve kötü huylu servikal epitelyum örnekleri pozitif immunoreaksiyon verdiği halde normal servikal epitelyum ekspresyonu zayıf bir blotlama gösterdi (Liao *et al.* 1994). MN proteini servikal displazili örneklerde eksprese olduğu için servikal sitolojide umut verici bir biyomarker olarak düşünüldü. Bütün çalışmalar MN proteininin servikal neoplazi'de potansiyel bir biyomarker olduğu ve displastik ve kötü huylu hücreleri aydınlatmada kullanılabileceği sonucuna yönlendirdi (Liao *et al.* 1994; Liao *et al.* 1996; Brewer *et al.* 1996).

Pastorek *et al.* (1994), MN/CA IX'un gastrointestinal sistemde ekspresyonunu ilk açıklayandır. Turner *et al.* (1997) özofagus epitelyumunun bazal tabakasında zayıf immunoblotlama görüldüğünü belirttiği halde Pastorek *et al.* (1994) gastrik epitelyumun plazma membranlarında şiddetli blotlamalar olduğunu immunohistokimyasal olarak gösterdiler. Çalışılan tüm özofagus skuamöz hücre karsinomaları, bütün epitelyum

lezyonları ve özofagus adenokarsinomalarının % 80'i pozitif reaksiyon verdi. Normal böbrek dokusunda MN proteini tespit edilemedi, fakat bazı insan böbrek kanser hücreleri ve adenokarsinomalarda MN mRNA veya proteini yüksek ekspresyon sergiledi (McKiernan *et al.* 1997, Parkkila *et al.* 2000). Haapasalo *et al.* (2006) tarafından çeşitli dokularda CA-IX'un ektopik ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Normal insan beyin dokusu çok az ekspresyon göstermiş veya hiç göstermemiştir. 362 astrositik tümör hücresinin 284'ünde immunopozitivite görülmüştür. Sonuçlar CA-IX'un astrositik tümörlerin teşhisinde kullanışlı bir biyomarker olacağını önermiştir (Haapasalo *et al.* 2006).

2.11. Karbonik anhidraz X (Gen simgesi : Car10)

Katalitik izoenzim CA-X kısmi cDNA sekansı bir cDNA kütüphanesinde bulunmuştur (Hewett-Emmet and Tashian 1996; Lovejoy *et al.* 1998). Beyin, böbrek, serebellum, amigdala, serebral korteks, hippokampus, talamus, spinal kort, yumurtalık ve hipofiz bezinde eksprese olduğu belirlenmiştir (Okamoto *et al.* 2001).

2.12. Karbonik anhidraz XI (Gen simgesi : Car11)

İlk olarak Lovejoy *et al.* (1998) 36 kDa molekül ağırlıklı CA-RP XI'i koyun beyin cDNA kütüphanesinde açıklamıştır. Protein güçlü bir sinyal sekansa, çeşitli potansiyel fosforilasyon bölgeleri ve bağlama motiflerine sahiptir ve sinyal uyumunda rol oynadığı önerilmektedir (Lovejoy *et al.* 1998). İnsan cDNA sekansı 328 amino asitlik ve aktif CA izoenzimleriyle % 42-53 benzerlik gösteren polipeptidi kodlar ve Northern Blot analizleriyle beyinde kuvvetli bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde mRNA'sının ekspresyonu RT-PCR ile normal insan pankreası, böbrek, karaciğer, tükürük bezi ve spinal kort'da gözlenmiştir. İlginç olarak normal pankreasa göre pankreatik kanser hücresinde daha güçlü sinyal görülmüştür. CA-XI geninin tek bir kopyası insan kromozom 19q13.2-3'de lokalize olmuştur (Fujikawa-Adachi *et al.* 1999d).

2.13. Karbonik anhidraz XII (Gen simgesi : Car12)

Türeci *et al.*(1998) yeni bir membrana bağlı izoenzim olan CA-XII'nin renal hücre karsinomasında klonlanarak karakterize edildiğini açıklamıştır. cDNA sekansı 354 amino asitlik 39 kDa'luk ve tip bir membran proteini özellikleri gösteren bir polipeptid zinciri ihtiva eder. Sekans 29 amino asitlik sinyal sekansı, 261 amino asitlik CA domaini, ek olarak kısa bir ekstraselüler segment, 26 amino asitlik hidrofobik transmembran domain ve iki fosforilasyon bölgesi ihtiva eden 29 aminoasitlik bir hidrofilik C-terminal stoplazmik kuyruk içerir. Ekstraselüler CA domaini, bilinen CA'larla % 30-42 homoloji gösterir, Zn bağlayıcı aktif CA'larda bulunan üç histidin rezidüsü ve glikozilasyon için iki potansiyel bölge ihtiva eder. Normal insan dokularındaki Northern Blot analizleri başlangıçta 4.5 kb'lık transkriptin sadece böbrek ve bağırsakta tespit edilmesini sağlamıştır (Türeci *et al.* 1998), fakat sonra Ivanov *et al.* (1998) insan kolon, böbrek ve prostatında CA-XII'nin yüksek mRNA ekspresyonunu ve pankreas, yumurtalık ve testislerde daha az ekspresyonunu ispatlamıştır. Ek olarak A 549 (akciğer adenokarsinoma) hücreleri bol ekspresyon gösterdiği halde beyin ve akciğer dokularında düşük ekspresyon bulmuşlardır. Türeci *et al.*(1998) renal hücre kanseri (RCC) olan hastaların %10'u tümörlü dokularının etrafındaki normal böbrek dokularına nazaran yüksek CA-XII ekspresyonu gösterdiğini belirtmiştir.

Son zamanlardaki bir çalışmada Kivela *et al.* (2000) duodenum, boşbağırsak ve kıvrım bağırsak'ta negatif olduğu halde; kolon ve rektum yüzey epitel hücrelerinin basolateral plazma membranlarında şiddetli CA-XII immunoreaksiyonu gözlemlemiştir. Karsinomaların %95'i dağınık immünoablota gösterdiği halde kolorektal adenomalardaki blotlama şiddeti displazi derecesiyle artmaktadır. Önemlidir ki : renal, akciğer ve kolorektal kanserlerde overeksprese olan CA-XII, ikinci katalitik aktif membrana bağlı CA izoenzimidir. Asidik çevre kötü huylu hücrelerin yayılım potansiyelini artırdığından (Martinez-Zaguilan *et al.* 1996), Ivanov *et al.* (1998) MN/CA-IX ve CA-XII'nin kanser hücrelerinin etrafındaki alanı asidikleştirerek tümör büyümesine ve yayılmasına katkıda bulunabileceğini önermişlerdir.

Halmi *et al.* (2006) RT-PCR metoduyla fare ve sıçan beyinde CA-XII mRNA'sını tespit ettiler. Sıçan CA-XII' sinin klonlanması fare CA-XII'si ile %94 homoloji gösterdiğini açığa vurmuştur. CA-XII'nin dış granül hücrelerinde, kortekste ve koroid pleksusta eksprese olduğu görülmüştür. Kainik asit muamelesi CA-XII ekspresyonunu kortikal tabaka boyunca uyarmıştır. Bu membrana bitişik enzimin koroid pleksusta yüksek ekspresyonu, analog bir rolünün olduğunu önermiştir (Halmi *et al.* 2006).

2.14. Karbonik anhidraz XIII (Gen simgesi : Car13)

CA-XIII tükrük bezleri, böbrek, ince bağırsak, kolon, uterus ve testisi içeren içeren çeşitli dokularda eksprese olmuş yeni bir enzimdir. CA-XIII proteinini modelleme çalışmaları globüler bir molekül olduğunu ve CA-I, II ve III sitozolik enzimleriyle yüksek derecede (%60) özdeşlik gösterdiğini açığa vurmuştur. Bu yüzden CA-XIII sitozolik/intraselüler bir izoform olarak kümelенmiştir. Yapılan gen ekspresyon çalışmalarında insan dokularında : timus, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kolon ve testiste ; farede : dalak, akciğer, böbrek, kalp, beyin, iskelet kası ve testislerde pozitif sinyal elde edilmiştir (Lehtonen *et al.* 2003).

2.15. Karbonik anhidraz XIV (Gen simgesi : Car14)

İlk olarak fare böbreğinde; en çok eksprese olduğu proksimal çapraşık tübüllerde tanımlanmıştır. Bir tane amino terminal sinyal sekansı, diğer ekstraselüler CA larla büyük oranda homoloji gösteren bir CA domaini, bir transmembran domain ve kısa bir intraselüler C-terminal kuyruktan oluşur. Fare dokularındaki Northern Blot analizleri CA-XIV mRNA ekspresyonunun en bol böbrek ve kalpte, daha sonra iskelet kası , beyin ve karaciğer'de olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda CA-XIV genini kromozom 1q21'e haritalayan Fujikawa-Adachi *et al.* (1999c) tarafından insan CA-XIV'ü kodlayan bir cDNA açıklanmıştır. cDNA 337 amino asitlik 37,6 kDa molekül ağırlığında bir polipeptidi kodlamaktadır. Amino asit sekansı diğer aktif CA'larla % 29-46 benzerlik göstermektedir. Northern Blot metodu insan kalbinde, karaciğerinde, beyin

ve iskelet kasında mRNA ekspresyonu gösterdiği halde RT-PCR analizleri normal insan karaciğeri ve spinal kort'da şiddetli sinyal belirlemiştir. Sadece RNA Dot Blot analizleri ince bağırsak, kolon, böbrek ve mesane'de zayıf sinyaller göstermiştir (Fujikawa-Adachi *et al.* 1999c).

2.16. Karbonik anhidraz XV (Gen simgesi : Car15)

CA aktivitesi için gerekli olan amino asit rezidüsünün mevcut olduğu CA-XV'i kodlayan genomik sekansa sahip 8 tür tespit edilmiştir. RT-PCR çalışmaları insanlarda CA-XV'in eksprese olmadığını onaylamıştır. Aksine RT-PCR ve *in situ* hibridizasyon çalışmaları farede yapılmış ve böbrek, beyin, ve testiste pozitif sinyal elde edilmiştir. CA-XV'in yapısının CA-IV ile çok benzer olduğu filogenetik çalışmalarla belirlenmiştir. Her iki enzimde COS-7 hücrelerinde eksprese olmuştur ve paralel deneylerde çalışılmıştır. Sonuçlar CA-XV'in CA-IV ile çeşitli özellikleri paylaştığını göstermiştir. CA-XV'in katalitik aktivitesi düşüktür. Sonuçlar CA-XV'in α -CA gen familyasının bir üyesi olduğunu önermiştir (Hilvo *et al.* 2005).

Purkerson and Schwartz (2005) tavşan dokularında CA-IV, IX, XII ve XIV izoenzimlerinin ekspresyonunu incelemiştir. Sonuçlar: CA-IV mRNA'sı başlıca böbrek, kalp, akciğer, kolon ve safra kesesinde, CA-IX mRNA'sı mide, safra kesesi, duodenum ve boşbağırsakta, CA-XII mRNA'sı böbrek ve kolonda, CA-XIV mRNA'sı kalp, akciğer, iskelet kası ve karaciğerde tespit edilmiştir.

Datalar değişik dokularda değişik CA ekspresyon modelleri olduğunu göstermiştir: CA-IX proksimal gastrointestinal sistemde, CA-IV ve CA-XII önemli böbrek izoformlarıdır. CA-XIV karaciğer, kalp, akciğer ve iskelet kası gibi metabolik olarak aktif dokularda bol miktarda eksprese olmuştur. İzofomların ekspresyonunda türlere ait bazı önemli farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin; CA-XIV fare böbreğinde bol miktarda bulunmasına rağmen tavşan böbreğinde eksprese olmamıştır. Maturasyon çalışmaları sonucunda; CA-IX mRNA ve proteininin ekspresyonu, sütten kesme ile önemli oranda arttığı ve gastrik H^+ , K^+ -ATPaz'ın alfa alt ünitesinin maturasyonla doğru orantılı

olduğu görülmüştür. Bu da CA-IX ve gastrik H⁺ pompasının fonksiyonlarının yetişkin gıda maddelerinin sindiriminde bağlantılı olduğunu önermiştir (Purkerson and Schwartz (2005).

2.17. Asetil koenzim A karboksilaz (Gen simgesi : Acaca, Acacb)

Asetil koenzim A karboksilaz, asetil koenzim A'nın malonil koenzim A'ya ATP-bağımlı karboksilasyonunu katalizler. Yeni sentezlenen yağ asitlerinin zincir uzunluğunun malonil CoA konsantrasyonuna bağlı olduğu görülür (Hori *et al.* 1987). *E. Coli*'de asetil CoA karboksilaz genlerinin transkripsiyon oranları direkt olarak hücre büyüme oranıyla ilişkilidir (Li and Cronan 1993). *E. Coli* ve *Pseudomonas citronellolis* asetil CoA karboksilaz ları üç fonksiyonel üniteden oluşurlar: karboksil transferaz, biyotin karboksil taşıyıcı protein ve biyotin karboksilaz (Fall 1976, Gauchhait 1974). *E. coli* asetil CoA karboksilaz *E. Coli* 'deki tek biyotinlenmiş proteindir (Fall 1975) ve propiyonil CoA'ya paralel bir reaksiyon katalizlemez. Bakteriyal enzimlerin aksine, ökaryotik asetil CoA karboksilazlar alışılmışın dışında büyük enzimlerdir ve bütün komponentleri tek bir proteinde ihtiva ederler. Çeşitli bakterilerde hem asetil CoA hem de propiyonil CoA'nın karboksilasyonunu çifte substratlı katalizleyen tek bir enzim vardır.

Acaca ve Acacb genlerinin *M. xanthus* 'dan klonlanması ve sekansı tanımlanmış, yapı ve fonksiyonları tartışılmıştır. Sonuçlar: Acaca geni, *E. coli* asetil CoA karboksilazın biyotin karboksilaz alt ünitesiyle (% 48 özdeş) (Li and Cronan 1992), insan propiyonil CoA karboksilaz ile (% 41 özdeş) (Lamhonwah *et al.*1994), fare piruvat karboksilazın N-terminal bölgesiyle (% 39 özdeş) (Zhang *et al.* 1993) önemli oranda sekans homolojisi göstermektedir. Bunlar : ATP-bağlayıcı motif ve CO₂ fiksasyon bölgesinin Acaca'da mevcut olduğunu açığa vurmuştur. Acacb geni, *Veillonella parvula* metilmalonil CoA dekarboksilaz ile (% 27 özdeş) (Huder *et al.* 1993), *M. Xanthus* Propiyonil CoA karboksilaz'ın β alt ünitesi ile (% 28özdeş) (Kimura *et al.* 1997), *E. coli* Acaca geninin α ve β alt üniteleriyle (%19 ve %13 sırasıyla) yüksek derecede sekans benzerliği göstermektedir.

2.18. Piruvat Karboksilaz (Gen simgesi : Pcx)

Piruvat karboksilaz [EC 6.4.1.1] piruvatın okzalasetata ATP-bağımlı karboksilasyonunu katalizleyen biyotin bağımlı bir enzimdir. Pcx ekspresyonunun gen seviyesinde düzenlenmesi maya ve farelerde ispat edilmiştir (Brewster *et al.* 1994; Jitrapakdee *et al.* 1997). Karmaşık transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmaların farklı fizyolojik durumlarda piruvat karboksilaz üretimini düzenlediği görülmektedir (Jitrapakdee *et al.* 1998). Çoğu türe ait piruvat karboksilaz'lar düzgün dörtyüzlü şeklinde düzenlenmiş özdeş alt ünitelerden oluşur. Her bir ünite CO₂'i iki katalitik alt site arasında ileten tek bir biyotin kısmı ihtiva eder (Attwood *et al.* 2002). Reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibi iki kısma ayrılabilir:

Önemli bir anaplerotik enzim olan piruvat karboksilaz'ın yapısal çalışmaları bakteri, maya ve omurgalı türlerde kendisini kodlayan genlerin veya cDNA'sının klonlanması ve sekans edilmesi ile başlatılmıştır. Bu çalışmalar açıkça göstermiştir ki: bu organizmalara ait piruvat karboksilaz'lar amino asit seviyesinde yüksek derecede sekans benzerliği göstermektedir. Piruvat karboksilaz ilk olarak tavuk mitokondrisinde keşfedilmiştir (Utter *et al.* 1960) ve asetil CoA ile allosterik aktivasyonu (Scrutton *et al.* 1967), fiziksel özellikleri ve kinetik çalışmalarla reaksiyon mekanizması üzerine bir çok başarılı çalışma yapılmıştır.

Çipura balığının bazı organlarında RT-PCR metoduyla Piruvat karboksilaz'ın komplementer DNA sekansı belirlenmiştir. Piruvat karboksilaz'ın molekül büyüklüğünün 6500 nükleotid olduğu Northern Blot analiziyle belirlenmiştir. Northern Blot analizlerine göre: Pcx geni; kas, kalp, karaciğer ve yumurtalıkta ekspresyon olurken dalakda olmamıştır (Abe *et al.* 2004). Pcx koekspresyonunun süksinat üretimini artırdığı gözlenmiştir (Wang *et al.* 2006).

2.19. 3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz (Gen simgesi : Mccc1, Mccc2)

McccA ; kalp, iskelet kası, böbrek ve karaciğer gibi mitokondrice zengin organlarda bol olarak eksprese olmuştur (Keiko *et al.* 2001).

Çipura balığının bazı organlarında RT-PCR metoduyla 3-metilkrotonil CoA karboksilazın biyotin ihtiva eden Mccc1 ve biyotin ihtiva etmeyen Mccc2 alt ünitelerinin komplementer DNA sekansları belirlenmiştir. Mccc1'in tüm kodlayan sekansı ve Mccc2'nin kısmi kodlayan sekansı belirlenmiştir. Mcc1 ve Mccc2 molekül büyüklükleri sırasıyla 4300 ve 2400 nükleotid olduğu Northern Blot analiziyle belirlenmiştir. Northern Blot analizlerine göre: Mccc1 ve Mccc2 kas ve yumurtalıkta yüksek seviyede, eser seviyede kalp, dalak ve karaciğerde ekspresyon olmuştur. Mccc'lerin özellikle protein metabolizmasında aktif olan kas ve yumurtalıklarda önemli olduğu görülmektedir (Shunnosuke *et al.* 2004).

2.20. Gamma-glutamil karboksilaz (Gen simgesi : Ggcx)

Yapılan çalışmalarda γ -glutamil karboksilaz 293 hücrelerinde eksprese edilmiştir. Gamma-glutamil karboksilaz'ın amino terminal kısmının endoplazmik retikulumun sitoplazmik kısmında karboksil terminal kısmının ise lümenal bölgede olduğu tespit edilmiştir. Gamma-glutamil karboksilaz geni fare karaciğer genomik DNA'sından klonlanmış ve yapısal organizasyonu belirlenmiştir. Gen 16,3 kb uzunluğundadır, 15 ekzon ve 14 intron içermektedir (Romero *et al.* 1998).

İnsanda yapılan çalışmalarda kemik, karaciğer, böbrek, pankreas, kolon akciğer, yumurtalık, prostat, plasenta, iskelet kası, kalp, testis, ince bağırsak, dalak, timus, beyin ve lökositlerde ekspresyon gözlenmiştir (Liu *et al.* 1996). Romero *et al.* (1998) tarafından fare gamma-glutamil karboksilaz'ı kodlayan tam boy cDNA izole edilerek karakterize edilmiş ve analizi selüler seviyede yapılmıştır. İn sitü hibridizasyonla gen ekspresyonu yapılmıştır. Vitamin K-bağımlı proteinlerin sentezinin ana bölgesi olan

hepatositlerde gamma-glutamil karboksilaz mRNA'sı gebelikte geç eksprese olmuştur. Aksine merkezi sinir sistemi, mezenkimal ve iskelet dokuları embriyonun oluşması ve gelişmesinde erken eksprese olmuştur (Romero *et al.* 1998).

2.21. Propiyonil CoA karboksilaz (Gen simgesi : Pcca, Pccb)

Prokaryot ve ökaryotlardaki bütün Propiyonil CoA karboksilazlar iki alt üniteden oluşur: biyotin karboksilaz ve karboksil transferaz. *Mycobacterium pheli*, *Mycobacterium smegmatis* ve *Streptomyces erythreus*'den elde edilen bakteryal açıl Co A karboksilazlar, propiyonil CoA ile maksimum karboksilasyon oranları göstermiştir, fakat enzimler Asetil Co A'yı da iyi bir şekilde karboksilasyon yeteneğine de sahiptirler (Erfler 1973; Henrikson and Allen 1979). Pcca insanda karaciğer ve deride eksprese olmuştur (Lamhonwah *et al.* 1986); Pccb ise İnsanda karaciğer, kas, plasenta, böbrek ve beyinde eksprese olmuştur (Baumgartner *et al.* 1975,1989; Scholte *et al.* 1980).

2.22. Fosforibozilaminoimidazol karboksilaz (Gen simgesi : Paics)

Zygosaccharomyces rouxii mayasına ait ADE genini ihtiva eden 2-8 kb'lık fragmentin nükleotit sekansı belirlenmiştir. Gen *Z. rouxii* genomik DNA kütüphanesinden klonlanmıştır. Sekans edilen DNA fragmenti tahmini olarak 570 amino asitten oluşan bir proteini kodlayan 1710 baz çifti içermektedir. Amino asit sekansı diğer 5 maya türüyle yüksek derecede homoloji göstermektedir (Sychrova *et al.* 1999). İnsanda kırmızı kan hücrelerinde, trombositlerde, lökositlerde ve midede ekspresyon olmuştur (Alenin *et al.* 1990).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda çizelge 3.1’de belirtilen maddeler kullanıldı.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Agaroz	Sigma
Amonyum asetat	Merck
Anti-Dig-Fab-POD	Roche
BCIP(5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat,4-toluidin tuzu)	Roche
Bisbenzimidin	Sigma
BMB blocking reagent	Roche
Borik asit	Merck
Brom fenol mavisi	Pharmacia Biotech
Dnaz I (Rnaz Free)	Roche
DNTPs	Roche
DTT, ditiyotreitöl	Sigma
EDTA	Sigma
Enhancer	Qiagen,USA
Etanol	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Etidyum bromür	Sigma
Fenol	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Filitre	Sartorius
Formaldehit	Electron microscopy sciences
Formamide	Fluka
Glutaraldehit(%25)	Merck

Gliserin	Appli chem
Glisin	Sigma
Hidroklorik asit, (HCl) , 1N çözelti	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Fluka
ISH Tamponu	Ambion
Iyotasetamid	Sigma
Kb-Ladder	NEBiolabs
KH ₂ PO ₄	Merck
Kalsiyum klorür	Merck
Kloroform	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Levamisol ([(-)-tetramizol hidroklorür)	Sigma
Maleik asit	Fluka
Metanol	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Mikroskop camları	Menzel gläser
Na ₂ HPO ₄	Riedel de Haen
NBT (Nitroblue tetrazolium klorür)	Roche
NEN Blocking reagent	NEN/Perkin-Elmer
NEN Tiramide signal amplification	NEN/Perkin-Elmer
NeutrAvidin-AP	Roche
Primerler	Sigma
Potasyum klorür	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Proteinaz K	Roche
Reverse transkriptaz	Invitrogen
Rnaz A	Sigma
Rnaz inhibitörü	Roche
RnazZAP	Sigma
Koyun Serumu	Chemicon International Inc.
Sodyum klorür NaCl	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Sodyumhidroksit NaOH, 1N çözeltisi	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
SP6-RNA-Polimeraz	Roche

Taq-DNA-Polimeraz	Sigma
Tissue-Tec (OCT)	Sakura
Trietanolamin	Fluka
Tris	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Tri sodyum sitrat dihidrat	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Tween-20	Sigma
T7-RNA-Polimeraz	Roche

3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Derin Dondurucular	: Roliline,GFL,NORD CAP
Destile Su Üretme Cihazları	: USF Seraclest SD 2000, Heraus Destamat
Jurgens Elektroforez Cihazı	: Bio lab agaroz elektroforezi
Etüv	: Mememert
Görüntüleme Cihazı	: Sony
Hassas Terazi	: Comnilab OC 3100-P
<i>In Situ</i> Hibridizasyon Cihazı	: TECAN
Kar Üretme Cihazı	: B-390,Scotsman
Kurutucu Cihaz	: Concentrator 5301,Eppendorf
Magnetik Karıştırıcı	: IKA-Combimay RET ,Jurgens
Mikroskoplar	: Leica
Mikrotom Cihazı	: Leica
Otomatik Pipetler	: Biohit, Eppendorf, Socorex ve Oxford Pipettors
PCR Cihazları	: Eppendorf Mastercycler Gradient, Applied
biosystems Gene Amp	PCR system 2400
pH metre	: pH-Meter 766 calimatic, Knick
Slayt Kaplama Cihazı	: Promounter RCM 2000, Medite/Meisci
Soğutmalı Santrifüj	: Biofuge (Pico),
Soğutmasız Santrifüj	: Sorvall RC3B
Tarama (Scan) Cihazı	: Leica
UV-VIS Spektrofotometre	: Hewlett Packard, 8453
Vorteks	: IKA MS2 Minishaker

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1. 6x Loading Tamponu: Bidistile suda çözülmüş %30 gliserol,% 0,25 bromfenol mavisi ve % 0,25 ksilen siyanol FF alınıp istenen miktarda hazırlandı ve 4⁰C’de saklandı.

2. 10x TBE Tamponu: 108 g Tris, 55 g borik asit ve 40 ml EDTA (0,5 M’lık ve pH: 8,0) alınıp 950 ml ELGA suda çözülüp son hacim 1 lt tamamlandı.-20⁰C’de saklandı.

3. 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb) reaktifi: 150 µl gliserol (%100), 150 µl DEPC’lı su ve 100 µl 6x loading tamponu konup karıştırılıp 100 µl DNA ladder (1000 µg/µl) alınıp karıştırıldı ve -20⁰C’de saklandı.

4. % 1’lık Agaroz Jeli: 1x TBE’den 100 ml alınıp üzerine 1 g agaroz konu ve 1,5 dakika mikrodalga fırınında ısıtıldı.

5. DEPC (Dietil pirokarbonat)’li su: 1 ml DEPC alındı 1 lt dd H₂O ilave edilip 4 saat karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra otoklavlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

6. 5xNTE Tamponu: 146,25 g NaCl (2,5 M), 6,055 g Tris (50 mM), 9,305 g EDTA (25 mM) alındı ve 950 ml sıcak dd su (60⁰C) çözülüp pH 8 ayarlandıktan sonra 1 lt’ye tamamlandı ve otoklavlandı.

7. 10x PBS : 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ ve 2,4 g KH₂PO₄ alınarak dd suda çözülüp pH 7,4 ayarlanıp son hacim 1 lt yapıldıktan sonra otoklavlandı.

8. 10xTN : 121,5 g Tris 87,96 g NaCl alınıp 950 dd suda çözüldü ve pH 7,5 ayarlandı. Son hacim 1 lt’ye tamamlandıktan sonra otoklavlandı.

9. TNB (% 0,5 'lik bloking reaktifi) : 1 x TN çözeltisinden 100 ml alınıp içine yüzdesi % 0,5 olacak şekilde blocking reaktifi kondu ve 1 saat 60 °C'de karıştırıcı üzerinde karıştırıldı daha sonra oda sıcaklığına getirildikten sonra pH 8,0'e ayarlanıp 50' ml'lik kısımlar halinde -20 °C de saklandı.

10. TMN : 500 ml'si hazırlamak için 6,06 g Tris, 2,92 g NaCl, ve 5,08 g MgCl₂-6H₂O alınıp ELGA suda çözülüp daha sonra pH 9,5 ayarlanıp stoklar halinde -20 °C'de saklandı.

11. 2xPK (Proteinaz K Tamponu): 1 litre için 100mM Tris (12,1 g), 10mM EDTA (3,72 g) alınıp 950 ml otoklavlanmış dd suda çözülüp daha sonra pH 8,0 ayarlanarak oda sıcaklığında saklandı.

12. 20x SSC: 1 lt 20x SSC hazırlamak için 175,3 g NaCl, 88,2 g Na sitrat-trisodyum sitrat dihidrat alınıp 950 ml dd suda çözülüp pH 7,0 ayarlandıktan sonra hacim 1 lt'ye tamamlandı ve otoklavlandı.

13. Maleat Tamponu: 1 lt maleat tamponu hazırlamak için 8,765 g NaCl, 16 g maleik asit alınıp 950 ml ELGA suda çözülüp pH: 7,5 ayarlandıktan sonra 1 lt hacim tamamlandı.

14. %10'luk Tween: 100 ml %10'luk tween hazırlamak için 10 g tween tartılıp üzerine 90 g otoklavlanmış dd su eklenerek hazırlandı. Renk reaktifi, TMN, Hyb mix reaktifleri haricindeki *in situ* hibridizasyon sırasında kullanılan bütün reaktiflere son tween konsantrasyonu % 0,5 olacak şekilde tween ilave edildi.

15. %50'lik Formamid I: 1 lt bu çözeltiden hazırlamak için 100 ml 20x SSC, 500 ml formamid ve 400ml'de otoklavlanmış dd su alınıp karıştırıldı.

16. %50'lik Formamid II: 1 lt bu çözeltiliden hazırlamak için 50 ml 20x SSC, 500 ml formamid ve 450ml'de otoklavlanmış dd su alınıp karıştırıldı.

17. 0,2 M HCl: 100 ml bu çözeltiliden hazırlamak için 1 M'lik HCl'den 20 ml alınıp hacim otoklavlanmış dd su ile 100 ml'ye tamamlandı.

18. %4'lük PFA: 200 ml bu tampondan hazırlamak için; 180 ml otoklavlanmış dd su, 0,4 ml NaOH alınıp 60°C kadar ısıtıldı, bu sıcaklığa gelindiğinde 12 g PFA eklenerek çözüldü ve 0,6 ml HCl, 20 ml 10xPBS konup karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra +4°C de saklandı.

19. 4 M'lik Amonyum Asetat: 100 ml bu çözeltiliden hazırlamak için 31,12 g amonyum asetat alındı 70 ml suda çözülüp son hacim dd su ile 100 ml tamamlanarak otoklavlandı ve -20°C'de saklandı.

20. %4'lük koyun serum: 250 ml bu çözeltiliden hazırlamak için 1xTNT çözeltisinden 240 ml alındı ve bu çözelti içinde 10 ml'de koyun serum alınıp karıştırıldı ve daha sonra filtreden geçirildi.

21. Renklendirme çözeltisi: 200 ml hazırlamak için önceden hazırlanmış TMN çözeltisi ilk önce filtreden geçirildi, ardından çözeltinin her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol [(-)-tetramizol hidroklorür] olacak şekilde 100 mg bu maddeden alınıp çözüldü ve 1 ml NBT (Nitroblue tetrazolium klorür) (5µl/ml), 0,75 ml BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat,4-toluidine tuzu) (3,75µl/ml) şeklinde ilaveler yapıldıktan sonra hemen kullanıldı.

22. Blocking reaktifi (maleat tamponu icinde): Bu çözeltide blocking reaktifinin konsantrasyonu %1 `dir. 100 ml maleat tamponu alındı ve içine 1 g blocking reaktifi koyup 1,50 saat 100°C'de karıştırıcı üzerinde karıştırdıktan sonra 4°C'de saklandı. Kullanılacağı zaman filtreden geçirildi.

3.4. Spesifik Genler İçin İnternet Kullanılarak Primer Dizaynı

Araştırılan genlerin primer dizaynı için aşağıdaki işlemler sırayla yapıldı. Burada rnek olarak Karbonik anhidraz 4 geni (Car 4) için yapılan işlemler verilmiştir.

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> web sayfası açıldı, “Search” den Gene seçildi, “For” karşısına Organizma olarak “Mus musculus” ve araştırılacak genin kısa adı girildi ve daha sonra “go” tuşuna basıldı (şekil 3.1). şekil 3.2’de sorgu sonuçları görülebilir. Burada aradığımız gene göre seçim yapıp, doğru yerde bulunduğuna emin olunmak isteniyorsa, karşı taraftaki linklerden (PubMed, Protein, RefSeq) daha fazla bilgiler sağlanabilir. Locus ID zerine tıklandı ve şekil 3.3 elde edildi.

şekil 3.3’de gen ile ilgili bilgiler yer alır. Bu bilgiler içinde genin kromozomdaki yeri, gen ürünü olan enzimin fonksiyonları vb bulunur. NCBI Reference Sequences (RefSeq) başlığı altında “mRNA” tuşuna basılarak genin cDNA’sı elde edildi. Genin spesifik probunun dizaynında kullanılacak ilgili genin sekansına böylece ulaşılmış olundu (şekil 3.4). Bu sekans kopyalandı ve fare “non-redundant” database’a karşı blastlandı.

2. Blastlama için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> web sayfasına girildi (şekil 3.5). “Nucleotide” başlığı altında “Nucleotide-nucleotide-BLAST (blastn)” tuşuna basıldı. şekil 3.6’daki web sayfası açıldı. şekil 3.4’de seçilen ilgili genin sekansı, “Search” karşısındaki kutu içine yapıştırıldı. “Choose database” kısmına “nr”(nonredundant) ve “or select from” karşısına “Mus musculus[ORGN]”seçildi. nce “BLAST” tuşuna (şekil 3.6) ve daha sonra “Format” tuşuna (şekil 3.7) basılarak sorgu başlatıldı. Daha sonra homolojinin olup olmadığı anlaşıldı (şekil 3.8).

Bu sonuca göre genin spesifik probunu elde etmek için gen sekansında en iyi bölge seçimi yapılmalıdır. Bunun için şekil 3.8’e göre 0-1000 arasındaki bölgede, bu bölgenin tamamına karşılık olarak diğer genlerle homolojinin hemen hemen hiç bulunmadığı anlaşılmaktadır. Bu yüzden bu bölge içinde spesifik cDNA probunun hazırlanması

idealdir ve bu bölge seçilmiştir (Şekil 3.9). Bu sekans kopyalanarak primer programında ilgili yere kopyalandı.

Genelde prob hazırlamada belirli bir genin tüm cDNA'sı yerine, cDNA'nın belirli bir kısmının elde edilmesi ve çoğaltılması istenir. Ancak bu cDNA'nın büyüklüğü amaca uygun olarak ayarlanmalıdır. Örnek olarak, *in situ* hibridizasyon yöntemiyle gen ekspresyon analizi için cDNA probu, yaklaşık 1000 nükleotid uzunluğunda olmalıdır. 500 nükleotidin altındaki problemlerle sonuç alınması çok zordur.

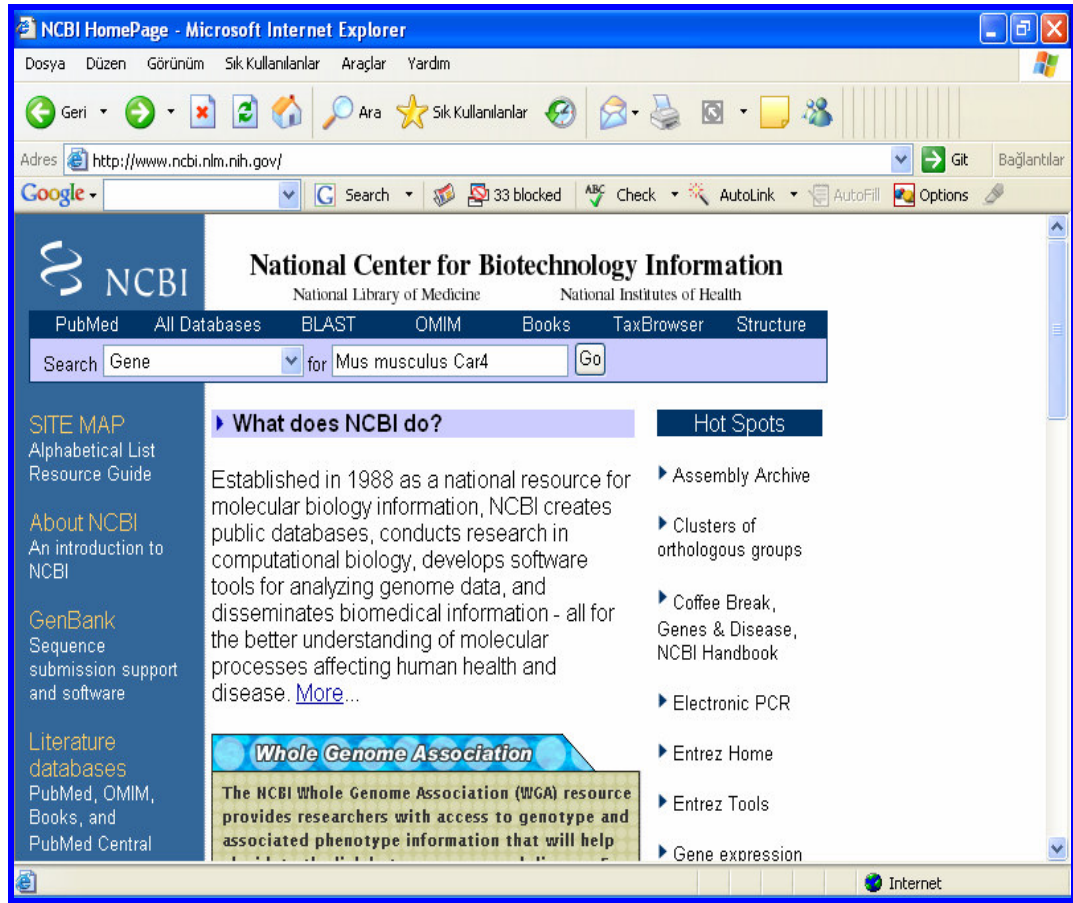
3. Primer dizaynı için http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi web sayfasına girildi. Şekil 3.9'da kopyalanan gen sekansı, kaynak sekans kutusuna yapıştırıldı (Şekil 3.10) ve aşağıdaki bilgiler girildi (Şekil 3.11):

Sequence ID	: Genin kısa adı
Product Size Ranges	: İstenilen uzunluk
Primer Size	: Min: 19 Opt: 20 Max: 21
Primer Tm	: Min: 57.0 Opt: 60.0 Max: 61.0 Max Tm Dif:100
Primer GC%	: Min: 20.0 Opt: 50.0 Max: 80.0

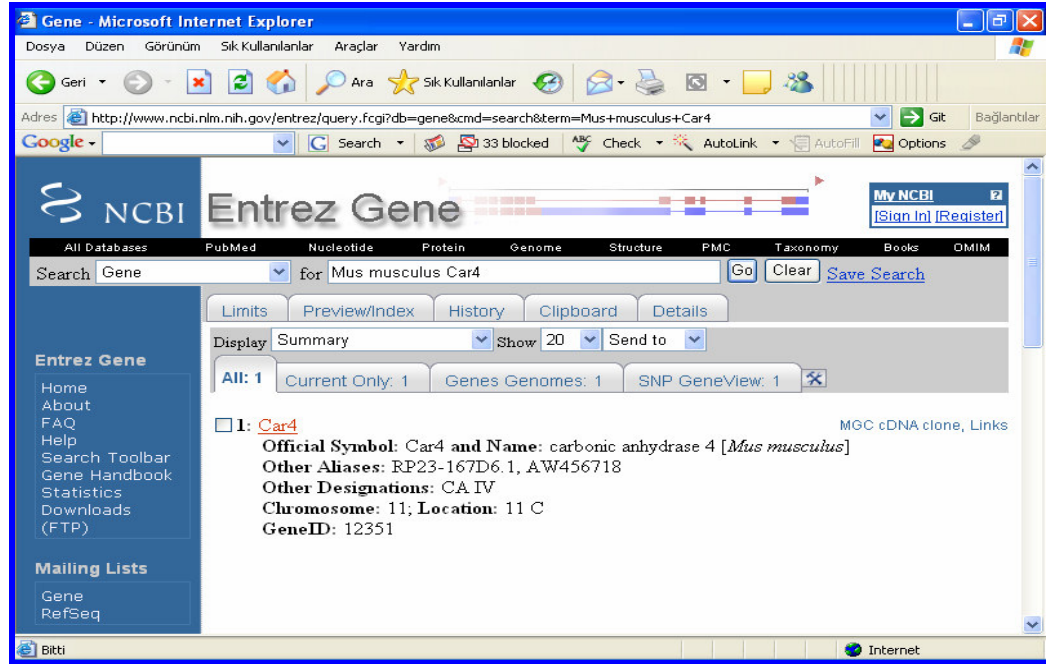
“Pick primers” tuşuna basıldı. Seçilen primerler ekrana geldi (Şekil 3.12). Primer seçiminde bu yöntem için, primerin A veya T ile başlaması G ve C ile sonlanması idealdir. Yine 4 veya daha fazla nükleotidin peş peşe gelmesi nonspesifik bağlanmaya yol açabilir. Bundan kaçınılmalıdır. Bu nedenlerle programın verdiği primerler her zaman uygun olmayabilir. Bu durumda programın verdiği bölgenin civarında primer dizaynı yapılabilir. Burada left ve right primerleri seçildikten sonra son kontrol olarak iki işlem yapılabilir

Seçilen her iki primer için ayrı ayrı olarak, başka genlerle homolojisinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla blastlama yapılabilir. Sonuçlar Şekil 3.13-16'de verilmiştir.

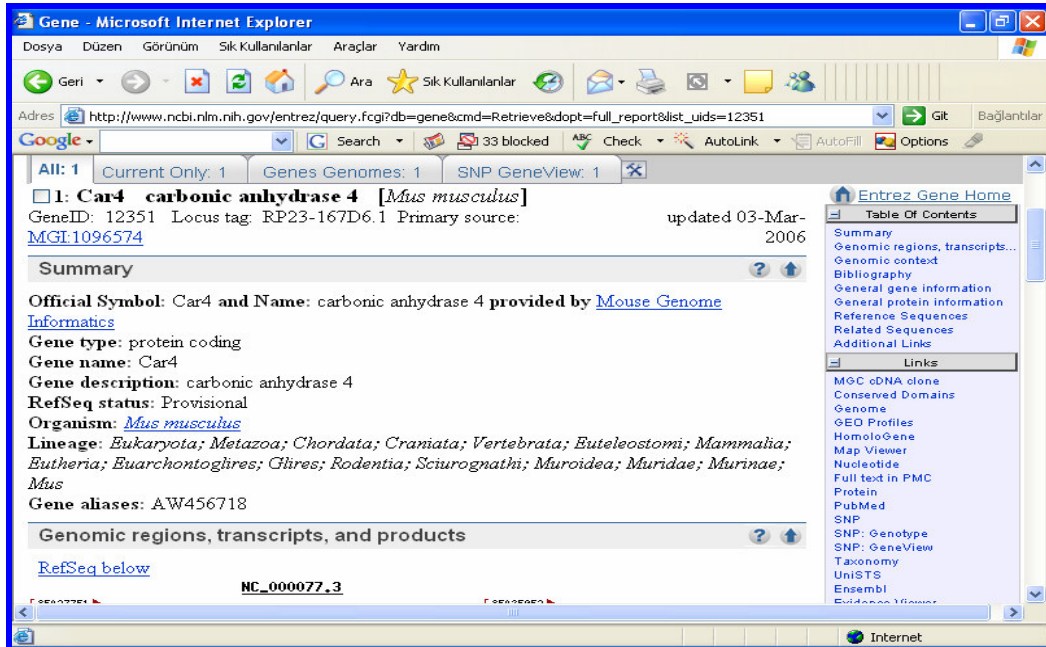
Left ve right primerlerin başlangıç noktaları belirlenir. cDNA probu olan bu bölge seçilerek blastlanır ve diğer genlerle homoloji olup olmadığı belirlenir (Şekil 3.17–3.18). Bu iki kontrol beraberce yapılabilir. Başka genlerle homoloji göstermediği anlaşılırsa bu primerler emniyetle kullanılabilir. Burada her iki işlem de yapılmıştır.



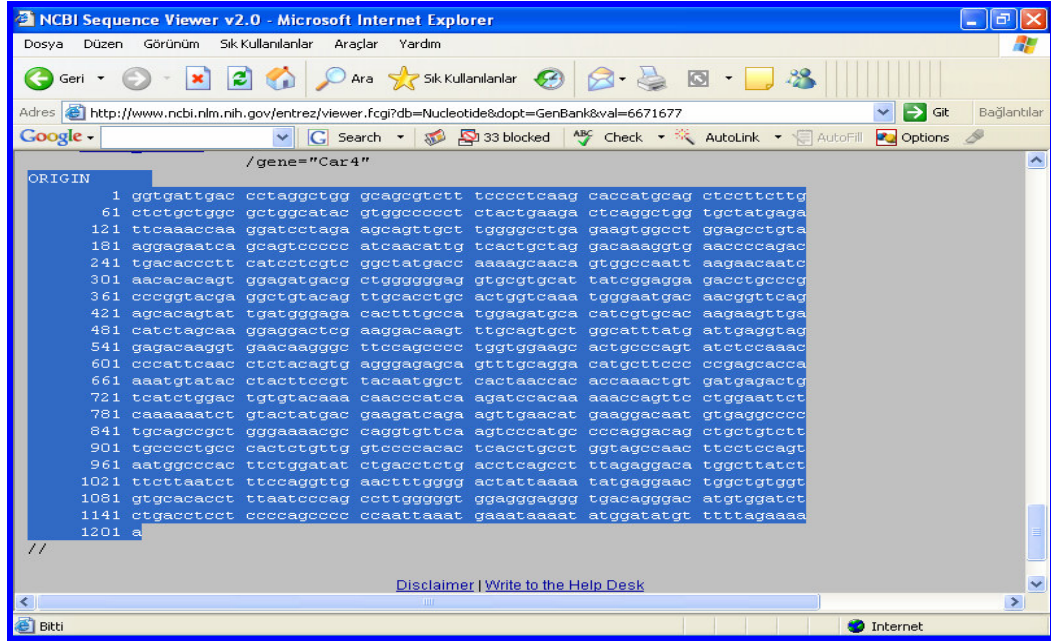
Şekil 3.1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> sayfası: Search'den Gene seçildi, For karşısına organizma olarak "Mus musculus" ve araştırılacak genin kısa adı yazıldı, go tuşuna basıldı.



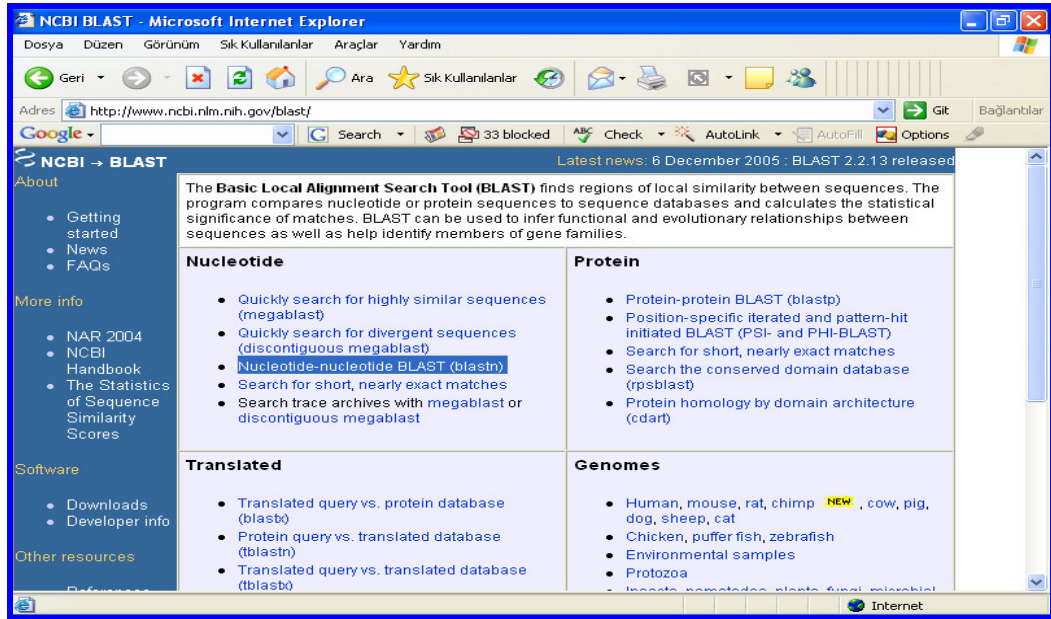
Şekil 3.2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> sayfasında bulunan aranan fare geni için sorgu sonuçları



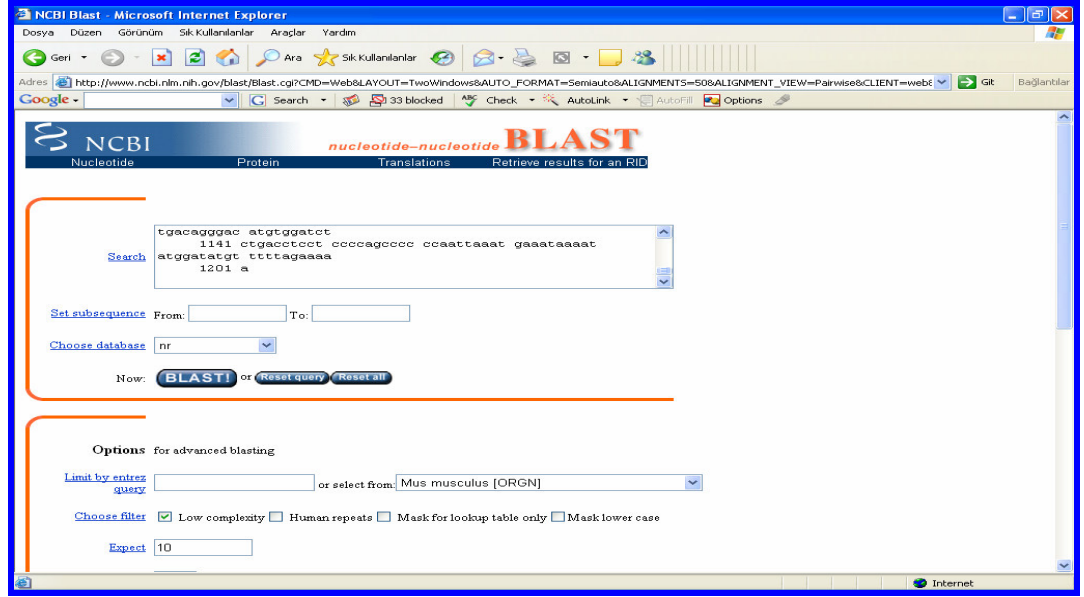
Şekil 3.3. Aranan fare geninin özellikleri.



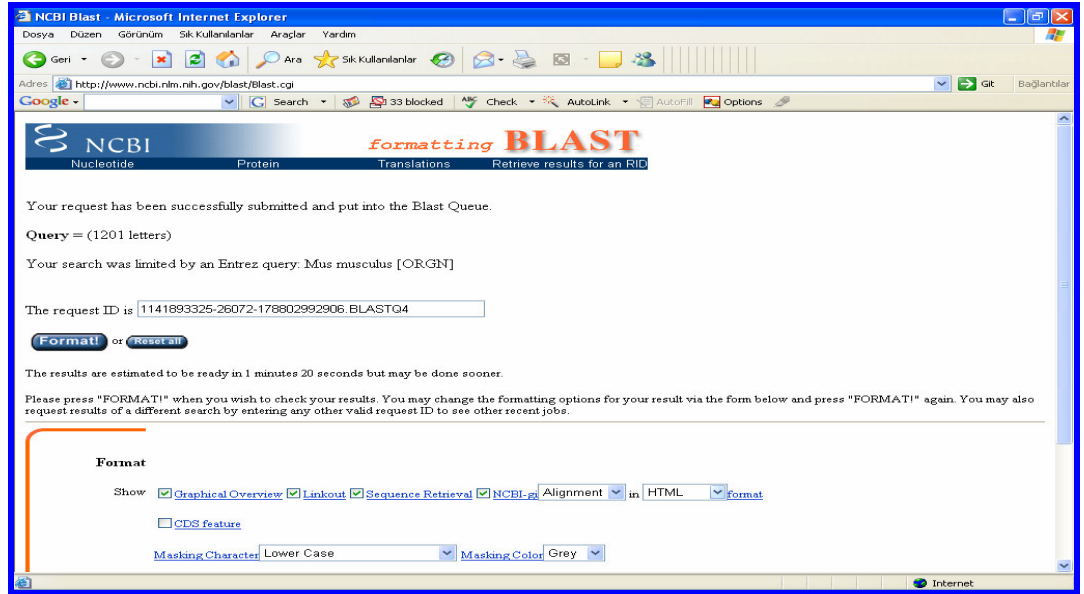
Şekil 3.4. Aranılan fare geninin sekansı.



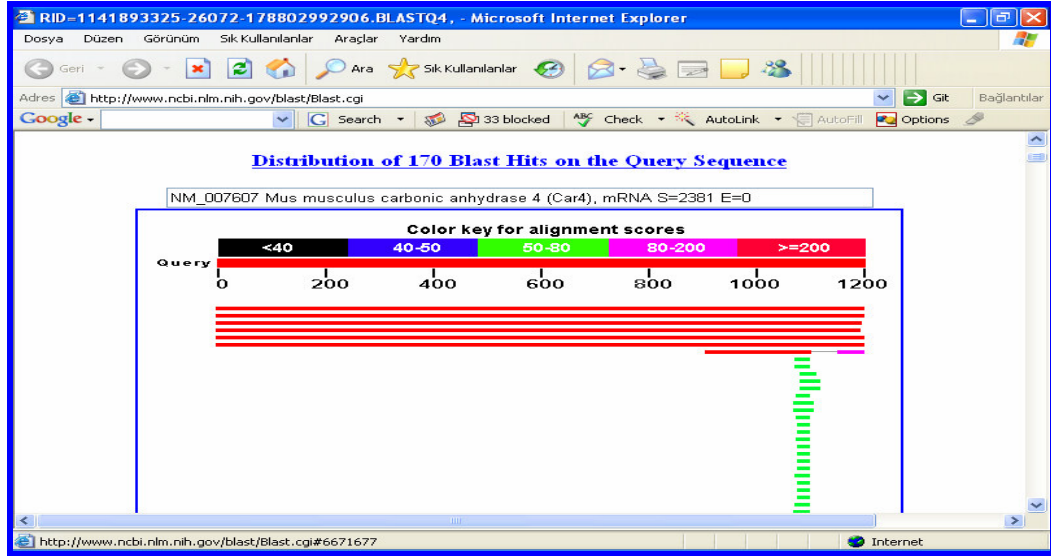
Şekil 3.5. Blastlamanın yapıldığı web sayfasının girişi. “Nucleotide” başlığı altında “Nucleotide-nucleotide-BLAST (blastn)” tuşuna basılarak işlem başlatıldı.



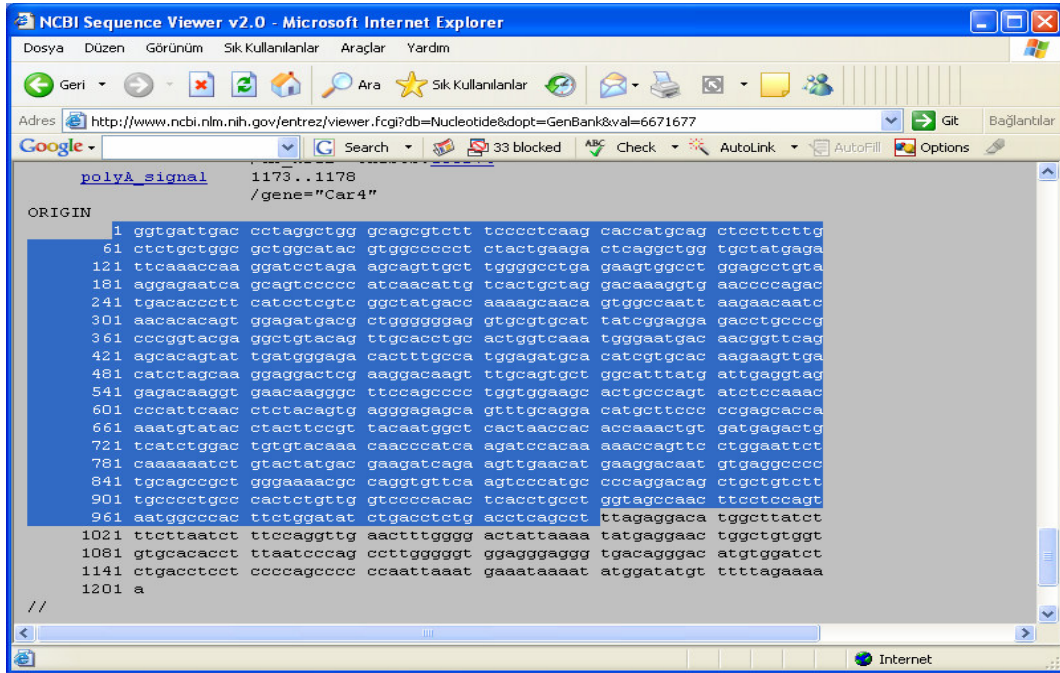
Şekil 3.6. Blastlamanın yapılacağı web sayfası: Seçilen genin sekansı, “Search” karşısındaki kutu içine yapıştırıldı.”Choose database” kısmına “nr” (nonredundant) ve “or select from” karşısına “Mus musculus[ORGN]”seçildi ve “BLAST” tuşuna basıldı.



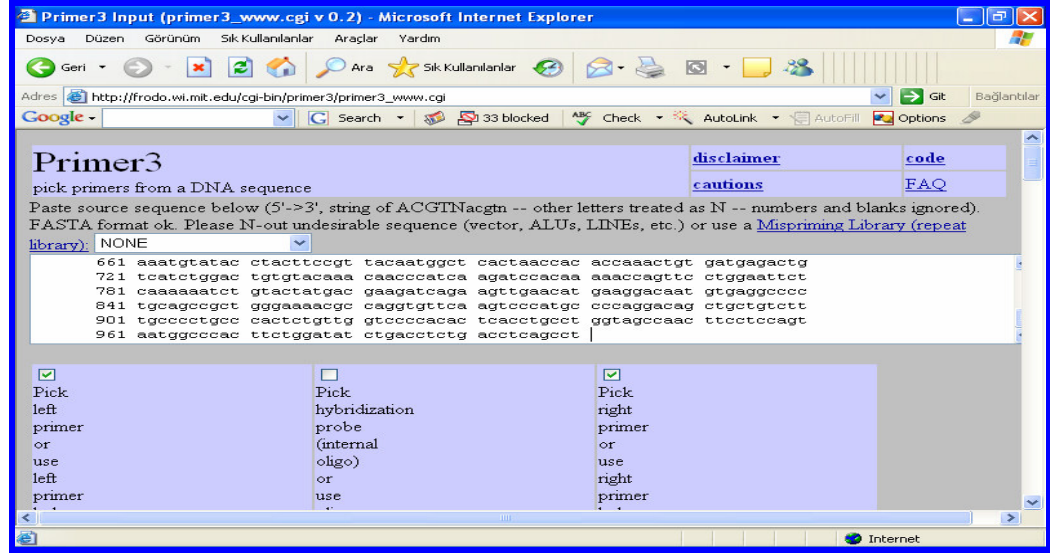
Şekil 3.7. Blastlamanın yapılacağı web sayfası “format” tuşuna basılarak sorgu sonucu beklendi.



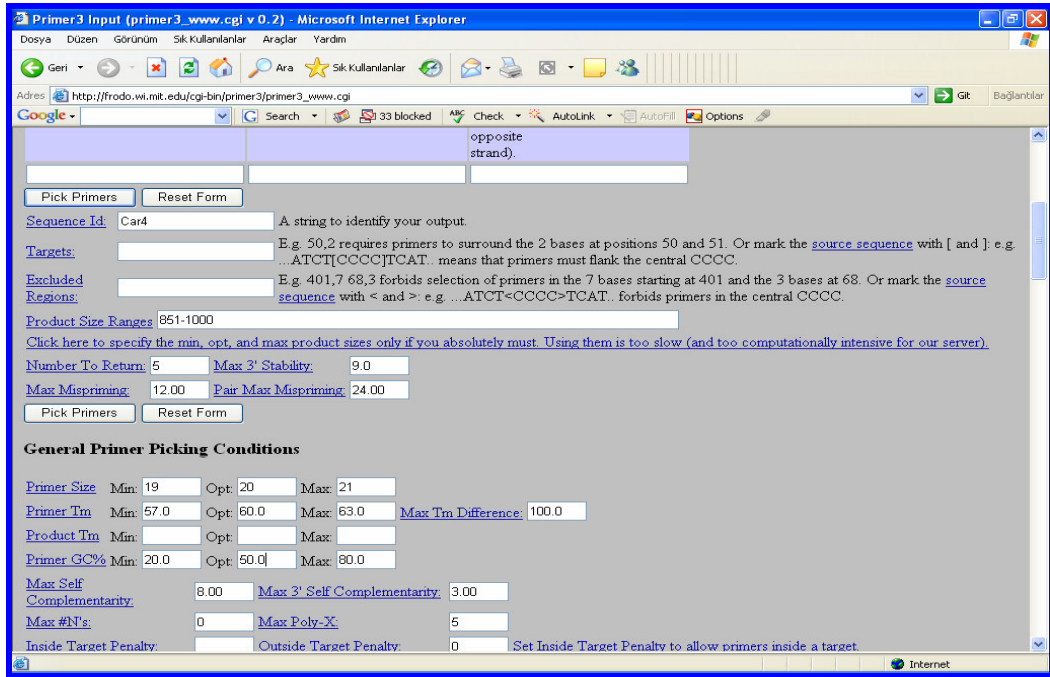
Şekil 3.8. Aranılan fare geni için yapılan blastlama sonucu.



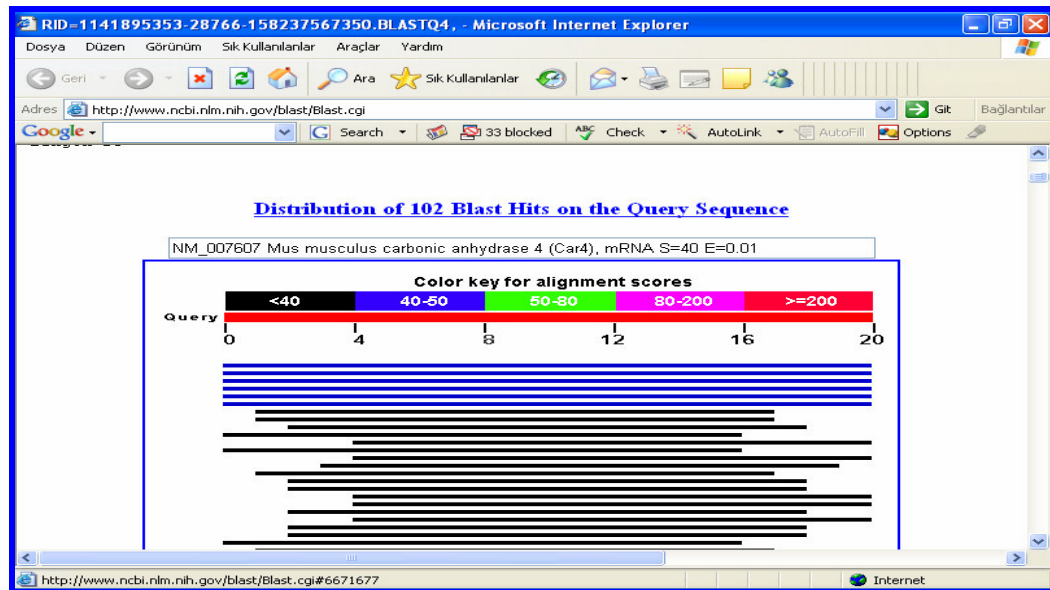
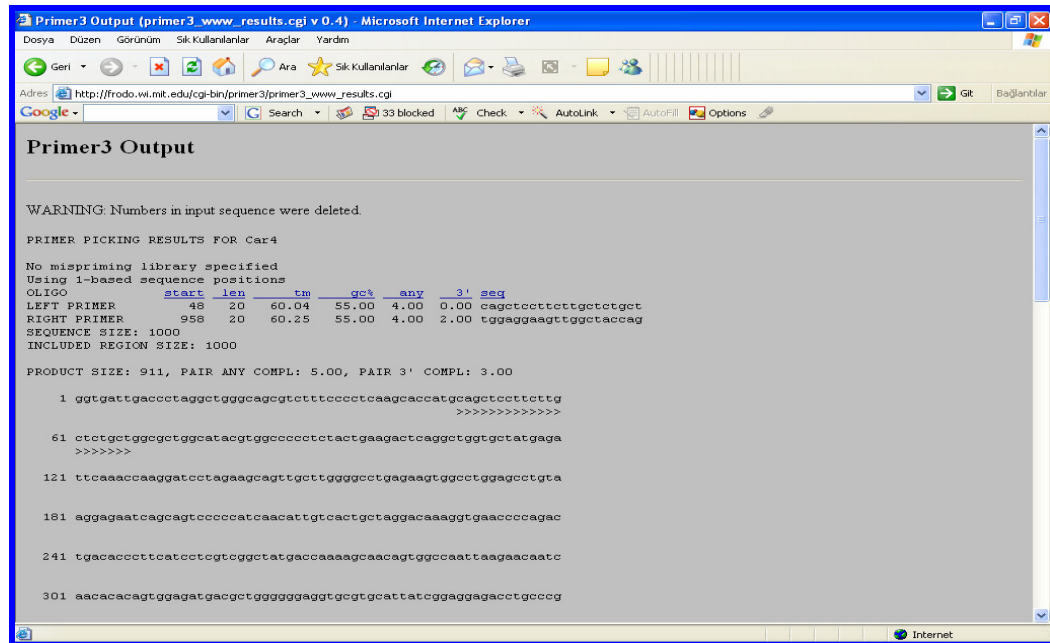
Şekil 3.9. Aranılan fare geni için, diğer genlerle en az homolojinin olduğu ve baz sıralamasında 0-1000 arasındaki bölgeden seçilen cDNA parçası.

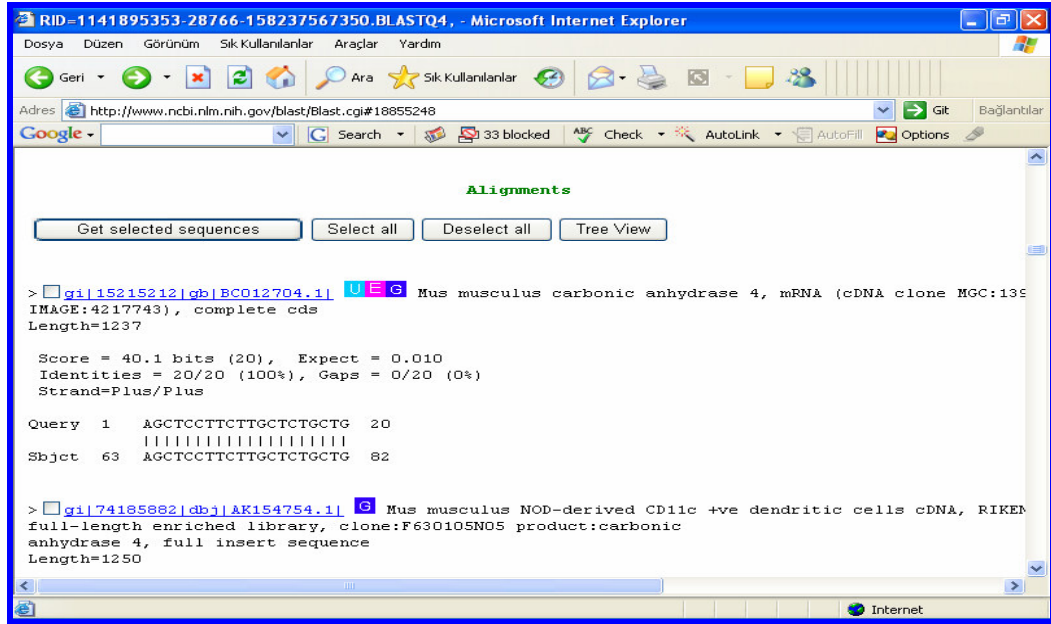


Şekil 3.10. Primer belirlemek için kullanılan site: Gen sekansı yukarıdaki kutucuğa yapıştırıldı.

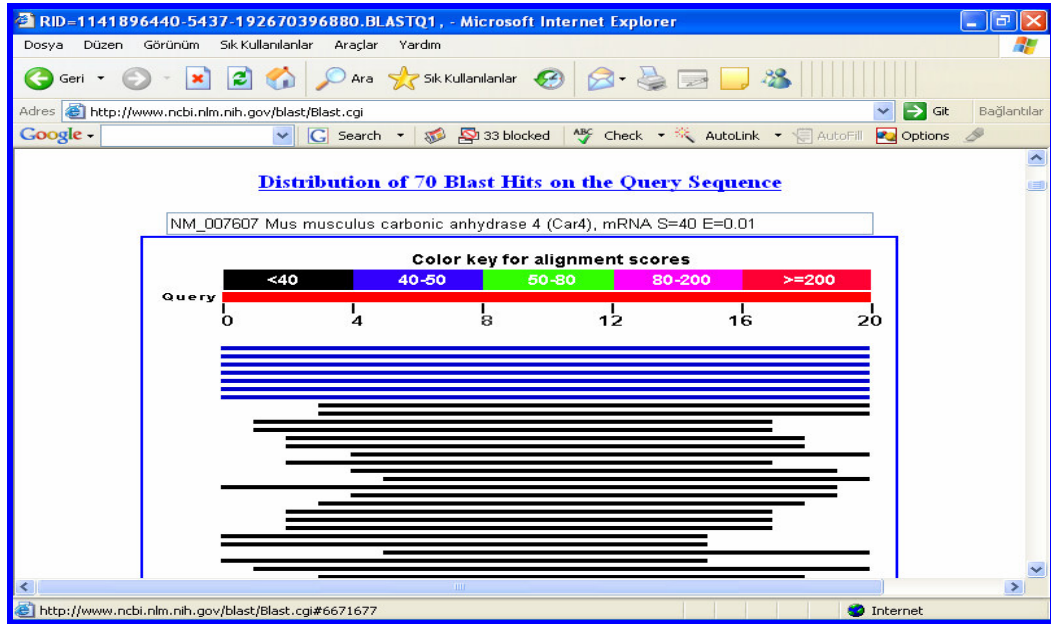


Şekil 3.11. Primer belirlemek için kullanılan site: Genin kısa adı, istenen cDNA boyutu, primer büyüklüğü vb. bilgiler girildi.

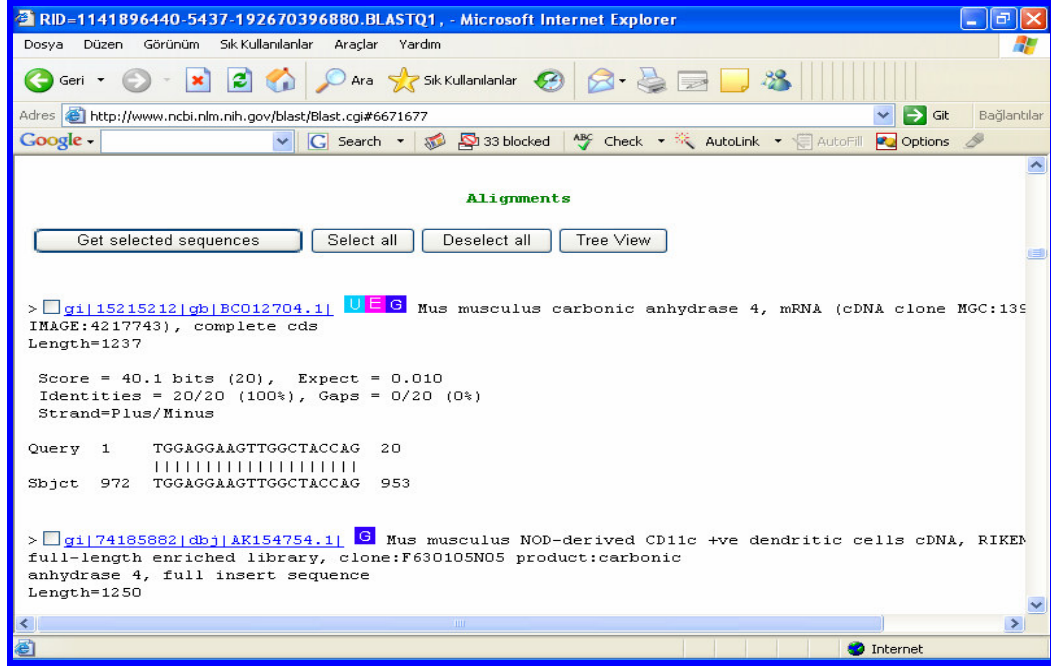




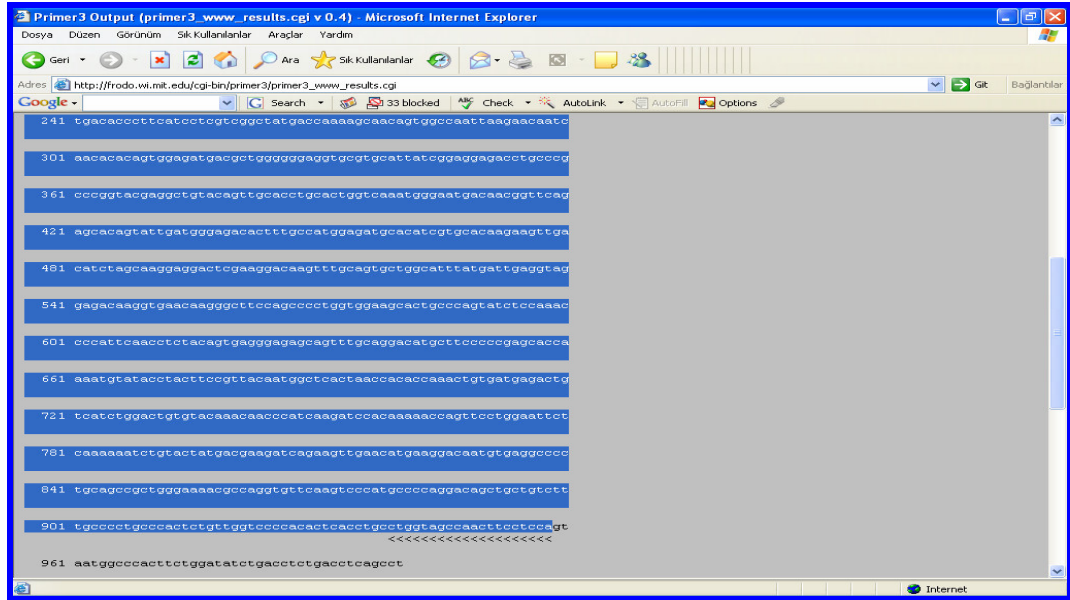
Şekil 3.14. Left (forward) primerin blastlama sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primerlerle homolojisi olan genler. Query: verilen primerin baz sırası, Sbjct: Homoloji gösteren genin ilgili bölgesi.



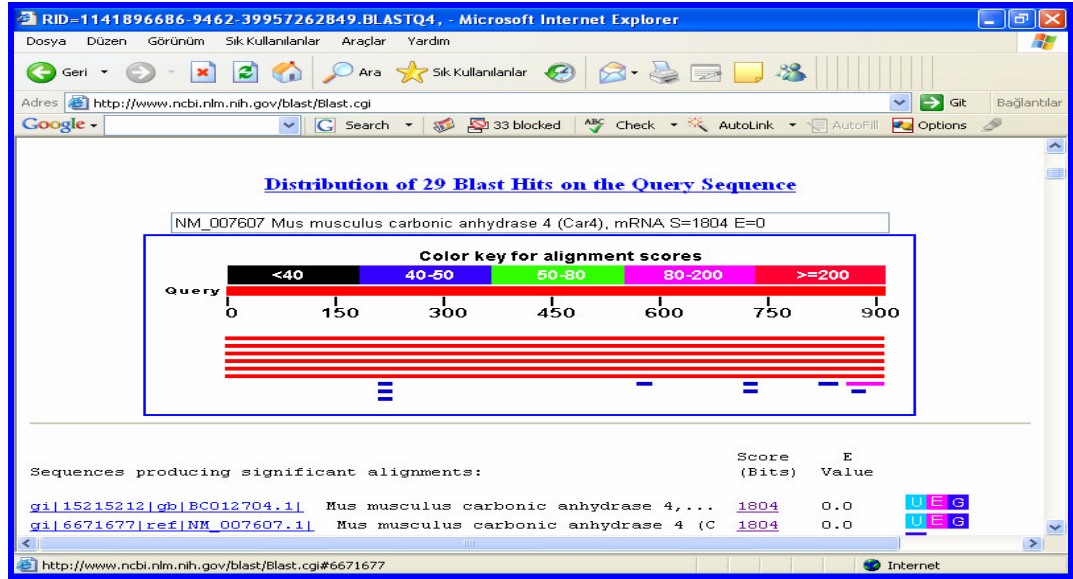
Şekil 3.15. Right (revers) primerin blastlama sonucu.



Şekil 3.16. Right (revers) primerin blastlama sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primerlerle homolojisi olan genler. Query: verilen primerin baz sırası, Sbjct: homoloji gösteren genin ilgili bölgesi.



Şekil 3.17. cDNA'dan üretilecek olan DNA parçası (cDNA probu).



Şekil 3.18. cDNA probu için yapılan blastlama sonucu.

3.5. RNA-İzolasyonu

cDNA kütüphanesi oluşturmak için, genin cinsine göre fare embriyosu veya yavru farelerden önce mRNA saflaştırıldı; revers transkriptaz enzimi ve diğer kimyasallar vasıtası ile cDNA kütüphanesi elde edildi. Fare beyni (P0, P7, vb.) ve fare embriyosundan (E10,5; E14,5 vb.) RNazol kiti ile izole edilen total RNA, cDNA kütüphanesi üretilmesinde kullanıldı.

Hazırlanmış olan dokudan 1,5 ml'lik bir ependorf tüpüne maksimum 40 mg alınmalıdır. Sırası ile şu işlemler yapıldı.

1. Tüpün içindeki doku üzerine 800 µl RNAzol B eklendi ve tamamen homojenize oluncaya kadar karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 80 µl kloroform eklenerek 20 s karıştırıcıda karıştırıldı, ardından 5 dakika buz içinde bekletildi.

2. Bekleme işleminin ardından 15 dakika 4⁰C’de maksimum hızda santrifüj edildi ve süpernatant atıldı ve 1 ml % 75’lik etanol ile tekrardan çökelek çözüldü. 5 dakika 4⁰C’de maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant tekrardan atılarak çökelek 5 dakika vakum kurutucusunda kurutuldu. Ardından 87 µl DEPC su ile 60⁰C 10 dakika bekletilerek çözüldü.

3. Bu işlemin ardından 99 µl su ve 1 µl hazırlanan çözeltiden alıp 260 nm’de konsantrasyonunu ölçüldü ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapıldı.

$$\mu\text{g} = \text{OD}_{260} \times 310$$

4. Konsantrasyona bakıldıktan sonra DNaz kullanılarak ortamdaki DNA’lar parçalandı. Bunun için aşağıdaki karışım hazırlandı.

RNA ekstraktı	86µl
10x PCR2 tamponu	10µl
RNaz inhibitörü	2µl
DNaz I (RNaz’sız)	2µl

5. Hazırlanan karışım 37⁰C’de 30 dakika inkübe edildi. 150 µl DEPC’li su ve 250 µl PIC (fenol: kloroform: izoamil alkol: 25:24:1 şeklinde) alındı ve 30 dakika bekletilen karışım üzerine eklendi. 5 dakika 4⁰C’de maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant başka bir tüpe alıp 250 µl kloroform eklendi. Tekrardan 5 dakika 4⁰C’de maksimum

hızda santrifüj edildi. Süpernatant yine başka bir tüpe aktarıldı ve 750 µl etanol ile 6,25 µl 3 M sodyum asetat eklendi. 30 dakika 4⁰C’de maksimum hızda santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 1ml etanol çökelek üzerine eklendi ve 5 dakika 4⁰C’de maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve vakum kurutucusunda 10 dakika kurutuldu. Son olarak µl’de 0,5 µg olacak şekilde hesaplama yapıldı ve bulunan miktarda DEPC’li su alınarak 60⁰C’de 10 dakika bekletilerek çözüldü ve kullanılıncaya kadar -80⁰C’de saklandı.

3.6. cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması (RT-PCR)

ThermoScript™RT-PCR sistemi ile cDNA sentezlendi. Bunun için iki karışım hazırlanır.

Karışım 1:

Oligo (dT)-Primer: 3 µl
RNA : 6 µl (0,5µg/µl)
DEPC-su : 21 µl

Yukarıdaki miktarlar alındı ve PCR tüpüne konup 65⁰C’de 5 dakika bekletildi.

Karışım 2 (Her bir cDNA stoku için).

5x cDNA sentez tamponu (vortex) : 12 µl
0,1M DTT : 3 µl
RnaseOut™ (40 U/µl) : 3 µl
DEPC-su : 3 µl
10 mM dNTP-Mix : 6 µl
ThermoScript™RT (15 U/µl Polimeraz) : 3 µl

Karışım 1’de hazırlanan tüp üzerine karışım 2 eklenip vortekslendi. Karıştırma işleminin ardından 60 dakika 50°C’de ve daha sonra 85°C 5 dakika PCR cihazı içinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1 µl RNazH ilave edilip PCR cihazında 20 dakika 37°C’de bekletilerek reaksiyon durduruldu. Hazırlanan ürün -80°C’de saklandı.

3.7. Spesifik Genler İçin cDNA Problarının Hazırlanması

cDNA kütüphaneleri her gen için spesifik primerler (T7 promoter- forward primer, SP6 promoter-revers primer) kullanılarak, PCR cihazında ilgili cDNA’lar çoğaltıldı. PCR işleminden sonra agaroz jel elektroforeziyle cDNA probunun sentezlenip sentezlenmediği kontrol edildi. Sırası ile yapılan işlemler aşağıda gösterilmiştir.

PCR PROGRAMI

LID 105°C WAIT AUTO

- 1.) PAUSE PRESS ENTER
- 2.) T=94 °C 2 dakika
- 3.) PAUSE PRESS ENTER
- 4.) T=94 °C 25 saniye
- 5.) T=57 °C 25 saniye
- 6.) T=72 °C 1.15 dakika
- 7.) GOTO 4 REP 35
- 8.) T=72 °C 9 dakika
- 9.) HOLD 4 °C ENTER

Reaksiyon için küçük eppendorf PCR (200µL) tüpü kullanıldı. PCR işlemi ise ilk önce PCR cihazının kapak sıcaklığı 105°C ayarlandı; daha sonra çalışılan reaksiyon karışımının denatürasyonu için 2 dk 95°C bekletildi. Bu işlemin ardından 35 kez tekrarlanacak olan reaksiyon işlemlerine geçildi. Burada birinci olarak 94°C 25 s

denatürasyon, 57°C 25 s primerin yapışması ve 72°C 1.15 dakika cDNA'nın uzaması yapıldı. Bu işlemlerin ardına son basamak olan 72°C'de 9 dakika bekletildi

Çizelge 3.2 Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı;

H ₂ O	14µL
10x Tampon	2,5µL
Q (enhancer)	5µL
dNTP'ler (2mM,roche)	0,5µL
T7-Forward primer (10 pmol/ µL)	1µL
SP6-Revers primer (10 pmol/ µL)	1µL
Template (RT-ürünü)	1µL
Enzim Taq-Polimeraz	0,2µL

Hazırlanan bu karışım yukarıda yapılan PCR programı çalıştırılarak PCR cihazına yerleştirildi. PCR işlemi bittikten sonra agaroz jel (%1'lik) elektroforeziyle genin sentezlenip sentezlenmediğine bakıldı. Sentezlenemeyen cDNA problemleri için gradientli PCR yapıldı. Bu işlem sırasında annealing (yapışma) sıcaklığı olarak 45-65°C aralığı seçildi. Elektroforez işleminden sonra DNA konsantrasyonu bulmak için aşağıdaki formül kullanıldı. cDNA problemleri bu şekilde sentezlenip kontrolü de yapıldıktan sonra antisens mRNA hazırlanması için -20°C'ye kaldırıldı.

$$\text{DNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{seyrelme faktörü} \times 50$$

Elektroforezde yürütüldükten sonra sentezlenen cDNA probunu safsızlıklardan uzaklaştırmak için jelden kesilen ürüne belirli bir saflaştırma kit protokolü uygulandı. Jel ekstraksiyon kiti protokolüne göre;

1-) DNA parçası jelden kesilerek ependorf tüpe kondu.

- 2-) Jel tartıldı ve ağırlığının üç katı hacminde Buffer QG ilave edildi.
- 3-) 50 °C de 10 dakika ısıtıcı blokunda ısıtılarak jelin erimesi sağlandı.
- 4-) Jel ağırlığınca bir hacim izopropanol ilave edilerek yıkama yapıldı.
- 5-) 2 ml hacimdeki saflaştırma kitine karışım konuldu.
- 6-) Karışım 17.000 rpm de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 7-) Tüpteki karışım boşaltılıp 0,5ml Buffer QG ilave edilip 1 dk santrifüj yapılarak karışım yine döküldü.
- 8-) Tüpe 0,75 ml Buffer PE ilave edilip 1dakika santrifüj yapıldı ve karışım tüpten boşaltılarak boş tüp 5dakika santrifüj katıldı.
- 9-) 30ml Buffer EB ilave edilip saflaştırma kitindeki DNA elüe edildi.

Elde edilen saf DNA probuna ürün miktarını artırmak için II.PCR uygulandı ve PCR ürününe saflaştırma kiti işlemi uygulandı. PCR ürünü saflaştırma kiti protokolüne göre:

- 1-) PCR numunesinin hacim olarak 5 katı PB tamponu eklendi ve karıştırıldı.
- 2-) 2 ml'lik ependorf tüpüne QIAquick kolonu yerleştirildi.
- 3-) DNA'yı bağlamak için numune QIAquick kolonuna tatbik edildi ve 30-60 saniye santrifüjlendi.
- 4-) Sıvı kısım atılarak kolon aynı tüpe yerleştirildi.
- 5-) Yıkamak için 0,75ml PE tamponu kolona eklenerek 30-60 saniye santrifüjlendi.
- 6-) Sıvı kısım atılarak kolon aynı tüpe yerleştirildi. İlaveten 1 dakika daha santrifüj yapıldı.
- 7-) Kolon 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne kondu.
- 8-) DNA'yı elüe etmek için 50 µl EB tamponu QIAquick membranının merkezine eklendi ve 1 dakika santrifüjlendi.

3.8. Antisens mRNA Üretimi

Hazırlanan cDNA problemleri üzerinde sırası ile aşağıdaki işlemler yapıldı. Çizelge 3.3'de hazırlanan karışım 37°C'de 4-5 saat inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 3.3. Antisens mRNA üretimi için ependorf tüpüne yapılan pipetlemeler

SP6 RNA polimeraz	1µl
RNAsin	1µl
Dig RNA labeling mix, 10x	2µl
Tampon 10x	2µl
DNA	2µl
DEPC- su	12µl

Daha sonra DNaz ile muamele edilerek DNA'nın sindirilmesini sağlandı. Bu amaçla çizelge 3.4'de göre karışım hazırlandı ve bir önceki basamakta hazırlanıp reaksiyon için inkübasyona bırakılan karışım üzerine eklendi. Bu şekilde reaksiyonun durdurularak ortamda kalan cDNA'nın DNaz ile parçalanması sağlandı.

Çizelge 3.4. Dnaz karışımının hazırlanması

DNaz I (10U/µl)	0,1µL
0,3 M MgCl ₂	0,08µL
H ₂ O	0,82µL

Karışım 37⁰C' de 15 dakika inkübasyonda bıraktıktan sonra RNA çöktürmesi yapıldı. RNA'yı çöktürmek için aşağıdaki işlemler uygulandı;

a) Ortama 72 µL 4 M NH₄CH₃COO katıldı. Daha sonra 470 µL -80⁰C'de %100 etil alkol katıldı.

b) Bir gece -20⁰C'de veya 30 dakika -80⁰C'de bekletildi.

c) 20 dakika 13000 rpm’de santrifüj (soğukta) edildi. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı.Çökelek üzerine aşağıdaki pipetleme yapıldı.

d) 640 µl %70’lik etil alkol (-20⁰C) katıldı. 20 dakika 13000 rpm’de santrifüj (soğukta) edildi. Tekrardan süpernatant atıldı.Çökelek 22 µl DEPC’li su ile çözüldü.

e) Çözeltiden 1 µl alınıp, 100 µl destile su ile seyreltilerek 260 nm’ de absorbans ölçüldü ve RNA miktarına bakıldı. Hesaplamalar aşağıdaki formüle göre yapıldı. Bu işlemde seyrelme faktörü 50’dir.

$$\text{RNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{seyrelme faktörü} \times 40$$

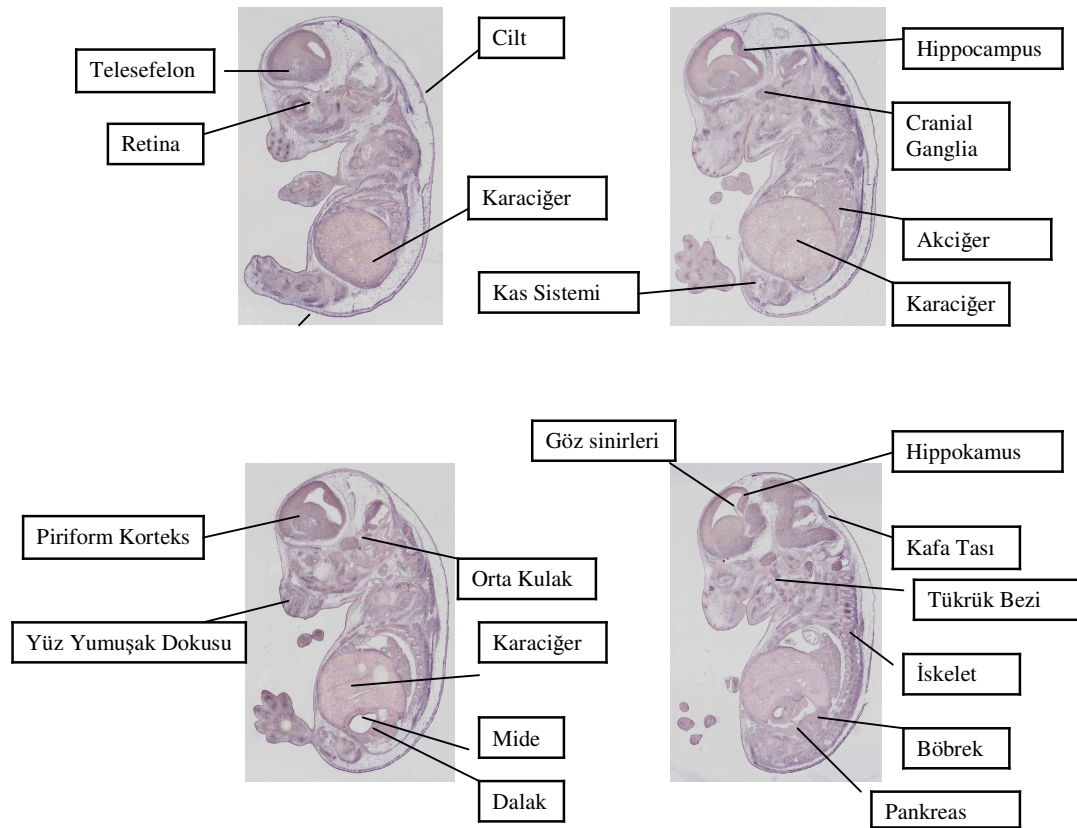
Konsantrasyon ölçme işleminden sonra 2 µl alındı ve agaroz jel elektroforezi (%1’lik) uygulandı. Jelde yürütmeden önce 6 dakika 70⁰C’de bekletildi ve ardına 2 dakika buz içine alındı. Bu işlemden sonra jele yüklenerek yürütüldü.

3.9. *In situ* Hibridizasyon (ISH) Yönteminin Uygulanması

Bu metot, antisens mRNA probları kullanılarak; birçok aşamadan oluşan bir prosedür olan ISH yöntemi ile mRNA'ların hazırlanan dokularla reaksiyona sokulmasıyla ekspresyonların gösterilmesi işlemidir. ISH birçok aşamadan oluşmaktadır. Bunları genel olarak sıralayacak olursak;

1. Örneklerin hazırlanması ve dokunun fiksasyonu,
2. Ön hibridizasyon işlemi,
3. Probların ilavesi ve hibridizasyon işlemi,
4. Son hibridizasyon işlemi ve spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi,
5. Slâytların bir seri çözeltiden geçirilerek fikse edilmesi ve üzerlerinin lamelle kapatılması,
6. Örneklerin mikroskopta incelenip uygun olanlar taranarak genel kullanım için internet ortamına aktarılması.

Slâytların sandviç şeklinde (Şekil 3.21) hazırlanmasında kullanılan özel camlar bir gece 180°C sıcaklıktaki fırında bekletildi. Kullanılan bütün çözeltilerin büyük bir kısmı otoklav yapıldı veya özel şekillerde hazırlandı. RNA'ları korumak için DEPC'li su kullanıldı ve böylece Rnaz'a karşı korundu. 14,5 günlük fare embriyosu fareden alındıktan sonra OCT (optimal freezing medium) içine gömüldü. Bu amaçla özel alaşımlı kaplar kullanıldı. Bu özel kaplar içine konulduktan sonra ani dondurmayla dondurulan embriyo -70⁰C'de saklandı (Herzig 2001). Mikrotom cihazı kullanılarak lamalar üzerine 14,5 günlük fare embriyoları 20 µm kesitler halinde yayıldı. 14,5 günlük fare embriyosunun bazı kesitleri şekil 3.19'daki gibidir.

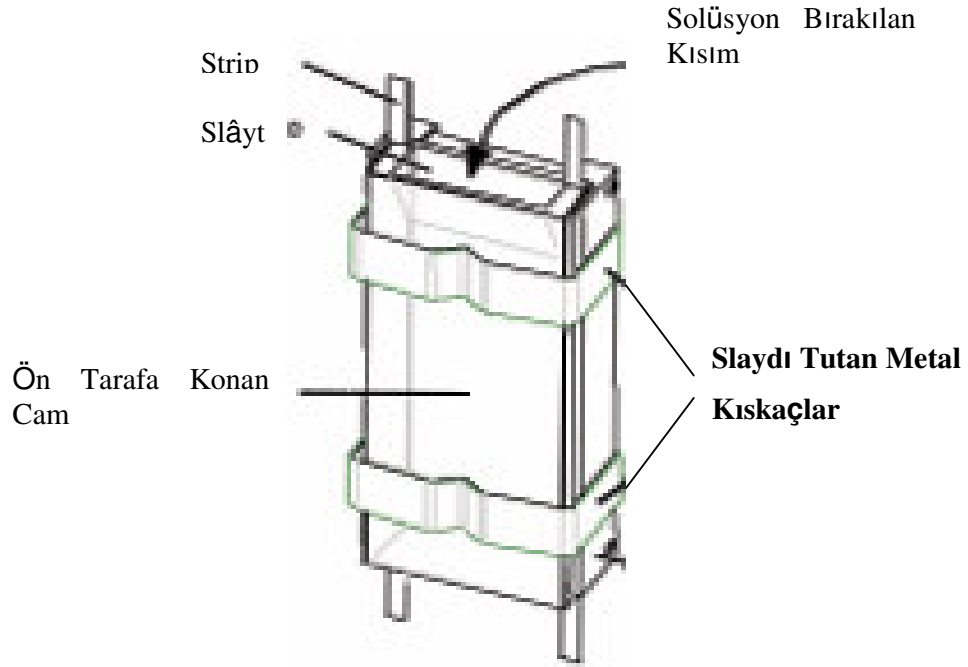


Şekil 3.19. 14,5 günlük fare embriyosundaki bazı organ ve yapıların yerlerinin gösterilmesi.

In situ hibridizasyon yaparken kullanılan cihazlar değişik şekillerde dizayn edilmiştir. Bunlardan bir tanesi de Tecan Genesis ISH uygun platformudur. Bahsedilen cihazın şekil 3.20'deki görünümünden de anlaşılacağı gibi, 2x48'lik özel bölme, n hibridizasyon, hibridizasyon, son hibridizasyon ve prob ilavesi işlemleri otomatik şekilde yapılır. Cihaz Gemini adlı bilgisayar programı ile kontrol edilir.



şekil 3.20. Tecan Genesis platformu; *in situ* hibridizasyon yapmaya uygun şekli (A) Genesis RSP 150 platformu, (B) İki zel kaptan oluşur. Kapların her birisi 6 bölme içerir, her bir bölmede 8 tane slyt yerleştirilecek kısım vardır.



Şekil 3.21. Slaytların hazırlanma şekli (sandviç) slayt resminde slayt ile kullanılan cam arasındaki boşluk 80 µm ve slaytın kapladığı toplam hacim ise 400 µL'dir.

Slâytlar hazırlanıp cihaza yerleştirilir ve sırası ile aşağıdaki şekilde açıklandığı gibi işlemler yapılır.

A. Yıkama ve ön hibridizasyon işlemleri;

1. İlk basamakta slaytların üst kısmından 5 kez 5'er dakika % 0,6 H₂O₂ (hidrojen peroksit) ilave edilmiş CH₃OH (methanol) uygulandı ve ardından 8 kez % 0,05 tween içeren 1xPBS ile yıkandı.

2. Yıkamadan sonra 2 kez 4'er dakika % 0,05 tween içeren 0,2M'lık HCl ile muamele edildi. Tekrar 4 kez % 0,05 tween içeren 1xPBS ile yıkandı.

3. Bu işlemten sonra 2 kez 10 dakika 1xPK (proteinaz K) tamponu içinde hazırlanmış PK (proteinaz K) uygulandı. Burada proteinaz K'nın konsantrasyonu dokunun türüne göre ayarlandı. 8 kez % 0,05 tween içeren 1xPBS ile yıkandı.

4. Slaytlar 1 kez 10 dakika % 0,05 tween içeren %4 PFA ile muamele edildi ve 8 kez % 0,05 tween içeren 1xPBS ile yıkandı. Bu aşama hem RNA'nın yerini bulması hem de hücre yapısının korunması için çok önemlidir. Çapraz bağlanmadan dolayı RNA probunun dokuya ulaşılabilirliğine dikkat edilmelidir.

5. Hazırlık aşamasının son kısmında 2 kez 15'er dakika Hyb-Mix (ISH tamponu) ile muamele edilerek ön hibridizasyon yapıldı.

B. Hibridizasyon işlemi; Bu sırada slaytlar 62°C'de 4,5 saat bekletildi. Bunun için her bir slayt, mililitresinde 300ng prob içeren 300µl hyb mix ile muamele edildi.

C. Spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi; Prob ile muamele görmüş slaytta bulunan doku üzerine çeşitli solüsyonlar uygulandı ve bundan sonra da renklendirmeden önce çeşitli spesifik reaktifler eklenip ardından renklendirme çözeltisi ile renklendirildi. Bu şekilde slaytın arka planının, spesifik olmayan ekspresyonların önlenmesine de çalışıldı.

1. 5 kez 6'şar dakika 5 x SCC ile yıkandı. Ardından 5 kez 12'şer dakika Formamid I çözeltisi ile yıkandı ve ardına 5'er kez 10'er dakika Formamid II çözeltisi ve 4 kez 8'er dakika 0,1xSSC ile yıkandı. Bunların 3 tanesi 64°C'de ve 1 tanesi de 25°C olmak üzere yapıldı.

2. Yukarıdaki işlemlerin ardından 4 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren 1xNTE yıkandı ve 6 kez 5'er dakika iyodo asetamid ile yıkandı. Bu basamak çok önemlidir; doku üzerinde bulunan enzimler ve bazı protein rezidülerinin aktiviteleri azaltılır veya tamamen bloke edilir.

3. 4 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren 1xNTE ile yıkanıp ardından 2 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren 1xTNT ile yıkandı ve %4 oranında sheep serum içeren çözelti 6 kez 5'er dakika uygulandı.
4. 4 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren 1xTNT ile yıkanıp ardından TNB blocking çözeltisi ile 2 kez 5'er dakika yıkandı. Bu basamakta spesifik olmayan bağlanmalar giderildi. Ardından tekrar 2 kez 5 dakika % 0,05 tween içeren 1xTNT ile yıkandı.
5. 2 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren maleat tamponu ile yıkandı ve blocking reaktifi ile 2 kez 10'ar dakika ardından tekrardan 2 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren maleat tamponu ile yıkandı.
6. 2 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren 1xTNT tamponu, ardından 2 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren ve her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol içeren TMN tamponu slaytlara eklendi ve 4 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren 1xTNT tamponu yıkandı.
7. TNB blocking çözeltisi ile 4 kez 10'ar dakika yıkandı ve 2 kez 30'ar dakika % 0,05 tween içeren antiDIG-POD (TNB tamponu içinde hazırlandı; seyrelme faktörü 600'dür.) ile doku reaksiyona sokuldu.
8. 6 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren 1xTNT tamponu yıkandı ve 1 kez 30 dakika % 0,05 tween içeren Tiamin-Biotin reaktifi ile doku reaksiyona sokuldu. Tiamin-Biotin reaktifi kendi özel solüsyonu ile hazırlandı.
9. 6 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren maleat tamponu ile yıkandı ve Neutravidin-alkalin fosfataz (blocking reaktifinin içine seyrelme faktörü 750 olan Neutravidin-alkalin fosfataz konarak hazırlandı) reaktifi ile 2 kez 30'ar dakika muamele edildi, ardına tekrardan 6 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren maleat tamponu ile yıkandı. Bu işlemin ardına 4 kez 5 dakika % 0,05 tween içeren 1xTNT tamponu yıkama yapıldı.

10. 2 kez 5'er dakika her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol içeren TMN tamponu yıkama yapıldı. 3 kez 13'er dakika renk reaktifi eklendi ve sonra dd su ile 4 kez 5'er dakika, 1 kez % 0,05 tween içeren 1x NTE, %1 oranında glutaraldehit içeren %4 PFA ile 1 kez 10 dakika yıkama yapıldı ve son olarak da saf su ile 4 kez yıkama yapılarak işlemler bitmiş oldu. Bu etaptan sonra slaytlar temizlenerek alındı ve bir gece kurumaya bırakıldı. Çizelge 3.5'de yukarıda açıkladığımız işlemler verilmiştir.

Çizelge 3.5 *In situ* hibridizasyon işlemlerinin basamaklar halinde gösterilmesi

1.Gün:

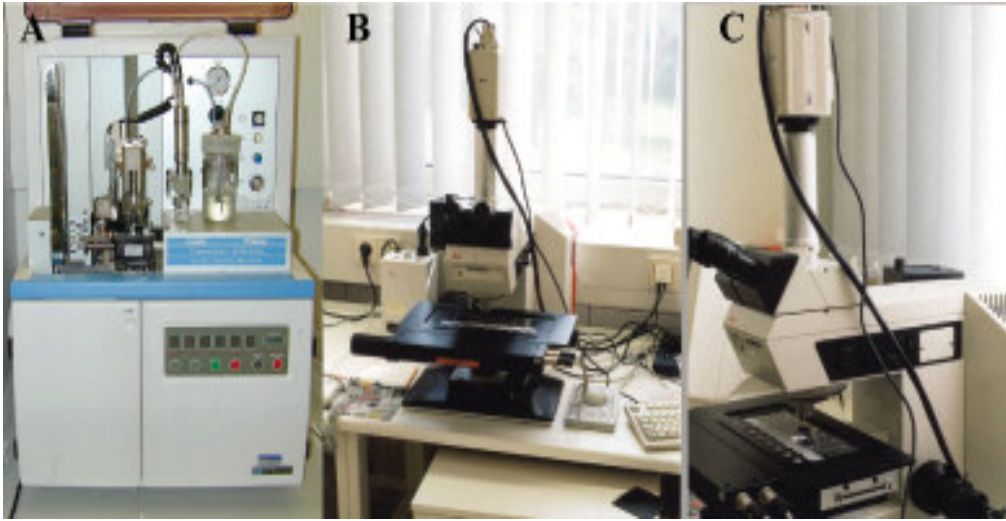
Tekrar sayısı	Hacim	Zaman	Kullanılan Çözelti	Sıcaklık
5	300µL	5dk	0,6% H ₂ O ₂ in MeOH	24°C
7	300µL	5dk	PBS 1	
2	300µL	5dk	0.2M HCl	
4	300µL	5dk	PBS	
1	400µL	5dk	proteinase K	
2	300µL	10dk	proteinase K	
7	300µL	5dk	PBS	
1	300µL	10dk	4% PFA	
7	300µL	5dk	PBS	
2	300µL	15dk	hyb-mix	64°C
1		5h	Prob ekleme	set 64°C

2.Gün

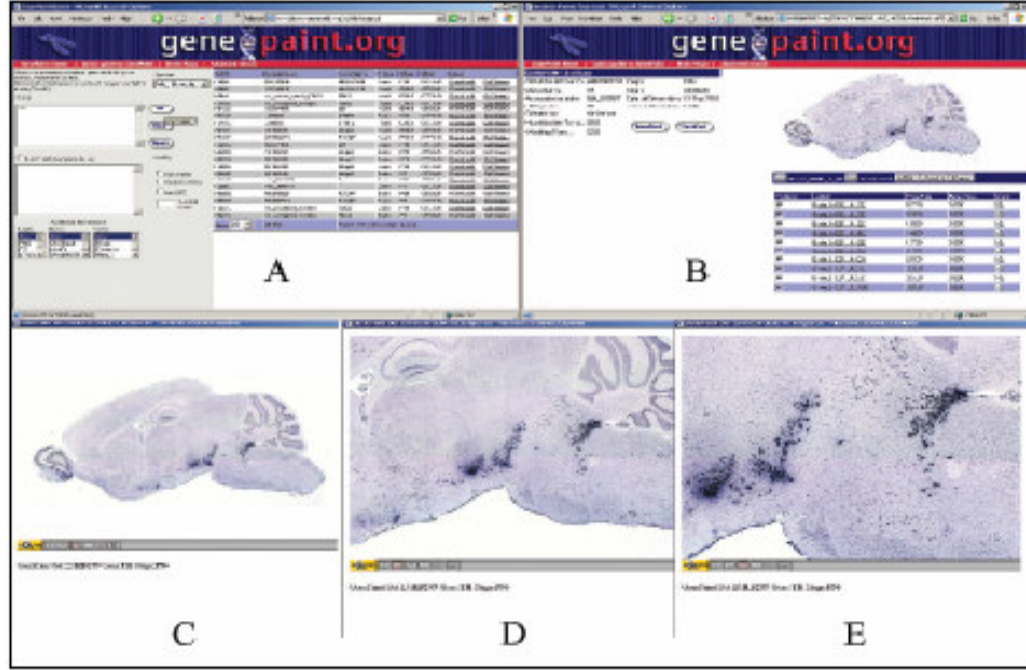
Tekrar sayısı	Hacim	Zaman	Kullanılan Çözelti	Sıcaklık
5	300µL	5dk	5 x SSC	62°C
5	350µL	10dk	formamide I	↓
5	350µL	12dk	formamide II	
3	300µL	8dk	0.1 x SSC	
1	300µL	8dk	0.1 x SSC	25° C
4	300µL	5dk	NTE 1	
6	300µL	5dk	20 mM iodoacetamide	
4	300µL	5dk	NTE 2	
2	300µL	5dk	TNT 1	
6	300µL	5dk	4% sheep serum	
4	200µL	5dk	TNT 2	
2	200µL	5dk	TNB blocking tamponu 1	
2	200µL	5dk	TNT 3	
2	300µL	5dk	maleat yıkama tamponu 1	
2	350µL	10dk	Blocking tamponu	
2	300µL	5dk	maleat yıkama tamponu 2	
2	250µL	5dk	TNT 4	
2	200µL	5dk	TMN 1	
4	200µL	5dk	TNT 5	
4	300µL	10dk	TNB blocking tamponu 2	
2	350µL	30dk	antiDIG-POD (1:600)	
6	200µL	5dk	TNT 6	
1	250µL	30dk	tiramide-biotin	
6	250µL	5dk	maleat yıkama tamponu 3	
2	200µL	5dk	TMN 2	
3	200µL	13dk	BCIP/NBT	
4	400µL	5dk	H ₂ O 1	
1	300µL		NTE 3	

3.10. Gen Ekspresyon Örneklerinin Değerlendirilmesi

Slâyetler bir gece bekledikten sonra slâyet kaplama makinesinde yüzeyleri kaplandı ve daha sonra slâyetler temizlenerek kuruması için 37⁰C’de bir gece bekletildi. Bundan sonra slâyetler mikroskopta incelenip taranarak bilgisayar ortamına alındı. Bu işlem; ilk önce slâyetleri parçalar halinde tarama yapan cihazda taranması ve daha sonra mozaik oluşturma programı ile birleştirildi. Ekspresyon için doku üzerinde oluşan mavi noktalara; yani renk reaksiyonun sonucunda oluşan renge bakıldı, kullanılan reaktiflerden dolayı mavi renk oluştuğundan ona göre yorum yapıldı. Bilgisayar ortamına aktarılan çalışmalar detaylı şekillerde incelenerek çeşitli çalışmalarda kullanılır ve bununla beraber diğer bilim adamlarının kullanımına açılır (www.genepaint.org) (şekil 3.23.).



Şekil 3.22. (A) Slâyet kaplama makinesi, (B) Slâyetleri incelemede kullanılan mikroskop (C) Slâyetlerin taramasının yapıldığı scanner cihazı



Şekil 3.23. Genepaint.org sorgu ve sonuç sayfası (A) Bölümlerin hazırladığı kısım (B), Burada seçilen gen resmi programı kullanarak büyütülüp, küçültürük ilgilenilen kısmın incelenmesi sağlanır. (C-E). Yetişkin fare beyindeki bazı ekspresyon örnekleri görülmektedir. Biyolojik verilere, internet deki yerel sayfalardan ve bu web sayfasından ulaşılabilir (Discala 1999, Ringwald 2000).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Çalışılan Genler İçin Primer Dizaynı Sonuçları

Çalışmalarda incelenen Car1, Car2, Car3, Car4, Car5a, Car5b, Car6, Car7, Car8, Car9, Car10, Car11, Car12, Car13, Car14, Car15, Acaca, Acacb, Pcx, Mccc1, Mccc2, Pcca, Pccb, Ggcx ve Paics genleri için bölüm 3.4’de izlenen yollar takip edilerek spesifik primerler hazırlandı. Hepsinin primer uzunlukları 20 baz olacak şekilde işlem yapıldı. Çizelge 4.1’de bütün genler için hazırlanan spesifik primerler verilmiştir. Left (forward) primerin 5’ ucuna T7 promoter sekansı (**GCGTAATACGACTCACTATAGGG**); right (reverse) primerin 5’ ucuna SP6 promoter sekansı (**GCGATTTAGGTGACACTATAG**) eklenerek spesifik primerler hazırlanmış oldu.

Çizelge 4.1. Çalışılan genlere ait spesifik primerler ve cDNA problemlerine ait bilgiler

No	Locus ID	Accession No	Gen Sembolleri	Kromozomu	Left Primerleri	Right Primerleri	Left Başlangıç	Right Başlangıç	Prob Uzunluğu
1	12346	NM_009799	Car1	3 10.5 cM	ATCTTCTCTG AAGCTGAATC	ATCCCTTTATT GGATGCTGC	7	898	892
2	12349	NM_009801	Car2	3 10.5 cM	TGACCATGTC CCACCACTGG	AAATCACCCA GCCGTAAGT	24	891	868
3	12350	NM_007606	Car3	3 11.7 cM	AATTAAGACGA GGGCAAGG	TAGGCATGCA AAGATTAAAG	529	1505	977
4	12351	NM_007607	Car4	11 C	ATCAACATTG TCACTGCTAG	ATCCACATGT CCCTGTCACC	201	1138	938
5	12352	NM_007608	Car5a	8 67.0 cM	AAGGGCATA AGTGGGCCAC	AGCGGGCGGT AGTTGTTTAC	68	941	874
6	56078	NM_019513	Car5b	X F5	TAGGTTCCCG AGCTGCTTAG	ATAGTCATGG CGGAAGGATG	102	1070	969
7	12353	NM_009802	Car6	4 E2	ATGGGTCTTC CACCTAGAAG	TTCAGGAAAT TGGCTTCCAC	97	952	856
8	12354	NM_053070	Car7	8 D1	AAATTGGCAC AAGCTGTATC	AGCTGAAGGA GGGCCGTAGC	128	998	871

Çizelge 4.1.(devamı)

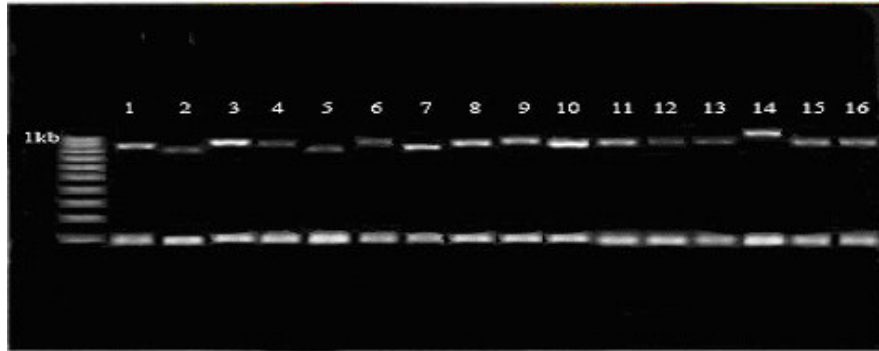
No	Locus ID	Accession No	Gen Sembolleri	Kromozomu	Left Primerleri	Right Primerleri	Left Başlangıç	Right Başlangıç	Prob Uzunluğu
9	12319	NM_007592	Car8	4 7.7 cM	TGTCTCCAAAT TATGTGGTG	TAGGTCGGAAAT TGTCTCCC	247	1121	875
10	230099	NM_139305	Car9	4 B1	AGGAGTCCCT TGGGTTAGAG	AGAGAAGGCCAA ACACCAAG	312	1247	936
11	72605	NM_028296	Car10	11 C	TGGCTCCTCA AGTAGGGAAC	TGGATCGATTCTG ATCTCGG	1865	2707	843
12	12348	NM_009800	Car11	7 B2	TGGTTGAGAG CGAAGAAGGG	TGATAGTGTCCCG GTTGAGG	31	929	899
13	76459	NM_178396	Car12	9 C	TCCAGAAGTT CGATGAGAGG	AAGTTGAGTGAG GCTTGGTC	940	1808	869
14	71934	NM_024495	Car13	3 A2	AGCACAACGG TCCCATTAC	TGTCAGGAAGGC TGAAGCAG	65	1079	1015
15	23831	NM_011797	Car14	3 F2.1	ATTCCTGGTCC CTTGTACCC	ATGGTCCTCTGGT TGAGAGG	231	1086	856
16	80733	NM_030558	Car15	16 A3	AGGTGGACTC CAGTGGTACC	ATACTATTGTAGA ATCATTG	132	1080	949

Çizelge 4.1.(devamı)

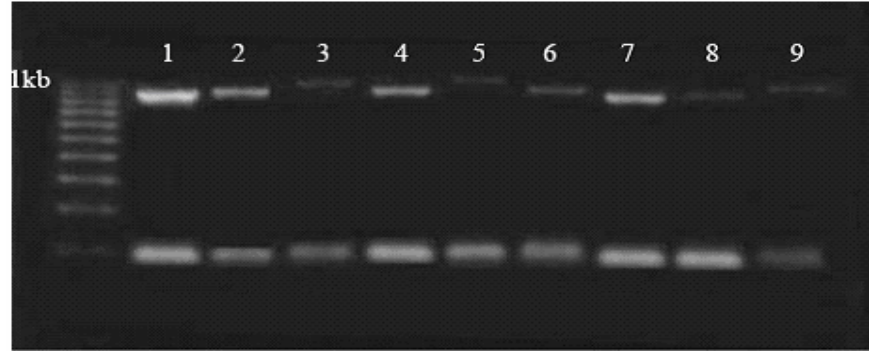
No	Locus ID	Accession No	Gen Sembolleri	Kromozomu	Left Primerleri	Right Primerleri	Left Başlangıç	Right Başlangıç	Prob Uzunluğu
17	107476	NM_133360	Acaca	11 C	TTGTTTGGTCG TGACTGCTC	TGCCGGGTCAC CTTAAGTAC	1114	2060	947
18	107476	NM_133904	Acacb	5 F	TGCTTCTCTTT CTGACTTGC	ACTGATCGGCC ATCTTGATG	8	919	912
19	18563	NM_008797	Pcx	19 0.0 cM	TCCGGCGTCT GGAGTATAAG	TGCTTGTCCACC AGGAACTC	186	1050	865
20	110821	NM_144844	Pcca	14 64.0 cM	AAGGAGACAT CAGCACTAAG	TGACACTAGGA AATCTCAGC	1511	2450	940
21	66904	NM_025835	Pccb	9 E4	AAGCGAGGGA AGCTAACAGC	TGAATGCGTCA CAGAATCTG	203	1178	976
22	72039	NM_023644	Mccc1	3 B	TTGGAATCCA GCAGAACAGC	ATGTCGCCTCTG CACACTAC	60	919	860
23	78038	XM_127493	Mccc2	13 D1	TGGGACTCAG TAGGGTCCTG	ACCTCCTGCCGT ACAGGAGC	145	1017	873
24	56316	NM_019802	Ggcx	6 C3	AGAACGGAAG TGAAACAGGG	TGTCCCGTGCCT TTAATTTTC	1951	2856	906
25	67054	NM_025939	Paics	5 E1	AGGACTTGGT CCGCTCCAAC	AGTCTGCCCTAT AACAAGGC	85	889	805

4.2. Spesifik Genler İçin Hazırlanan cDNA Problarının Ve Spesifik Antisens mRNA'larının Agaroz Elektroforez Sonuçları

Çalışılan genlere ait cDNA problemlerinin jelde yürütülmesi sonucunda elde edilen jel fotoğrafı verilmiştir (Şekil 4.1-4.2).



Şekil 4.1. Spesifik CA genleri için yapılan cDNA problemlerine ait agaroz elektroforezi sonucu (1: Car1, 2: Car2, 3: Car3, 4: Car4, 5: Car5a, 6: Car5b, 7: Car6, 8: Car7, 9: Car8, 10: Car9, 11: Car10, 12: Car11, 13: Car12, 14: Car13, 15: Car14 : Car15).

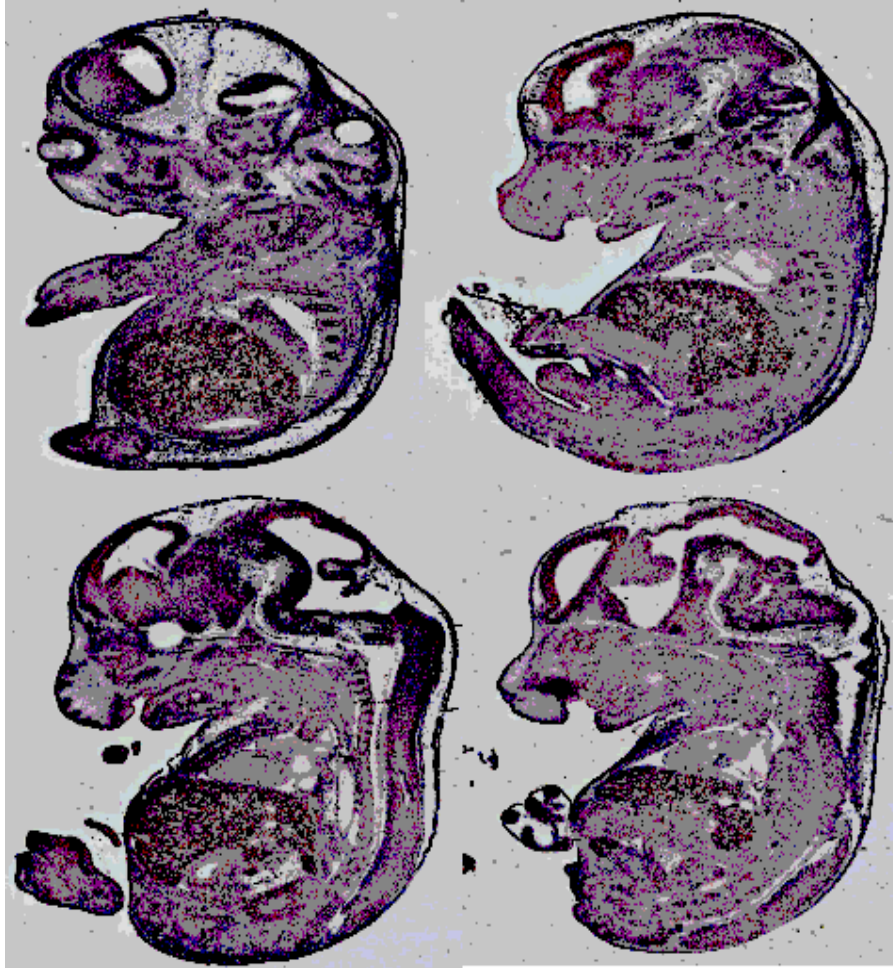


Şekil 4.2. Spesifik karboksilaz genleri için yapılan cDNA problemlerine ait agaroz elektroforezi sonucu (1: Mcc1, 2: Mccc2, 3: Acaca, 4: Acacb, 5: Ggcx, 6: Pcx, 7: Paics, 8:Pcca , 9: Pccb).

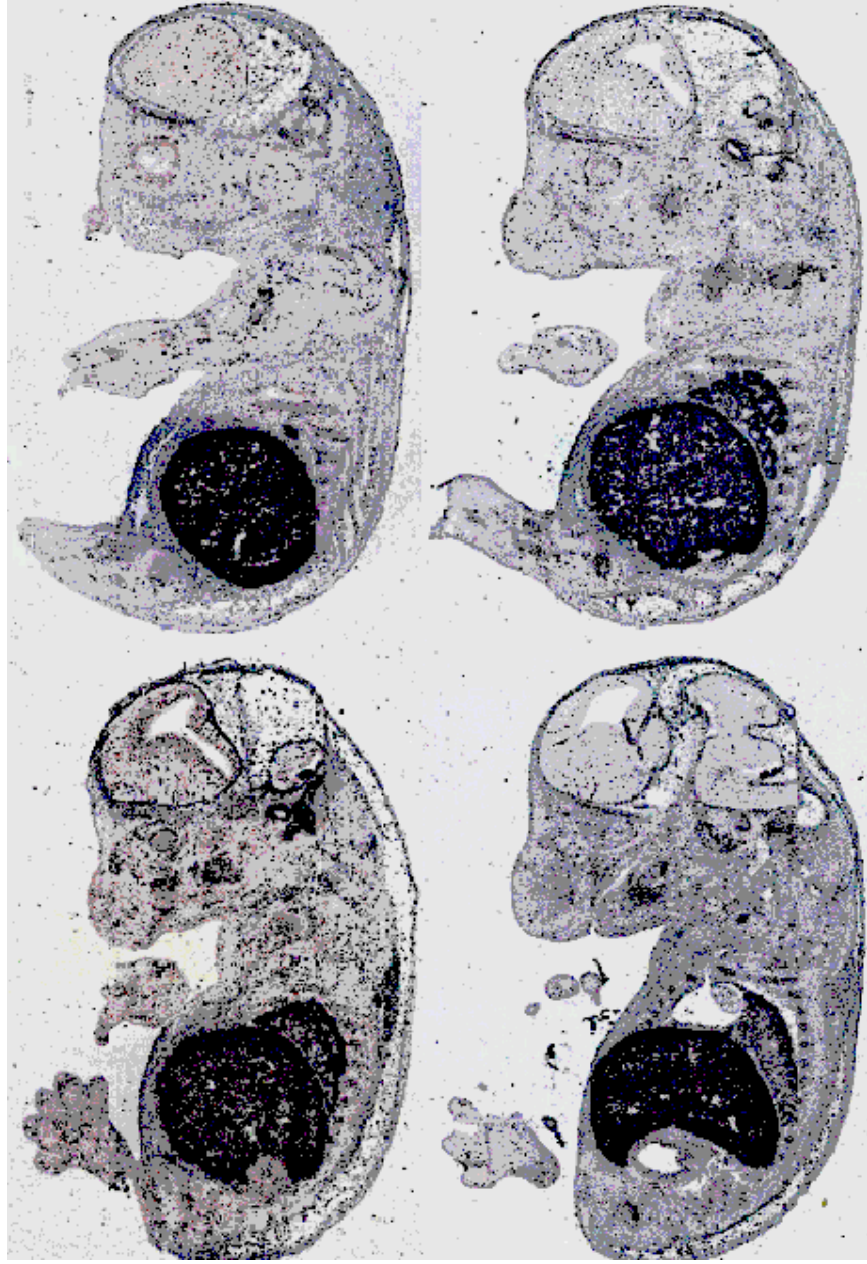
Primer dizaynından sonra spesifik cDNA probları yapılarak bunlardan spesifik antisens mRNA'ları üretildi. Bütün antisens mRNA problarında SP6 polimerazı kullanıldı. Çünkü bütün üretilen cDNA kalıplarında reverse primerin 5' ucunda SP6 olduğundan ve yapılan bütün işlemlerde antisens mRNA hazırlandığından SP6 polimerazı kullanıldı.

4.3. *In Situ* Hibridizasyon Sonuçları

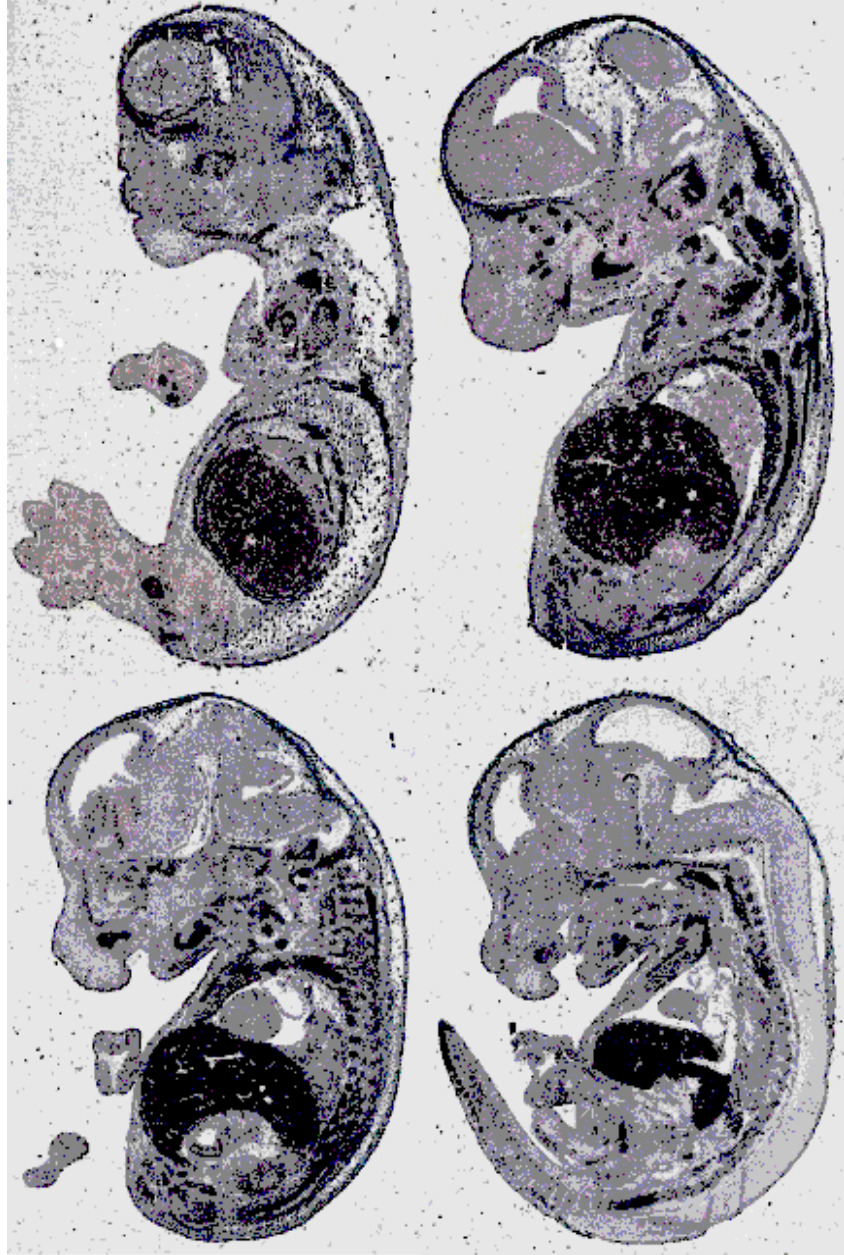
Aşağıda çalışılan enzimlere ait 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde yapılan *in situ* hibridizasyon sonuçları verilmiştir (Şekil 4.3-4.27).



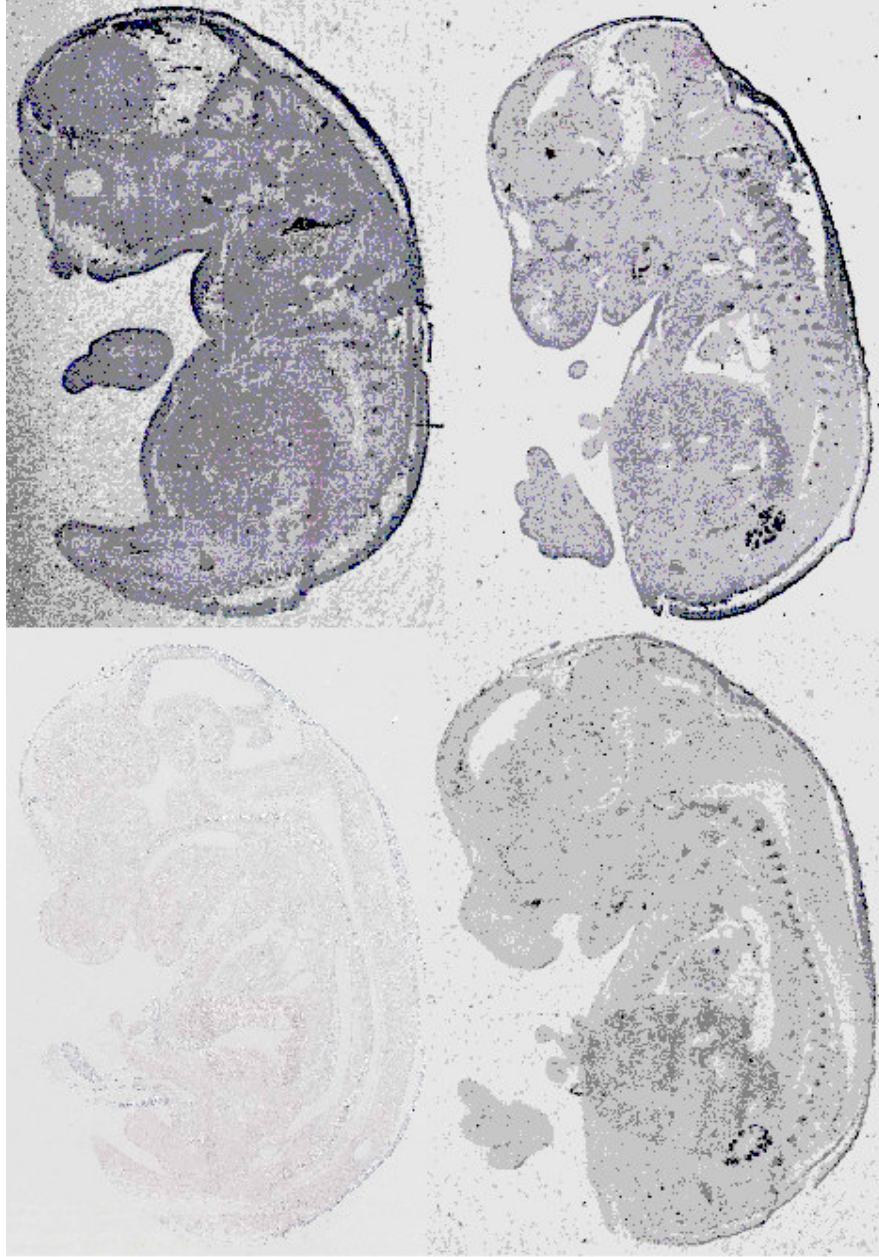
Şekil 4.3. Car1 geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



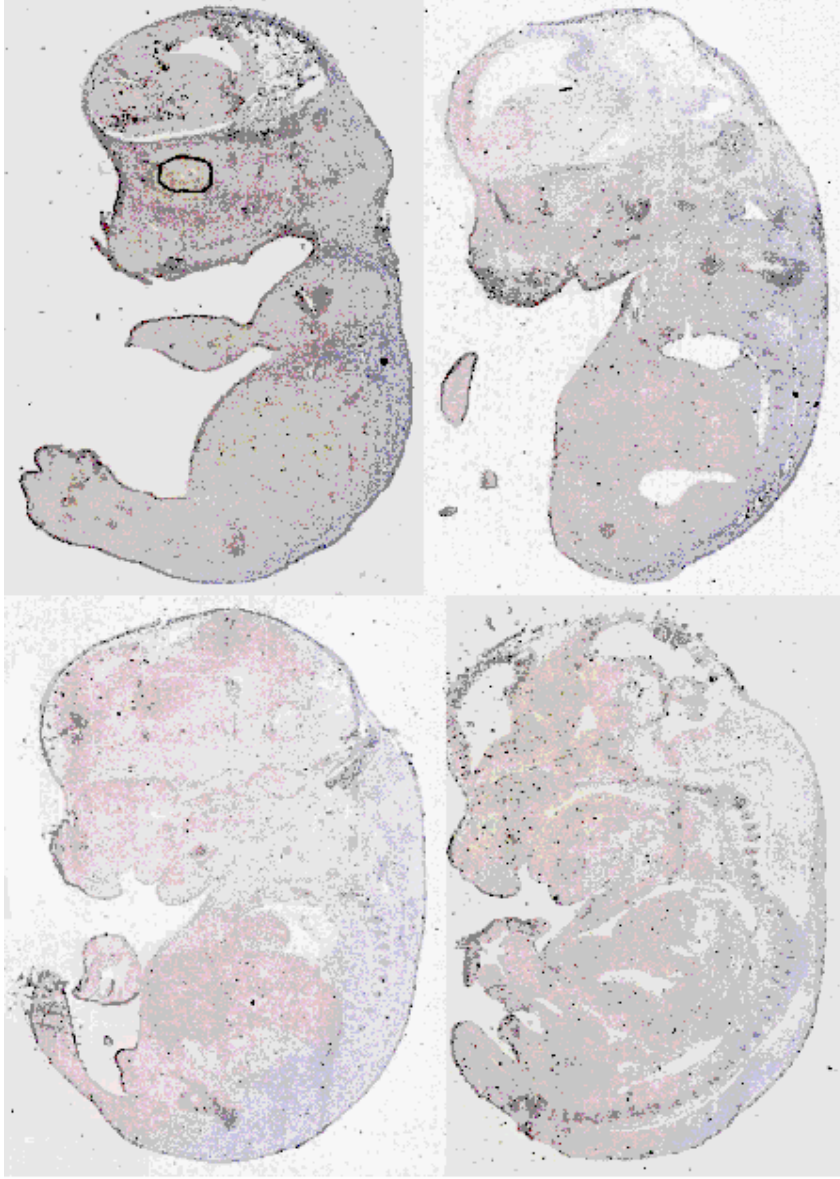
Şekil 4.4. Car2 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



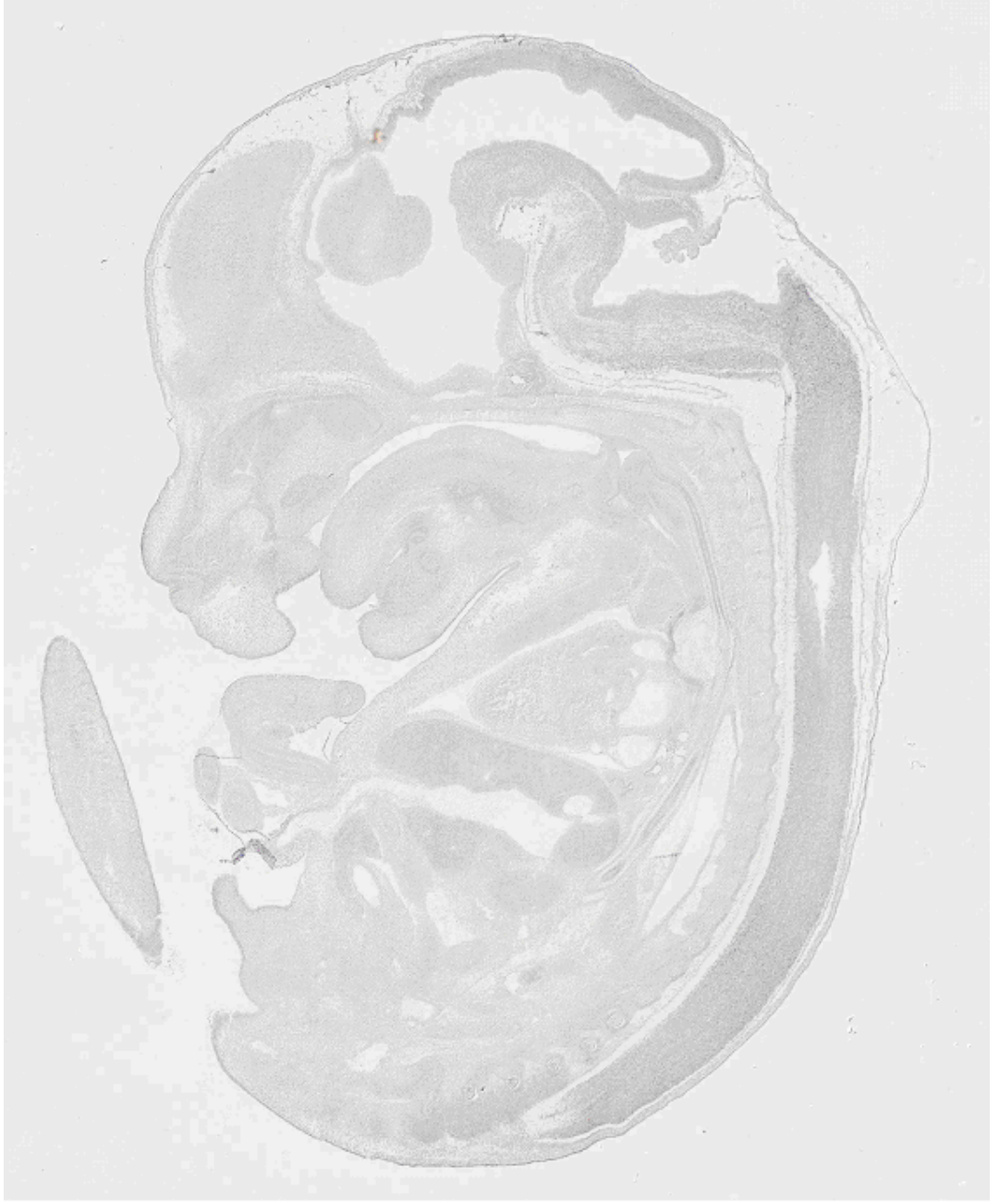
Şekil 4.5. Car3 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



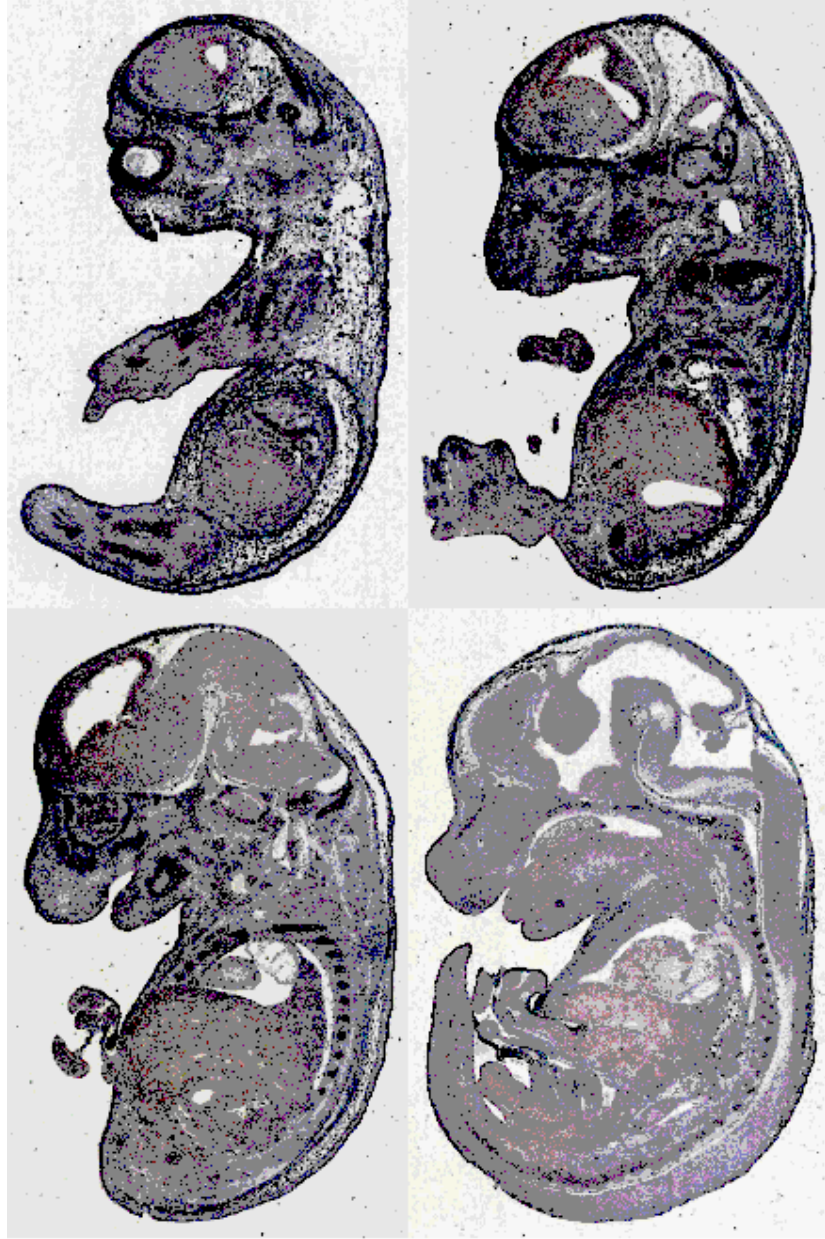
Şekil 4.6. Car4 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



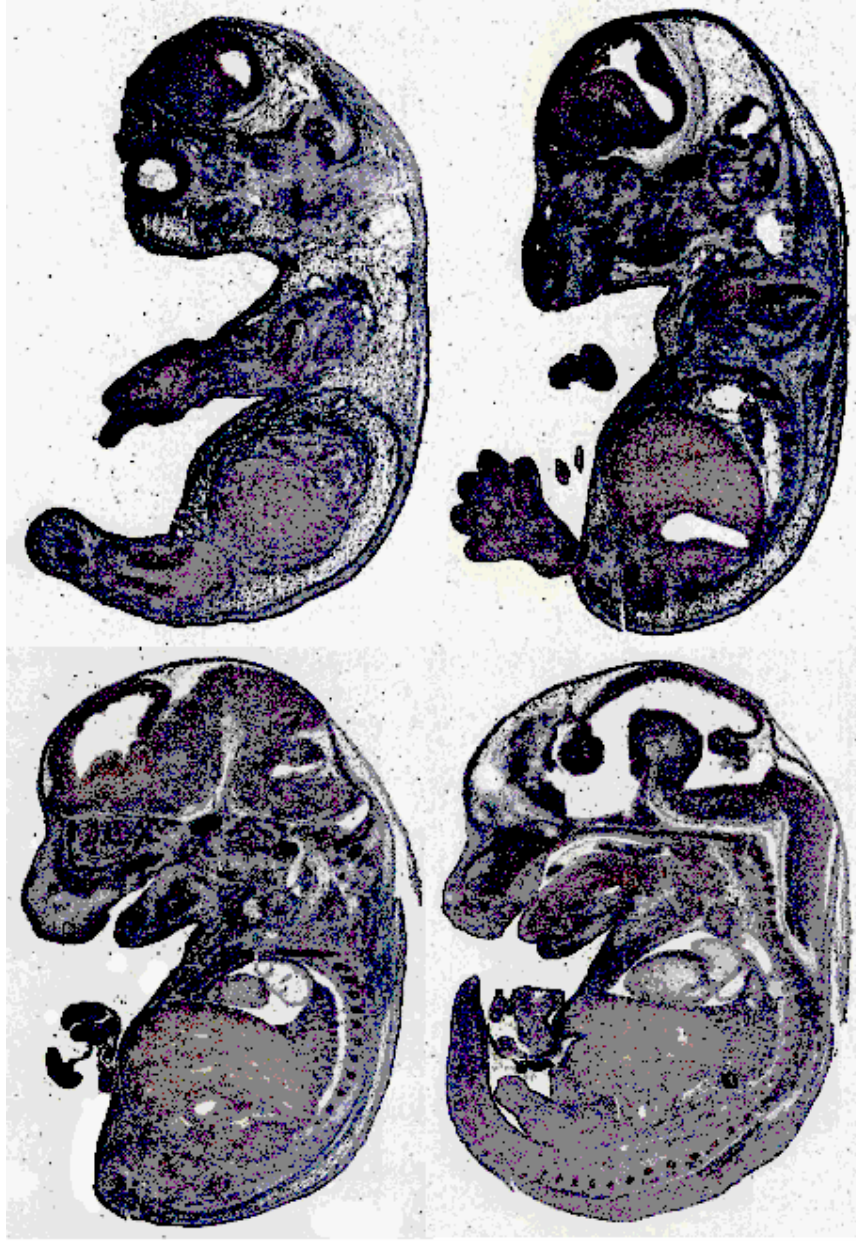
Şekil 4.7. Car5a geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



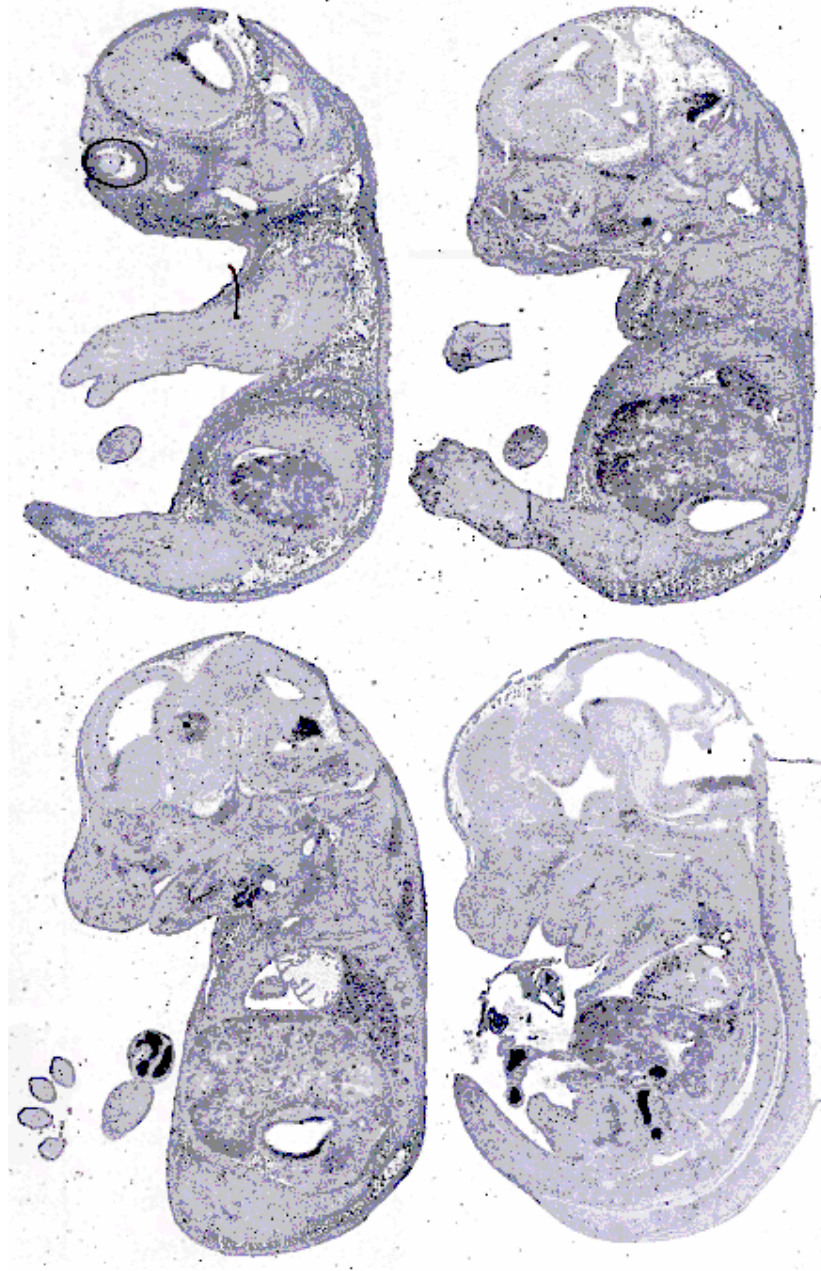
Şekil 4.8. Car5b geninin *in situ* hibridizasyon sonucu.



Şekil 4.9. Car6 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



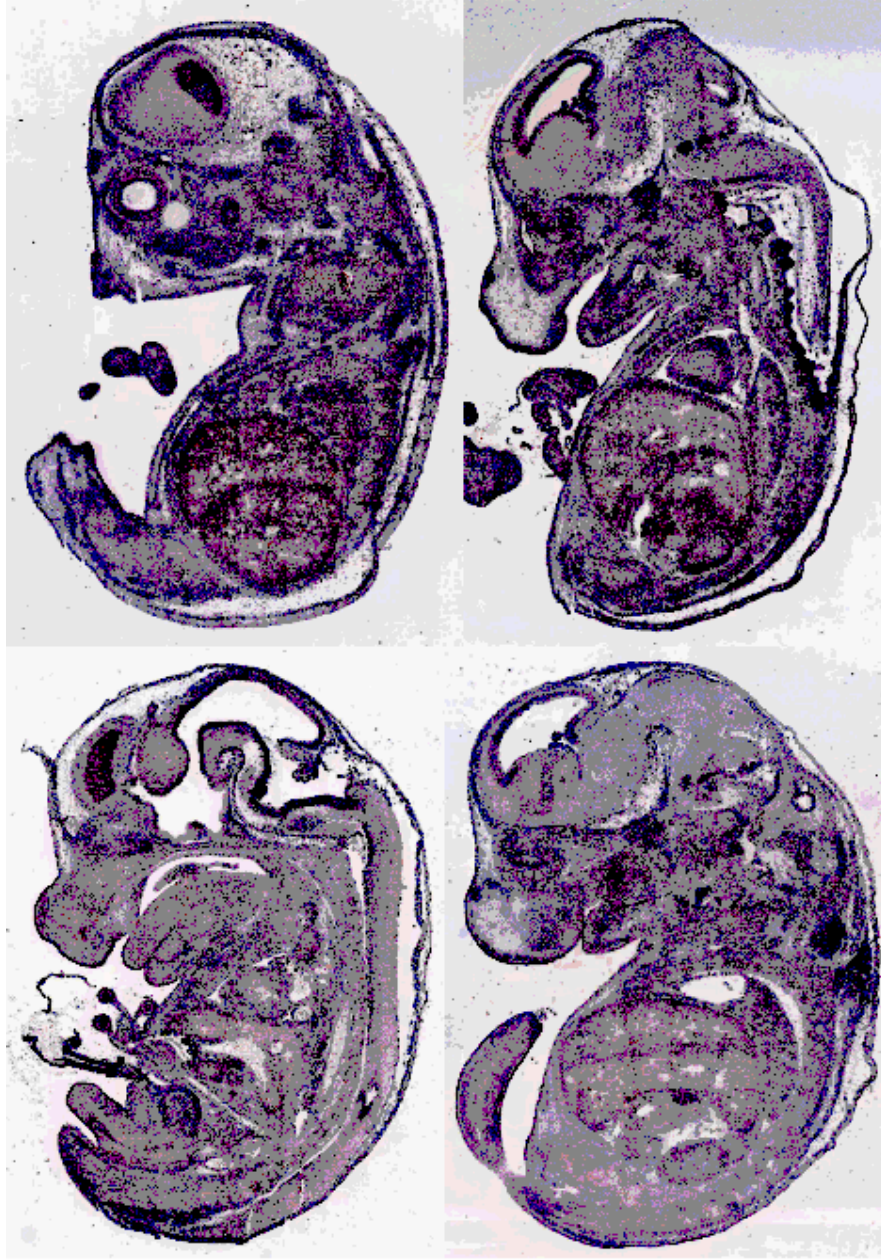
Şekil 4.10. Car7 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



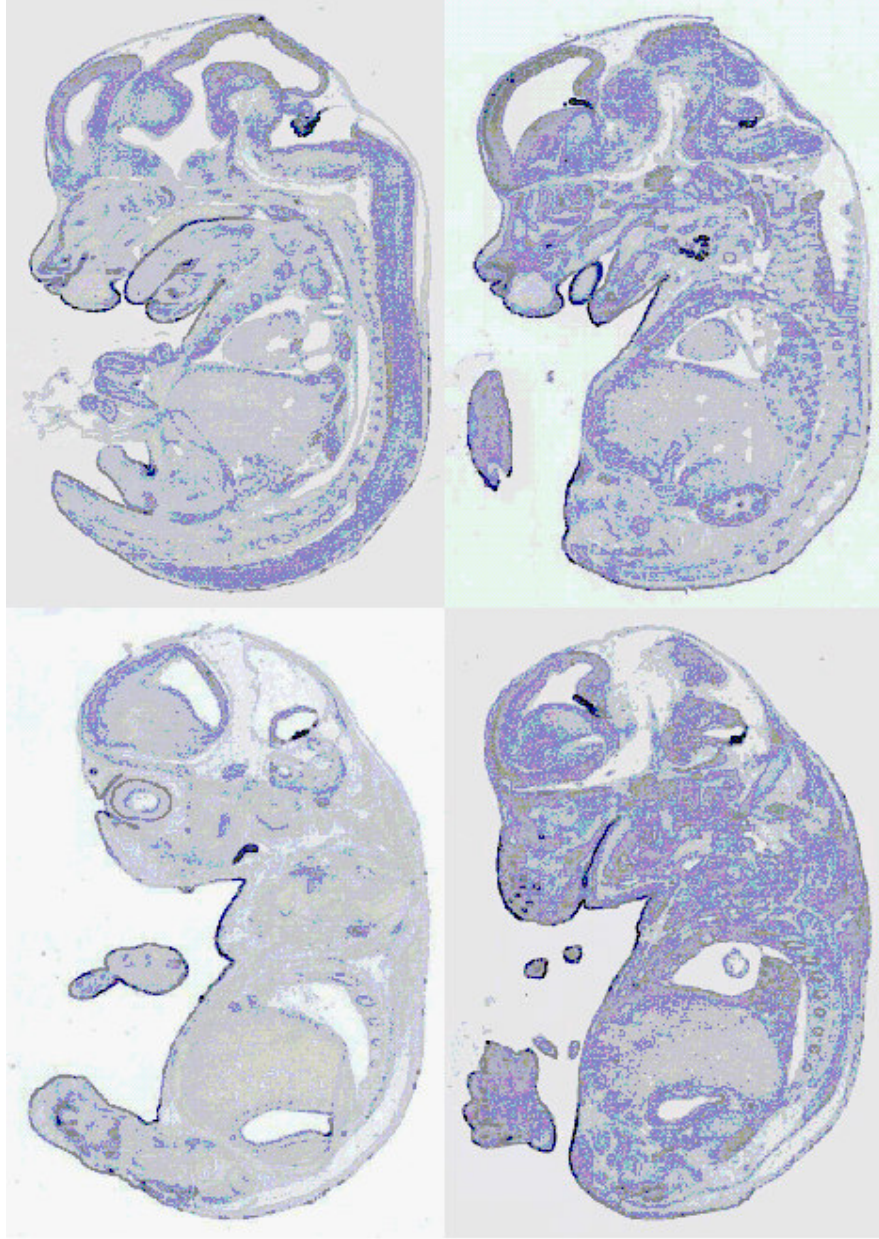
Şekil 4.11. Car8 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



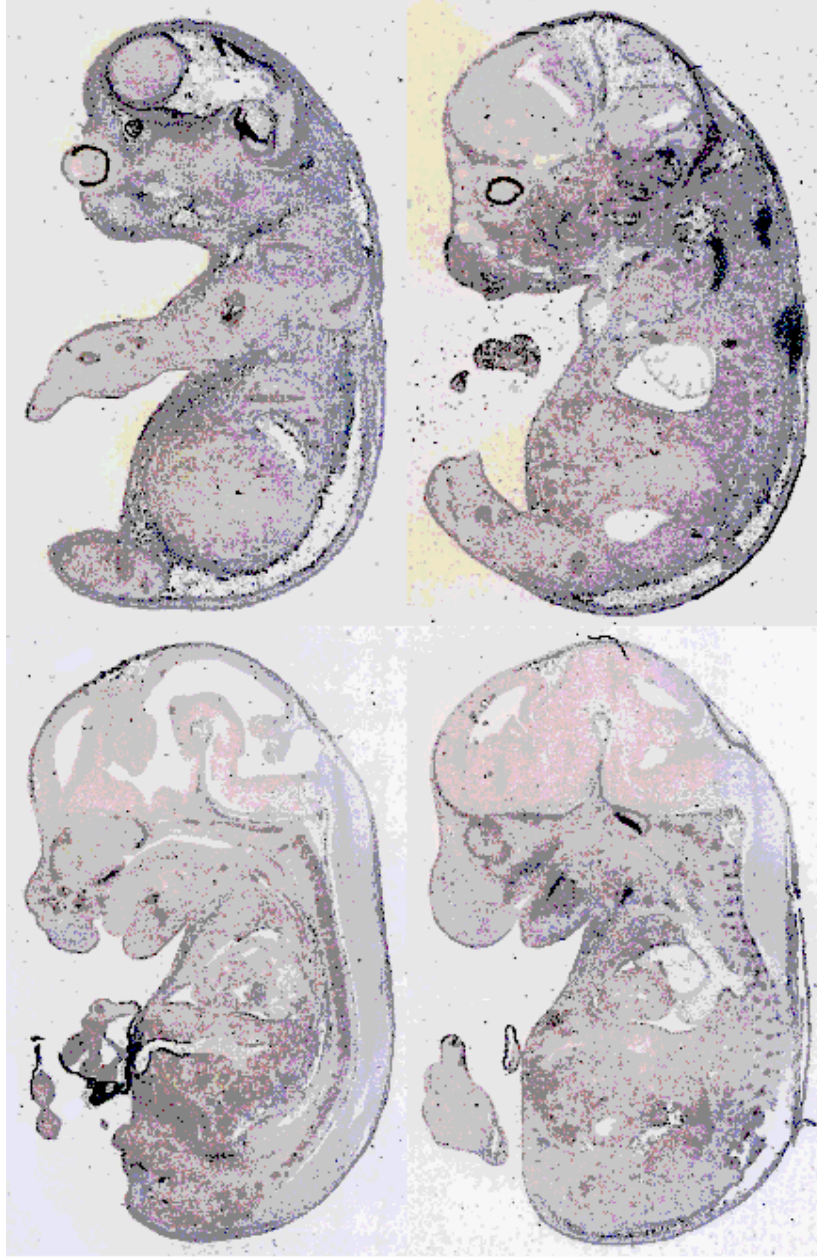
Şekil 4.12. Car10 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



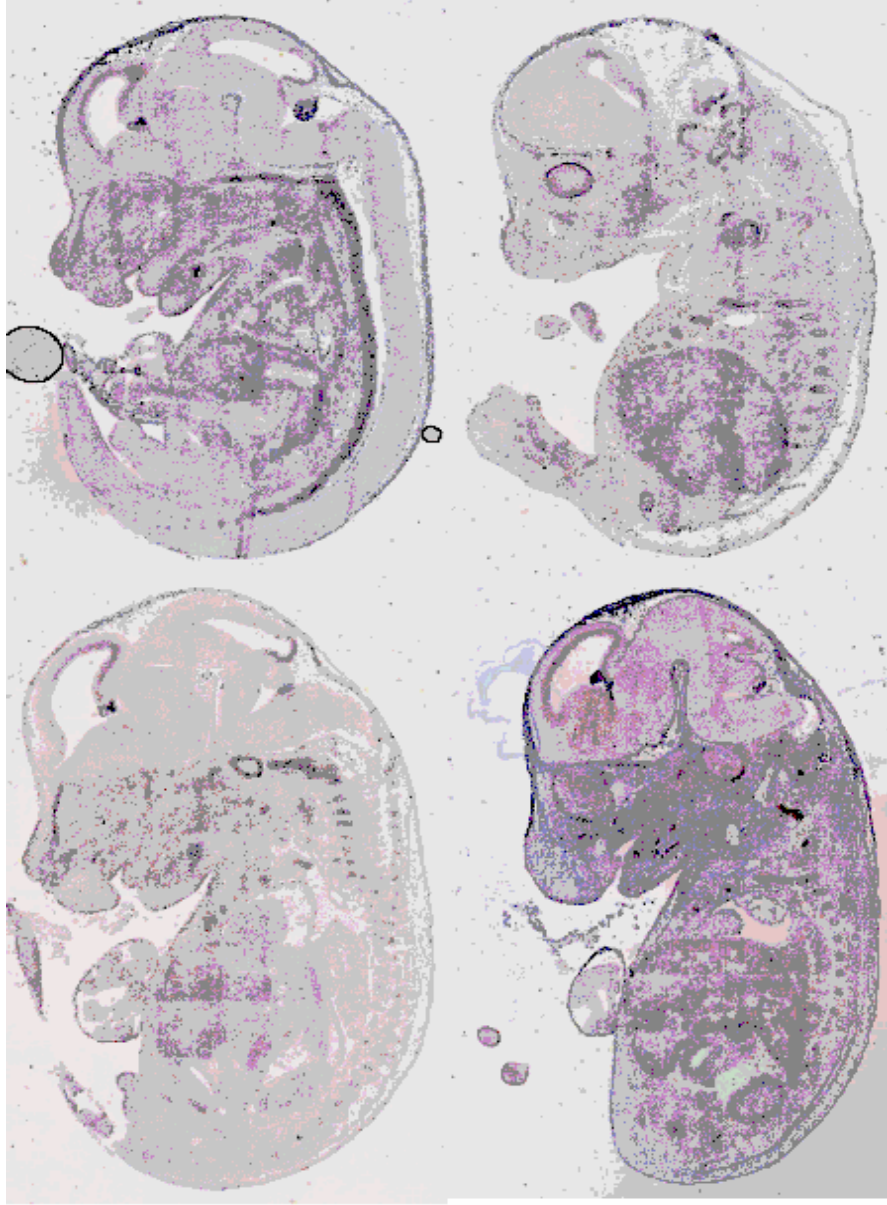
Şekil 4.13. Car11 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



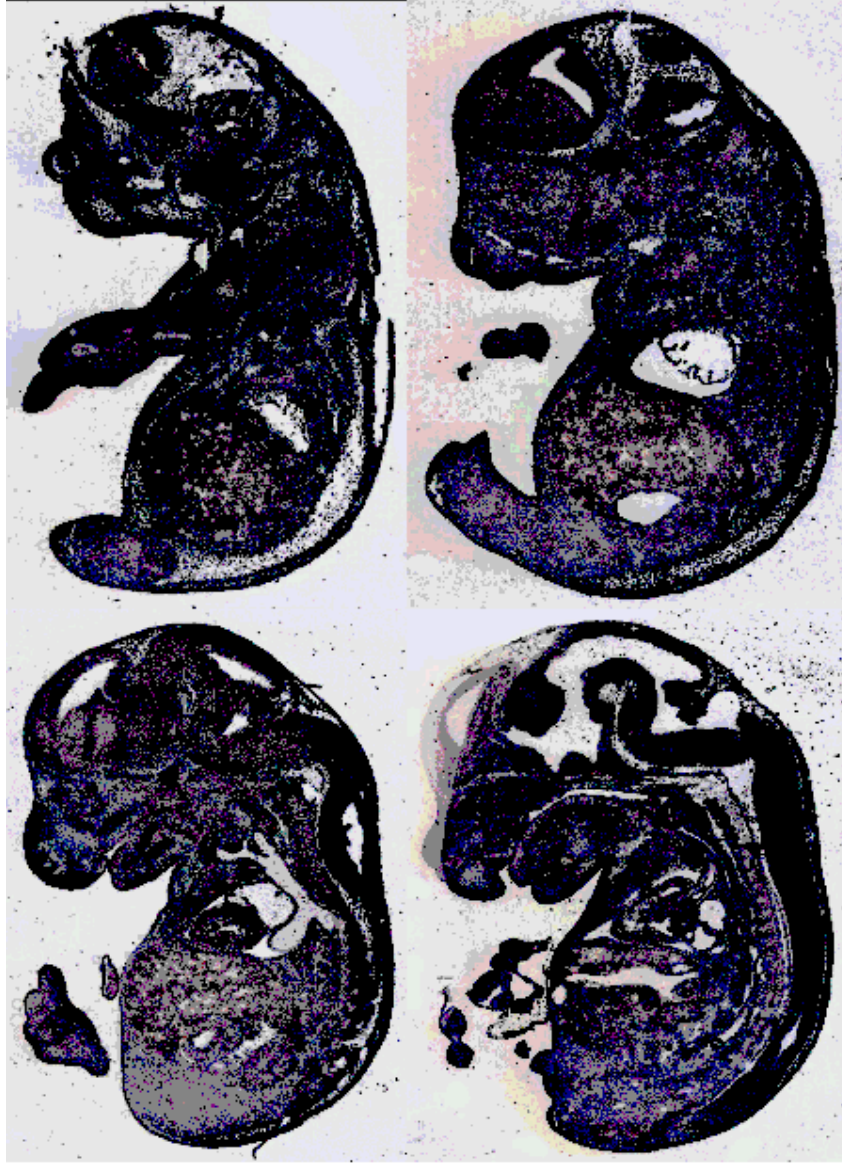
Şekil 4.14. Car12 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



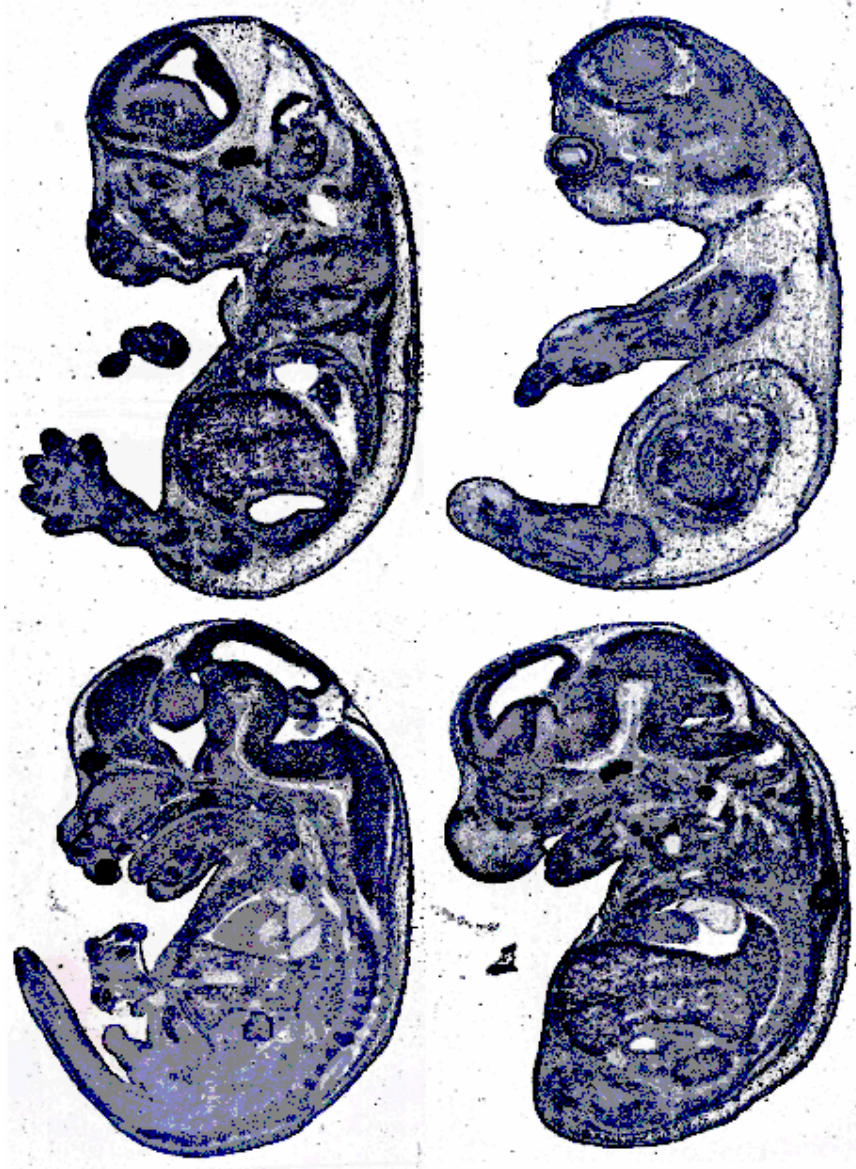
Şekil 4.15. Car13 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



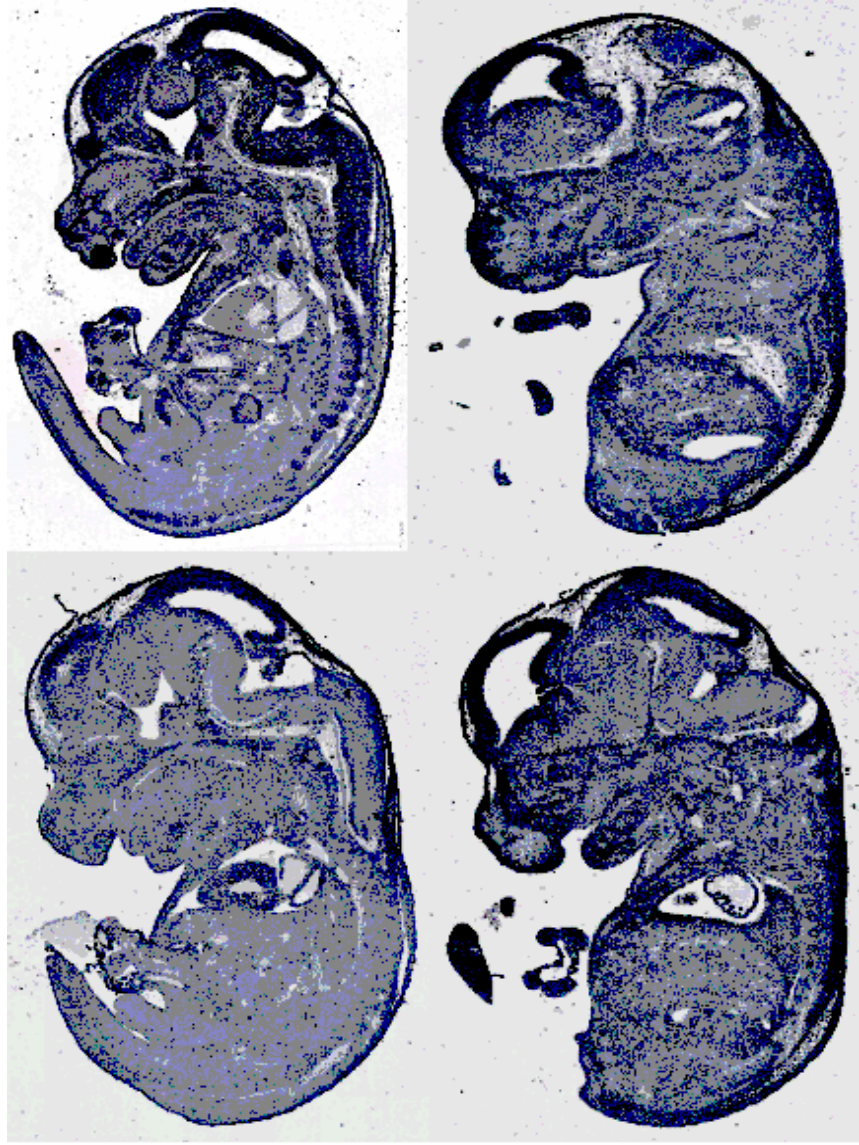
Şekil 4.16. Car14 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



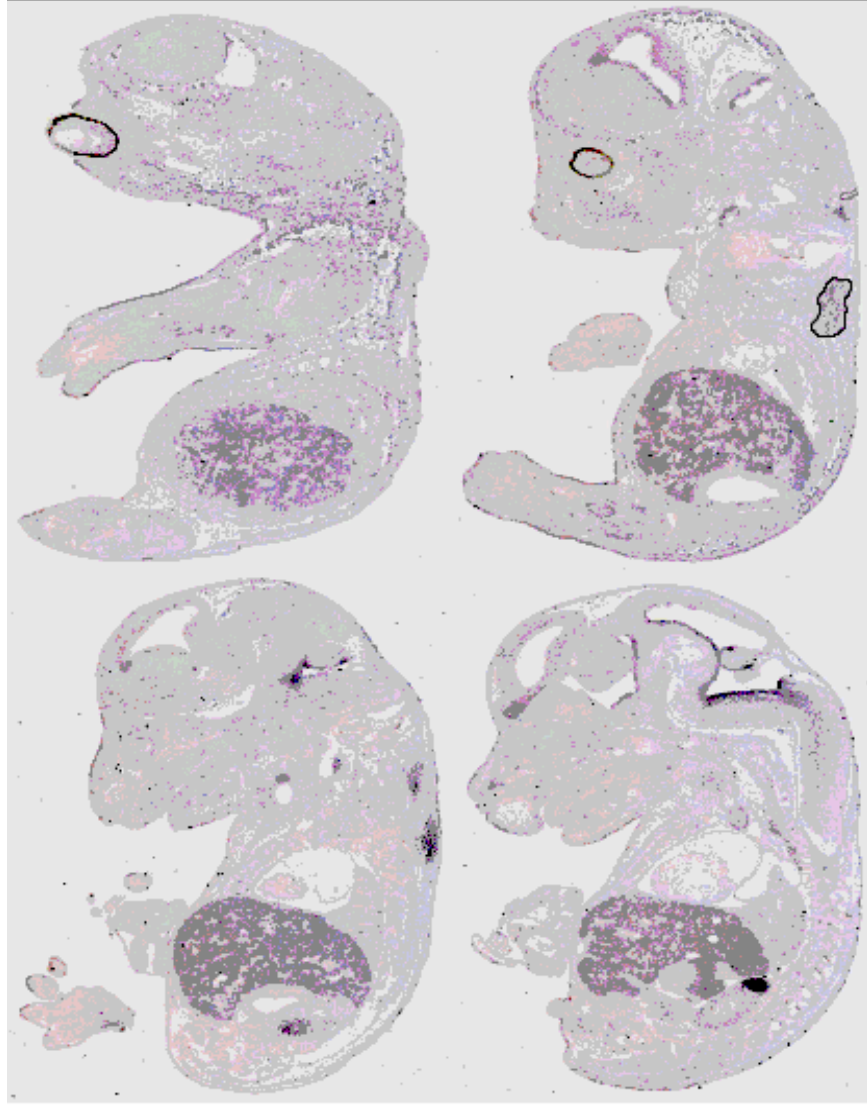
Şekil 4.17. Car15 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



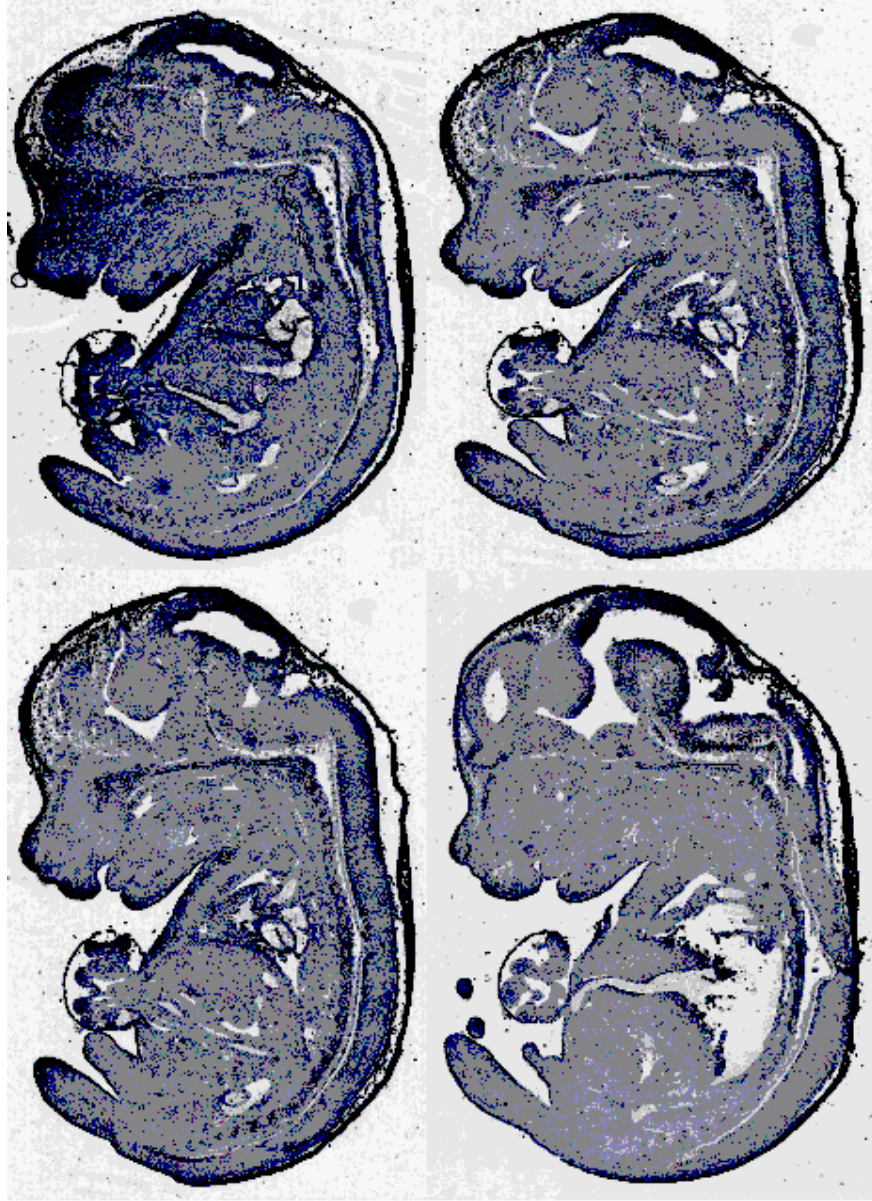
Şekil 4.18. Acaca geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



Şekil 4.19. Acab geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



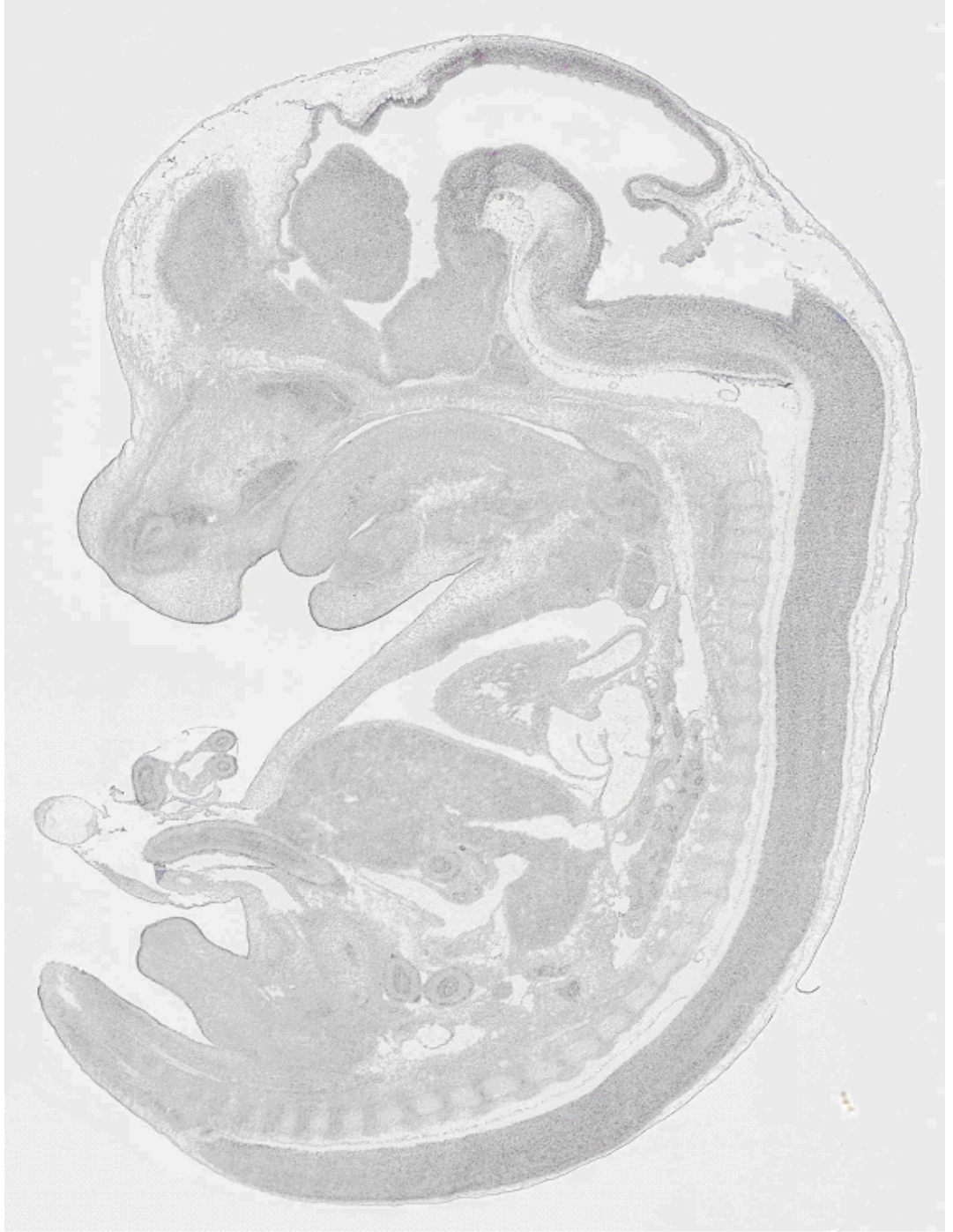
Şekil 4.20. Pcx geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



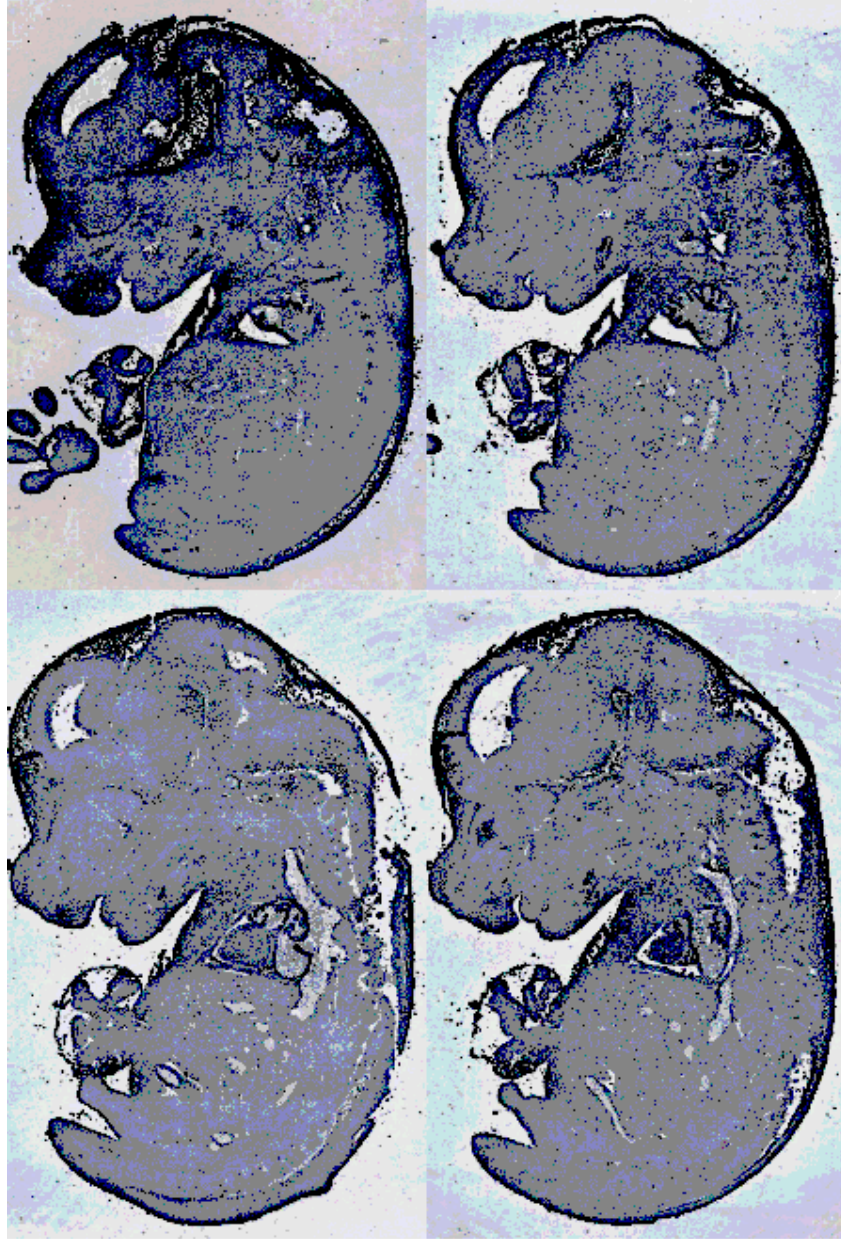
Şekil 4.21. Mccc1 geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



Şekil 4.22. Pcca geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



Şekil 4.23. Pccb geninin *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuç.



Şekil 4.24. Ggcx geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



Şekil 4.25. Paics geninin farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.

Çizelge 4.2. 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde yapılan karbonik anhidraz izoenzim ve karboksilaz enzim genlerinin *in situ* hibridizasyonu ile gen ekspresyon analizi toplu sonuçları.

Gen sembolü	Ekspresyon olduğu yerler
Car1	Akciğer, lens, cranial bezi, korteks, retina, pons, spinal cord ve talamusta
Car2	Karaciğer, akciğer, kulak ve kan damarlarında
Car3	Kaslar, karaciğer ve kıkırdaklarda
Car4	Böbrekler
Car5a	Preform kortekste
Car5b	Ekspresyon yok
Car6	Ekspresyon yok
Car7	Hemen hemen her yerde düşük seviyede ekspresyon
Car8	Akciğer, mide, talamus, medulla, tükrük bezi ve bağırsaklar
Car9	Sonuç alınamadı
Car10	Hemen hemen her yerde düşük düzeyde ekspresyon
Car11	Talamus, pankreas, medulla, tükrük bezi, striatum, spinal kort, böbrek, kalp, kaslar, adrenal bezi, koroid pleksus
Car12	Dil, cilt, koroid pleksus ve tükrük bezinde
Car13	Cilt kaslar ve bazı diğer organlarda çok zayıf ekspresyonu
Car14	Koroid pleksusta
Car15	Hemen hemen her yerde düşük düzeyde ekspresyonu
Acaca	Periferik sinir sistemi, merkezi sinir sistemi, karaciğer, kol ve bacaklar, yüz kıkırdağı, akciğer, tükrük bezi, böbrek, mide, timus ve pankreasta
Acacb	Zayıf olarak bütün embriyo dokularında ekspresyon
Pcx	Karaciğer, pons, sırt kası, böbrek, olfaktori soğancığı, medulla, pankreas, adrenal bezi
Mccc1	Ekspresyon yok
Mccc2	Sonuç alınamadı
Pcca	Retina, karaciğer, cilt, akciğer, whiskers, kaslar, böbrek, pankreas, tükrük bezi, timus ve spinal kort, merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi
Pccb	Ekspresyon yok
Ggex	Ekspresyon yok
Paics	Cilt, karaciğer, subventrikal bölge, akciğer, whiskers, kol ve bacaklar, mide, böbrek, pankreas, kaslar, beyin sistemi, periferik sinir sistemi, timus ve merkezi sinir sistemi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gen ekspresyonunu belirleyecek klasik yöntemler hala önemlerini taşımaktadırlar. Bu yöntemler, bir spesifik genin ekspresyonunu belirleyecek biyokimyasal veya fenotipik değişiklikleri ortaya çıkarır. Teknolojik ilerlemeler, spesifik bir genin ürününü veya protein molekülünü incelememizi mümkün kılmaktadır.

DNA teknolojisinin gelişmesiyle; herhangi bir genin transkripsiyonel ürününü analiz etmek ve belirlemek mümkünleşmiştir. Spesifik RNA moleküllerini incelemek için; *in situ* hibridizasyon, Northern blotting tekniği, gen arrayleri, Dot veya Slot-blotting tekniği, S-1 Nükleaz incelemesi, RNA'az protection incelemesi ve PCR gibi yöntemler kullanılabilir.

Uygulanan *in situ* hibridizasyon tekniği oldukça hassas ve güvenilir bir tekniktir. Bir hücrede 3 tane mRNA olsa bile doğru sonuç alınabilir. Bu teknikte mRNA moleküllerinin tanınma prensibi, digoksisinin işaretli ribo örnekleri ve immünohistokimyasal renk reaksiyonlarına dayanmaktadır. *In situ* hibridizasyon tekniğinde aynı anda 12 numune çalışılabilir, ayrıca her bir numuneden 24-32 arasında sonuç alınabilir. Diğer bazı metotlarda digoksisinin yerine radyoaktif işaretli probalar kullanılır, bu probalar otomasyon için uygun değildir ve radyoaktif atık sorunu vardır, bu da ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Hibridizasyon çalışmalarının, uzun süreli ve özellikle karanlık ortamda yapılma gerekliliği, çalışılacak örneklerin basamak basamak 40 çözeltiye daldırılması ve yaklaşık olarak 22 saat sürmesi gibi zorlukları vardır. Otomatik olarak *in situ* hibridizasyon tekniği bu üstünlükleriyle oldukça kullanışlı bir tekniktir.

Primer dizaynı yapılırken, ilgili genin sekansının, diğer genlerle en az homolojisinin olduğu bölgeler tespit edildi ve bu bölgeler seçildi. Böylece dizayn edilen primerlerin başka cDNA'lara bağlanma ihtimali en aza indirgenmiş oldu. Dizayn edilen forward primerlerin 5' ucuna T7 promoter sekansı ve revers primerlerin 5' ucuna da SP6

promoter sekansları eklendi. Böylece cDNA problemlerinin bu promoter bölgelerine SP6 RNA polimeraz enzimi bağlanarak klonlama işlemine gerek kalmadan antisens mRNA üretildi. Üretilen antisens mRNA'lar, embriyo üzerindeki sens mRNA'lar ile hibridize edildi ve otomatik robot kullanılarak gen ekspresyon örnekleri çıkarıldı.

CA I

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-I geninin Şekil 4.3'de görüldüğü gibi akciğer, lens, cranial bezi, korteks, retina, pons, spinal cord ve talamusta ekspresyonu gözlemlenmiştir.

CA-I izoenzimi insanda kolon, kaslar, tükrük bezleri ve eritrositlerde eksprese olmuştur (Noda *et al.* 1986, Bekku *et al.* 1998, Puscas *et al.* 2001, Maffa and Cozzolino 2004). Farede kolon, kalınbağırsak, dalak, kemik iliği, diz, uyluk, arka beyin, kalvaryaya, mesane ve çene kemiğinde yüksek ekspresyon; aort, kahverengi yağ dokusu, beyin ve dişlerde az ekspresyon; testis, 9,5 günlük embriyo, 12,5 günlük embriyo, böbreküstü bezi, embriyo, tükrük, mide ve trakede çok az ekspresyon gözlenmiştir (<http://mgpd.med.utoronto.ca/>).

CA II

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-II geninin Şekil 4.4'de görüldüğü gibi karaciğer, akciğer, kulak ve kan damarlarında ekspresyonu gözlemlenmiştir.

CA-II izoenzimi insanda böbrek, kırmızı kan hücreleri, renal tübül, beyin, toplama kanalı, urina, plazma, leydig hücreleri, karaciğer, pankreas, tükrük bezleri, testisler, monosit, pankreas kanal epitelyumu, safra kesesi, paryetal hücre, meni kanalı, epididimis ve nazal mukozada eksprese olmuştur (Murakami *et al.* 1987; Jones and Shaw 1983; McMahon *et al.* 2001; Sato *et al.* 1990; Backman *et al.* 1990; Karhumaa *et*

al. 2000; Mezquita *et al.* 1999; Higuchi *et al.* 1999; Kolar *et al.* 1997; Juvenon *et al.* 1994; Puscas *et al.* 1997; Kaunisto *et al.* 1990; Tarun *et al.* 2003). CA-II birçok sindirim sistemi organında bol miktarda eksprese olmuştur (Lönnerholm *et al.* 1985; Parkkila and Parkkila 1996). Paratoid ve Mandibula altı bezleri seröz acinar hücrelerinde bulunur ve bikarbonat iyonlarını saliva içerisine serbest bıraktığı düşünülür (Parkkila *et al.* 1990, 1991; Parkkila *et al.* 1994).

Mide'de mide öz suyunun asiditesini düzenlediği gastrik mukozanın çepere ait ve yüzey epitel hücrelerinde eksprese olmuştur (Davenport and Fisher 1938; Davenport 1939; O'Brien *et al.* 1977; Parkkila *et al.* 1994; Parkkila and Parkkila 1996). İmmünohistokimyasal teknikler boşbağısak ve kıvrımlı bağırsak yüzey epitel hücrelerinin CA-II ihtiva ettiğini göstermiştir (Lönnerholm *et al.* 1985; Sasaki *et al.* 1993). Ayrıca safra konsantrasyonunda asidifikasyonunda görev aldığı safra kesesinin epitel hücrelerinde de eksprese olmuştur (Juvonen *et al.* 1994; Parkkila and Parkkila 1996). Farede amigdalada yüksek ekspresyon; bağırsak, ekstraembriyonik doku, mide, dalak, böbrek, beyin sapı, meme bezinde düşük ekspresyon gözlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

CA III

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-III geninin Şekil 4.5'de görüldüğü gibi kaslar, karaciğer ve kıkırdaklarda ekspresyonu gözlemlenmiştir.

CA-III izoenziminin insanda iskelet kası, çizgisiz kaslar, kalp kası, akciğer, plazma, uterus, meme bezi, prostat, tükrük bezleri, serum, embryo, koroid pleksus, renal medulla, oligodentrosit, retina ve adipositlerde ekspresyonu gözlenmiştir (Carter *et al.* 1979; Jeffery *et al.* 1980; Wahlstrand and Wistrand 1980; Heath *et al.* 1983; Vaanen *et al.* 1987; Nakagawa *et al.* 1987; Nork *et al.* 1990; Shamsutdinov *et al.* 1991; Vuori *et al.* 1991; Oguni *et al.* 1992; Nogradi *et al.* 1993; Kim *et al.* 2000).

Farede kahverengi yağ dokusu, iskelet kası ve deride yüksek ekspresyon, karaciğer, böbreküstü bezi, aort, trake, yumurtalık, tiroit, prostat, epididymus, lenf boğumu, tükürük ve uterus orta seviyede ekspresyon; meme bezleri, diz, uyluk, kalın barsak, burun, parmak, mide, böbrek, trigeminus, kolon, göz ve timusta düşük ekspresyon gözlenmiştir (<http://mgpd.med.utoronto.ca/>). Yine yapılmış çalışmalarda farede karaciğer başta olmak üzere vasküler ve kaslarda yüksek ekspresyon; meme bezi, mesane, kulak ve solunum sisteminde düşük ekspresyon gözlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

CA IV

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-IV geninin Şekil 4.6'da görüldüğü gibi böbreklerde ekspresyonu gözlemlenmiştir.

CA-IV izoenziminin insanda akciğer, böbrek, karaciğer, beyin, göz, iskelet kası, gastrointestinal sistem, kalp, kırmızı kan hücreleri, tükürük bezleri, pankreas, safra kesesi ve kaslarda ekspresyonu gözlenmiştir (Zhu and Sly 1990; Carter *et al.* 1990; Hageman *et al.* 1991; Sender *et al.* 1994; Fleming *et al.* 1995; Wistrand *et al.* 1999; Fujikawa-Adachi *et al.* 1999; Parkkila *et al.* 1996; Sender *et al.* 1998). CA-IV'ün insan ve fare gastrointestinal sisteminde ekspresyonu ilk olarak, immunohistokimyasal blotlama ve Northern blot teknikleri kullanılarak, Fleming *et al.* (1995) tarafından incelenmiştir. Gastrik epitelyumda hiçbir sinyal gözlemlenmemiştir oysa kolonik epitelyumun apikal plazma membranında güçlü blotlama tespit edilmiştir. Küçük bağırsağın epitel hücrelerinde çok zayıf bir pozitif reaksiyon gözlemlenmiştir. Gastrointestinal kanalın bütün segmentlerinde alt epitel kapiler endotelyum güçlü sinyal göstermiştir. Safra kesesi lümenal plazma membranı ve safra kanalı epitelyumu CA-IV'e şiddetli bir immüno reaksiyon ifade etmiştir (Parkkila *et al.* 1996). Yine yapılan çalışmalarda farede safra kesesi ve amigdala başta olmak üzere barsak ve böbrekte orta seviyede ekspresyon; sirkumventriküler organlar, ekstraembriyonik doku, korteks ve kanda düşük ekspresyon gözlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

CA VA

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-VA geninin Şekil 4.7’de görüldüğü gibi preform kortekste ekspresyonu gözlemlenmiştir.

CA-VA izoenzimi insanda karaciğer, gastrointestinal sistem ve böbrekte eksprese olmuştur (Nagao *et al.* 1993; Parkkila *et al.* 1998; Saarnio *et al.* 1999). Farede karaciğer, beyin, kahverengi yağ dokusu ve testiste yüksek ekspresyon; 9,5 günlük plasenta, orta beyin, böbrek, spinal kord, lenf boğumu, 12,5 günlük plasenta, olfaktori soğanı, 9,5 günlük embriyo, yumurtalık, serebellum, 14,5 günlük baş embriyosu, korteks, kalp, 10,5 günlük kafa embriyosu, striatum, timus, diz ve kemik iliğinde düşük ekspresyon gözlenmiştir (<http://mgpd.med.utoronto.ca/>).

CA VB

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-VB geninin Şekil 4.8’de görüldüğü gibi ekspresyona uğramadığı gözlenmiştir.

Yeni bir mitokondriyal karbonik anhidraz izoformu olan CA-VB, son zamanlarda klonlanmış ve kromozom X’e haritalanmıştır. Northern blot, CA-VB’in mRNA’sının normal insan kalp ve iskelet kasında eksprese olduğunu açığa vurmuştur. Ayrıca pankreas, böbrek ve salgı bezlerinde hassas RT-PCR tekniğiyle pozitif sinyal belirlenmiştir, karaciğerde gözlenmemiştir (Fujikawa-Adachi K *et al.* 1999b; Shah *et al.* 2000). Farede kahverengi yağ dokusu, meme bezi, aort, epididimis, böbreküstü bezi, uterus, böbrek, mide, 12,5 günlük plasenta, prostat, yumurtalık, trake ve tiroit orta seviyede ekspresyon; göz, tükrük, deri, parmak, burun, 9,5 günlük plasenta, lenf boğumu, iskelet kası, karaciğer, spinal kord, trigeminus ve dil düşük ekspresyon göstermiştir (<http://mgpd.med.utoronto.ca/>).

CA VI

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-VI geninin Şekil 4.9'da görüldüğü gibi ekspresyona uğramadığı gözlenmiştir.

İmmünohistokimyasal çalışmalar CA-VI'nın memeli kulak altı bezi ve mandibula altı bezlerinin seröz acinar ve demülin hücrelerinde eksprese olduğunu göstermiştir (Kadoya *et al.* 1987; Parkkila *et al.* 1991; Ogawa *et al.* 1992; Ogawa *et al.* 1993).

Son yıllardaki bir çalışmada Fujikawa-Adachi *et al.* (1999a), insan pankreasında CA-VI mRNA'sının ekspresyonunu Northern Blot ve immünohistokimyasal yöntemlerle pozitif bir sinyal alınamadığı halde RT-PCR ve RT-PCR-Southern Blot tekniklerini kullanarak ispatlamıştır (Fujikawa-Adachi *et al.* 1999a; Parkkila *et al.* 1994). Pozitif sonuçlar; eğer pankreasta ekspresyon olmuşsa, sekretuar CA-VI'nın pankreas kanal sisteminde lüminal pH düzenlemede görev alabileceğini önermektedir. Farede tükrük, lenf boğumu, kahverengi yağ dokusu, dişler ve burunda yüksek ekspresyon; göz, parmak, deri, 9,5 günlük plasenta, trake, meme bezi ve dizde orta seviyeli ekspresyon; uyluk, dil yüzeyi, karaciğer, olfaktori soğanı, altçene, akciğer, böbrek, iskelet kası, kemik iliği, dalak, 9,5 günlük embriyo, pankreas, serebellum, epididimus ve dilde düşük ekspresyon gözlenmiştir (<http://mgpd.med.utoronto.ca/>).

CA VII

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-VII geninin Şekil 4.10'da görüldüğü gibi hemen hemen her yede düşük seviyede ekspresyon olduğu görülmektedir.

İnsan tükrük bezlerinde (Montgomery *et al.* 1991), fare akciğerlerinde (Ling *et al.* 1994) ve fare beyinde (Lakkis *et al.* 1996; Lakkis *et al.* 1997) bu enzimin mRNA'sı belirlenmiştir. Farede 9,5 günlük plasentada yüksek ekspresyon; serebellum ve karaciğerde orta seviyede ekspresyon; 9,5 günlük embriyo, korteks, orta beyin, beyin,

böbreküstü bezi, mandibula, striatum, kalvary, olfaktori soğanı, testis, deri, epididimus, uterus, dişler, göz, kahverengi yağ dokusu ve trigeminusda düşük ekspresyon gözlenmiştir (<http://mgpd.med.utoronto.ca/>). Yine farede yapılan çalışmalarda ara beyinde orta seviyede ekspresyon gözlenirken; kalp, deri, korteks, tüm vücut, böbrek, meme bezi ve tüm beyinde düşük ekspresyon gözlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

CA VIII

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-VIII geninin Şekil 4.11’de görüldüğü gibi akciğer, mide, talamus, medulla, tükürük bezi ve bağırsaklarda ekspresyon gözlemlenmiştir.

CA-VIII, CA-VII’ninkine benzer amino asit sekansı (%98) ve ekspresyon modeline sahiptir. CA-VIII sekansı ayrıca PCR ile insan salgı bezleri, testis, plasenta ve akciğeri cDNA kütüphanelerinden tanımlanmıştır (Skaggs *et al.* 1993). Yine yapılan çalışmalarda insanda beyin, kalp, iskelet kası, böbrek, pankreas, serebellum ve koroid pleksusta ekspresyonu gözlemlenmiştir (Akisawa *et al.* 2003; Taniuchi *et al.* 2002). Beyin, karaciğer, akciğer, kalp, bağırsak ve timüste yüksek seviyelerde CA-RP VIII mRNA’sı bulunmuştur (Lakkis *et al.*, 1997a; Skaggs *et al.* 1993). İmmünohistokimya ve in situ hibridizasyon çalışmaları göstermiştir ki CAVII ve CA-RP VIII mRNA’ları fare beyinde oldukça benzer şekilde dağılmışlardır (Lakkis *et al.*, 1997b; Taniuchi *et al.*, 2002a,b). Farede karaciğer, kalp, solunum sistemi, barsaklar tüm beyin (tanımlanmamış beyin bölgeleri), meme bezi, dişi üreme organları ve pankreasta ekspresyon gözlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>). Yine farede yapılan başka bir çalışmada beyin, karaciğer, akciğer, kalp, timus ve epitelyumda ekspresyon gözlenmiştir (Lakkis *et al.* 1997).

CA IX

Yaptığımız çalışmada bu gen için sonuç alınamamıştır.

CA IX izoenziminin insanda pankreas, gastrik mukoza, bağırsak epitelyumu, duodenum, boşbağırsak, kalın bağırsak, nazal mukoza, serum, göz, siliger epitelyum, korneal epitel hücreleri, korneal endotelyum, lens, körbağırsak, kolon, kıvrım bağırsak ve ürinada ekspresyonu gözlenmiştir (Kivela *et al.* 2000, 2001; Nishimori and Onishi 2001; Pastorekova *et al.* 1997; Saarnio *et al.* 1998; Tarun *et al.* 2003; Zavada *et al.* 2003; Liao *et al.* 2003).

Pastorek *et al.* (1994), MN/CA IX' un gastrointestinal sistemde ekspresyonunu ilk açıklayandır. Turner *et al.* (1997) özofagus epitelyumunun bazal tabakasında zayıf immünolekelenme grüldüğünü belirttiği halde Pastorek *et al.* (1994) gastrik epitelyumun plazma membranlarında şiddetli lekelenmeler olduğunu immünohistokimyasal olarak gösterdiler. Farede beyin epifizi ve kulak başta olmak üzere kalp, göz, bayan üreme organları, diensefalon, orta beyin, böbrek ve embriyonik dokuda ekspresyon olmuştur (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

CA X

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-X geninin Şekil 4.12'de görüldüğü gibi hemen hemen her yerde düşük düzeyde ekspresyonu gözenmiştir.

CA X izoenziminin insanda beyin, böbrek, serebellum, amigdala, serebral korteks, hippokampus, talamus, spinal kort, yumurtalık ve hipofiz bezinde eksprese olduğu belirlenmiştir (Okamoto *et al.* 2001). Farede orta beyin, ara beyin ve beyin sapı başta olmak üzere sirkumventriküler organlar, korteks, kan, tüm beyin ve gözde ekspresyonu gözlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

CA XI

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-XI geninin Şekil 4.13’de görüldüğü gibi talamus, pankreas, medulla, tükürük bezi, striatum, spinal kort, böbrek, kalp, kaslar, adrenal bezi, koroid pleksus’da ekspresyonu gözlenmiştir.

Farede korteks ve beyinde yüksek ekspresyon; striatum, orta beyin, göz, serebellum, spinal kord ve 14,5 günlük baş embriyosunda orta seviyede ekspresyon; aort, 12,5 günlük embriyo, uyluk, böbrek, böbrek üstü bezi, kolon, kalp, burun, iskelet kası, mesane, kalın bağırsak, uterus ve deride düşük düzeyde ekspresyonu gözlenmiştir (<http://mgpd.med.utoronto.ca/>).

CA XII

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-XII geninin Şekil 4.14’de görüldüğü gibi dil, cilt, koroid pleksus ve tükürük bezinde ekspresyonu gözlenmiştir.

Fare CA-XII protein ekspresyonu Kylo’nen *et al.* (2003) tarafından böbrek dokusunda çalışılmıştır. CA-XII mRNA ve protein ekspresyonu kolon, testis ve akciğer gibi çeşitli fare dokularında gösterilmiştir (Halmi *et al.*, 2004). Halmi *et al.* (2006) RT-PCR metoduyla fare ve sıçan beyinde CA-XII mRNA’sını tespit ettiler. Sıçan CA-XII’ sinin klonlanması fare CA-XII’si ile %94 homoloji gösterdiğini açığa vurmuştur. CA-XII’nin dış granül hücrelerinde, kortekste ve koroid pleksusta eksprese olduğu görülmüştür. İnsanda akciğer, karaciğer, kolon, mide, iskelet kası, cilt, dalak, tonsil, periferik kan hücreleri, lenf boğumu, meme bezi, uterus, yumurtalık, beyin, prostat, göz, siliyer epitelyum, korneal epitel hücreleri, korneal endotelyum, lens, pankreas, tükürük bezi, nazal mukoza, safra kesesi, endometrium, serviks, enterosit, kalın bağırsak, rektum, nefron ve böbrek’te ekspresyonu gözlenmiştir (Türeci *et al.* 1998; Karhumaa *et al.* 2001).

Yine farede yapılan çalışmalar sonucunda böbrek başta olmak üzere kan ve kulakta orta seviyede ekspresyon; deri, ağız, meme bezi, beyin sapı ve solunum sisteminde düşük seviyede ekspresyon gözlemlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

CA XIII

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-XIII geninin Şekil 4.15’de görüldüğü gibi cilt kaslar ve bazı diğer organlarda çok zayıf ekspresyonu gözlemlenmiştir.

CA-XIII insanda tükrük bezleri, böbrek, ince bağırsak, kolon, uterus ve testisi içeren içeren çeşitli dokularda tespit edilmiş yeni bir enzimdir. Yapılan gen ekspresyon çalışmalarında insan dokularında : timus, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kolon ve testiste ; farede : dalak, akciğer, böbrek, kalp, beyin, iskelet kası ve testislerde pozitif sinyal elde edilmiştir (Lehtonen *et al.* 2003). Yine farede yapılan başka çalışmalarda kemik iliği ve kaslarda orta şiddette ekspresyon; kulak, deri, kemik, bağdoku, ağız, erkek üreme organları ve bağırsaklarda ekspresyonu gözlemlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

CA XIV

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada ise CA-XIV geninin Şekil 4.16’de görüldüğü gibi koroid pleksusta ekspresyonu gözlenmiştir.

Northern Blot metodu insan kalbinde, karaciğerinde, beyin ve iskelet kasında mRNA ekspresyonu gösterdiği halde RT-PCR analizleri normal insan karaciğeri ve spinal kort’da şiddetli sinyal belirlemiştir. Sadece RNA Dot Blot analizleri ince bağırsak, kolon, böbrek ve mesane’de zayıf sinyaller göstermiştir (Fujikawa-Adachi *et al.* 1999c).

Farede beyin epifizi ve kulakta orta şiddette ekspresyon; kalp, göz, dişi üreme organları, ara beyin, orta beyin, böbrek ve embriyonik dokuda düşük düzeyde ekspresyon gözlemlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

CA XV

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada CA-XV geninin Şekil 4.17’de görüldüğü gibi hemen hemen her yerde düşük düzeyde ekspresyonu gözlenmiştir.

RT-PCR çalışmaları insanlarda CA-XV’in eksprese olmadığını onaylamıştır. Aksine RT-PCR ve *in situ* hibridizasyon çalışmaları farede yapılmış ve böbrek, beyin, ve testiste pozitif sinyal elde edilmiştir (Hilvo *et al.* 2005). Yine farede yapılan çalışmalarda böbrekte orta seviyeli ekspresyon; damarlar, pankreas, dişi üreme organları, solunum sistemi, kalp ve erkek üreme organlarında düşük düzeyde ekspresyon gözlemlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

Acaca

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada Acaca geninin Şekil 4.18’da görüldüğü gibi periferik sinir sistemi, merkezi sinir sistemi, akciğer, kol ve bacaklar, yüz kıvrımağı, akciğer, tükürük bezi, böbrek, mide, timus ve pankreasta ekspresyonu gözlenmiştir.

İnsanda kalp, beyin, plesenta, akciğer, iskelet kası, böbrek, pankreas, adipoz doku ve meme bezlerinde ekspresyonu gözlenmiştir (Mao *et al.* 2003). Farede tüm beyin başta olmak üzere kaslar, embriyonik doku, meme bezi, tüm baş, kulak, göz ve solunum sisteminde orta seviyede ekspresyon deride düşük ekspresyon gözlemlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

Acacb

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada Acacb geninin Şekil 4.19’de görüldüğü gibi zayıf olarak bütün embriyo dokularında ekspresyon gözlenmiştir.

İnsanda karaciğer, iskelet kası ve kalpte ekspresyon olduğu gözlenmiştir (Ha *et al.* 1996; Abu-Elheiga *et al.* 1997,2000). Farede kaslar, mesane, deri, kan, bağdoku, karaciğer, ağız, bağırsak, embriyonik doku ve meme bezinde orta seviyede ekspresyon gözlemlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

Pcx

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada Pcx geninin şekil 4.20’de görüldüğü gibi karaciğer, pons, sırt kası, böbrek, olfaktori soğancığı, medulla, pankreas, adrenal bezinde ekspresyon gözlenmiştir.

Çipura balığının bazı organlarında RT-PCR metoduyla Piruvat karboksilaz’ın komplementer DNA sekansı belirlenmiştir. Pcx’ın molekül büyüğünün 6500 nükleotid olduğu Northern Blot analiziyle belirlenmiştir. Northern Blot analizlerine göre: Pcx kas, kalp, karaciğer ve yumurtalıkta ekspresyon olurken dalakda olmamıştır (Abe *et al.* 2004). İnsanda karaciğer, pankreas, deri, lenfosit ve beyinde ekspresyonu gözlenmiştir (Wexler *et al.* 1994; Sato *et al.* 2002; Higgings *et al.* 1994; Peng *et al.* 1993). Farede bağdoku, böbrek, kol ve bacaklar, karaciğer ve kulakta orta seviyeli ekspresyon gözlenirken; dalak, dişi üreme organları ve lenf boğumunda düşük ekspresyon gözlemlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

Mccc 1, Mccc2

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada Mcc1 enziminin şekil 4.21’de görüldüğü gibi ekspresyon gözlenmemiştir ve Mccc2 geni için sonuç alınamamıştır. Mccc1 ; insanda kalp, iskelet kası, böbrek ve karaciğer gibi mitokondrice zengin organlarda bol olarak eksprese olmuştur (Keiko *et al.* 2001). Yapılan başka bir çalışmada Mcc1’in İnsanda kalp, karaciğer, kas, böbrek, kolon, timus, dalak, plasenta, akciğer, bağırsak ve lenf boğumunda ekspresyonu; Mccc2’nin karaciğer, kalp, böbrek ve kas dokularına ekspresyonu gözlemlenmiştir (Obata *et al.* 2001). Northern Blot analizlerine göre: İnsanda Mccc1 ve Mccc2 kas ve yumurtalıkta yüksek seviyede, eser seviyede kalp, dalak ve karaciğerde ekspresyon olmuştur. Mccc’lerin özellikle protein metabolizmasında aktif olan kas ve yumurtalıklarda önemli olduğu görülmektedir (Shunnoske *et al.* 2004). Farede ise Mccc1 kol ve bacaklar başta olmak üzere böbrek, damarlar, bağdoku, kalp, kan, korteks, arabeyin, endokrin sistem ve erkek üreme organlarında ekspresyon olurken; Mccc2 yine kol ve bacaklar başta olmak üzere böbrek, bağdoku, endokrin sistem karaciğer, ağız, mide, kalp ve kortekste ekspresyon olmuştur (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

Pcca

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada Pcca geninin Şekil 4.22’de görüldüğü gibi retina, karaciğer, cilt, akciğer, whgiskers, kaslar, böbrek, pankreas, tükrük bezi, timus ve spinal kort, merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi’da ekspresyonu gözlenmiştir.

İnsanda karaciğer ve deride eksprese olmuştur (Lamhonwah *et al.* 1986). Farede kahverengi yağ dokusu, aort, böbrek ve midede orta şiddette ekspresyon gözlenirken; kolon, ince bağırsak, karaciğer, dil, lenf boğumu, kalp, tükrük, testis, prostat, epididimus, trake, 10,5 günlük kafa embriyo, 14,5 günlük kafa embriyo, 12,5 günlük embriyo, 9,5 günlük plasenta, meme bezi, iskelet kası, ince bağırsak, 9,5 günlük

embriyo ve serebellumda çok düşük ekspresyon gözlemlenmiştir ((<http://mgpd.med.utoronto.ca/>).

Pccb

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada Pccb geninin Şekil 4.23’de görüldüğü gibi ekspresyona uğramadığı gözlenmiştir.

İnsanda karaciğer, kas, plasenta, böbrek ve beyinde eksprese olmuştur (Baumgartner *et al.* 1975,1989, Scholte *et al.* 1980). Farede böbrek ve mesane başta olmak üzere orta beyin, damarlar, karaciğer, tüm baş, timus, endokrin sistem ve kemikte orta seviyeli ekspresyon gözlemlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

Ggcx

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada ise Ggcx geninin şekil 4.24’da görüldüğü gibi ekspresyona uğramadığı gözlenmiştir.

İnsanda yapılan çalışmalarda kemik, karaciğer, böbrek, pankreas, kolon akciğer, yumurtalık, prostat, plasenta, iskelet kası, kalp, testis, ince bağırsak, dalak, timus, beyin ve lökositlerde ekspresyon gözlenmiştir (Liu *et al.* 1996). Romero *et al.* (1998) tarafından fare Ggcx genini kodlayan tam boy cDNA izole edilerek karakterize edilmiş ve analizi selüler seviyede yapılmıştır. İn sitü hibridizasyonla gen ekspresyonu yapılmıştır. Vitamin K-bağımlı proteinlerin sentezinin ana bölgesi olan hepatositlerde ggcx mRNA’sı gebelikte geç eksprese olmuştur. Aksine merkezi sinir sistemi, mezenkimal ve iskelet dokuları embriyonun oluşması ve gelişmesinde erken eksprese olmuştur (Romero *et al.* 1998). Yine yapılan başka çalışmalarda karaciğer ve uylukta orta seviyeli ekspresyon görülürken; uterus, dişler, böbreküstü bezi, prostat, 12,5 günlük plasenta, trake, pankreas, dil, yumurtalık, aort, serebellum, tükürük, göz, diz, 9,5 günlük

plasenta, mesane, akciğer, meme bezi, deri, spinal kord, korteks, kalp ve mandibula'da çok düşük ekspresyon görülmüştür (<http://mgpd.med.utoronto.ca/>).

Paics

14,5 günlük fare embriyosunda yaptığımız çalışmada Paics geninin şekil 4.25'de görüldüğü gibi cilt, karaciğer, subventrikal bölge, akciğer, whiskers, kol ve bacaklar, mide, böbrek, pankreas, kaslar, beyin sistemi, periferik sinir sistemi, timus ve merkezi sinir sistemi ta ekspresyon gözlenmiştir.

İnsanda kırmızı kan hücrelerinde, trombositlerde, lökositlerde ve midede ekspresyon olmuştur (Alenin *et al.* 1990). Farede embriyonik doku başta olmak üzere meme bezi, göz, böbrek, mide, kemik iliği, kan, kol ve bacaklar ve tüm başda düşük seviyede ekspresyon gözlemlenmiştir (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult>).

Sonuç olarak;

1. Karbonik anhidraz'ın bilinen bütün izoenzim genleri için 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde *in situ* hibridizasyon yöntemiyle gen ekspresyon analizi yapılarak sonuçlar çizelge 4.2'de verilmiştir.
2. Bilinen bütün karboksilaz enzim genleri için karbonik anhidraz izoenzim genleri için yapılan çalışmalar yapılarak sonuçlar çizelge 4.2'de verilmiştir.
3. Elde edilen sonuçlar literatürle karşılaştırılmıştır. Embriyolojik gelişmenin farklı evrelerinde farklı ekspresyon profilleri elde edilmiştir.
4. Car5b, Car6, Pcx, Mccc1, Pccb ve Ggcx gibi bazı genler farklı canlılarda veya farenin farklı evrelerinde ekspresyon gösterdikleri halde 14,5 günlük fare embriyosunda ekspresyona uğramadığı anlaşılmıştır.
5. Car2, Car3, Car4, Car7, Car13, Car15, Acacb, Paics ve Pcx genleri literatürle uyumluluk göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Akisawa, Y., Nishimori, I., Taniuchi, K., Okamoto, N., Takeuchi, T., Sonobe, H., Ohtsuki, Y., Onishi, S., 2003. Expression of carbonic anhydrase-related protein CA-RP VIII in non-small cell lung cancer. *Virchows Arch.*, 442 (1), 66-70.
- Albrecht, U., Lu, H.C., Revelli, J.P., Xu, X.C., Lotan, R., Eichele, G., 1998. Studying Gene Expression on Tissue Section Using In Situ Hybridization, (ed. Adolph, K.W. in *Human Genome Methods*), CRC Pres, pp 93-120.
- Alenin, V.V., Iakovleva, M.F., Bystrova, I.M., Zazerskaia, I.A., Domkin, V.D., 1990. Testing the activity of enzymes responsible for biosynthesis of purine nucleotides AIR-carboxylase and SAICAR-synthetase in human cell extracts. *Vopr Med Khim*, 36 (6), 59-63.
- Allen, A. & Carrol, N.J.H., 1985. Adherent and soluble mucus in the stomach and duodenum. *DigestivE Diseases and Sciences*, 30, 55S.62S. *American JouRNAl of Medicine*, 81 (2A), 18-22.
- Bachmann, C., Brechbuhler, T., Wick, H., 1975. Acute neonatal nonketotic hyperglycinemia: normal propionate and methylmalonate metabolism. *Pediatr Res*, 9 (7), 559-64.
- Backman, U., Danielsson, B., Wistrand, P.J., 1990. The excretion of carbonic anhydrase isozymes CA I and CA II in the urine of apparently healthy subjects and in patients with kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest*, 50 (6), 627-33.
- Baumgartner, E.R., Suormala, T.M., Wick, H., Probst, A., Blauenstein, U., Bachmann, C., Vest, M., 1989. Biotinidase deficiency: a cause of subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh syndrome). Report of a case with lethal outcome. *Pediatr Res*, 26 (3), 260-6.
- Bekku, S., Mochizuki, H., Takayama, E., Shinomiya, N., Fukamachi, H., Ichinose, M., Tadakuma, T., Yamamoto, T., 1998. Carbonic anhydrase I and II as a differentiation marker of human and rat colonic enterocytes. *Res Exp Med (Berl)*, 198 (4), 175-85.
- Bergenheim, N.C.H., Hallberg, M., Wisen, S., 1998. Molecular characterization of the human carbonic anhydrase-related protein (HCA-RP VIII). *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1384 (2), 294-298.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25 (8), 966-969.
- Beydemir, Ş., Gülçin, İ., 2004. Effects of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Journal of enzyme inhibition and Medicinal Chemistry*, 19 (2), 193-197.
- Binder, H.J., Foster, E.S., Budinger, M.E., Hayslett, J.P., 1987. Mechanism of electroneutral sodium chloride absorption in distal colon of the rat. *Gastroenterology*, 93 (3), 449-455. *Biochem. Biophys.* 311 (1994) 62-71.

- Bjorkbacka, H., Johansson, I.M., Skarfstad, E., Forsman, C., 1997. The sulfhydryl groups of Cys 269 and Cys 272 are critical for the oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*. *Biochemistry*, 36 (14), 4287-4294.
- Boriack-Sjodin, P.A., Heck, R.W., Laipis, P.J., Silverman, D.N. and Christianson, D.W., 1995. Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase V at 2.45-Å resolution, implications for catalytic proton transfer and inhibitor design. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 92, 10949-10953.
- Bundy, H.F., 1977. Carbonic-Anhydrase. *Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 57 (1), 1-7.
- Cabiscol, E., Levine, R.L., 1995. Carbonic anhydrase-III - oxidative modification in-vivo and loss of phosphatase-activity during aging. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (24), 14742-14747.
- Cabiscol, E., Levine, R.L., 1996. The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 93 (9), 4170-4174.
- Carter, N., Jeffery, S., Shiels, A., Edwards, Y., Tipler, T., Hopkinson, D.A., 1979. Characterization of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle. *Biochem Genet*, 17 (9-10), 837-54.
- Carter, N., Wistrand, P.J., Lonnerholm, G., 1989. Carbonic-anhydrase localization to perivenous hepatocytes. *Acta Physiologica Scandinavica*, 135 (2), 163-167.
- Carter, N.D., Fryer, A., Grant, A.G., Hume, R., Strange, R.G., Wistrand, P.J., 1990. Membrane specific carbonic anhydrase (CAIV) expression in human tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1026 (1), 113-6.
- Champe, P.C, Harvey, R.A., 1997. *Biochemistry*.
- Charney, A.N., Egnor, R.W., 1989. Membrane site of action of CO₂ on colonic sodium-absorption. *American Journal of Physiology*, 256 (3), 584-590.
- Chegwidden, W.R., Dodgson, S.J. and Spencer, I.M., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 343-363.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N., *The Carbonic Anhydrases-New Horizons. 2000 Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriber, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., pp. 2165-2204, McGraw-Hill, Inc., New York
- Christie, K.N., Thomson, C., Xue, L.Z., Lucocq, J.M., Hopwood, D., 1997. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III, and IV are present in human esophageal epithelium *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45 (1), 35-40.
- Davenport, H.W. & Fisher, R.B., 1938. Carbonic anhydrase in the gastrointestinal mucosa. *The Journal Of Physiology*, 94, 16-17.
- Davenport, H.W., 1939. Gastric carbonic anhydrase. *The Journal Of Physiology*, 97, 32-43.
- Demir, N., Demir, Y. and Nadaroğlu, H., 2001. Carbonic anhydrase from bovine bone. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 31, 33-47.
- Devlin T M. *Biochemistry with Clinical Correlations*. 2002, Kanada
- Dodgson, S.J., 1991. Why are there carbonic-anhydrases in the liver. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire*, 69 (12), 761-763.

- Dodgson, S.J., Forster, R.E., Storey, B.T., 1984. The role of carbonic-anhydrase in hepatocyte metabolism. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 429 (JUN), 516-524.
- Dodgson, S.J., Quistorff, B., Ridderstrale, Y., 1993. Carbonic-anhydrases in cytosol, nucleus, and membranes of rat-liver. *Journal of Applied Physiology*, 75 (3), 1186-1193.
- Earnhardt, J.N., Qian, M.Z., Tu, C.K., Lakkis, M.M., Bergenhem, N.C.H., Lapis, P.J., Tashian, R.E., Silverman, D.N., 1998. The catalytic properties of murine carbonic anhydrase VII. *Biochemistry*, 37 (30), 10837-10845.
- Edwards, Y.H., 1991. Structure And Expression Of The Carbonic Anhydrase III Gene. In, Dodgson SJ, Tashian RE, Gros G & Carter ND (Eds) *The Carbonic Anhydrases. Cellular Physiology And Molecular Genetics*. Plenum Press, New York, P 215-224.
- Elpeleg, O. N., Havkin, S., Barash, V., Jakobs, C., Glick, B., and Shalev, R. S. (1992). Familial hypotonia of childhood caused by isolated 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency. *J. Pediatr.* 121: 407-410.
- Engberg, P., Millqvist, E., Pohl, G., Lindskog, S., 1998. Purification and some properties of carbonic-anhydrase from bovine skeletal-muscle *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 241 (2), 628-638.
- Erfle, J. D. 1973. Acetyl-CoA and propionyl-CoA carboxylation by *Mycobacterium pheli*: partial purification and some properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 316:143-155.
- Fall, R. R. 1976. Stabilization of an acetyl-CoA carboxylase complex from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochim. Biophys. Acta* 450:175-480.
- Fall, R. R., A. W. Alberts, and P. R. Vagelos. 1975. Analysis of bacterial biotin proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 379:496-503.
- Fenton, W. A., Gravel, R. A., and Rosenblatt, D. S. (2001) in *The Metabolic and*
- Fernley, R.T., Wright, R.D., Coghlan, J.P., 1988. Complete amino-acid sequence of ovine salivary carbonic-anhydrase. *Biochemistry*, 27 (8), 2815-2820.
- Fernley, R.T., Wright, R.D., Coghlan, J.P., 1991. Radioimmunoassay of carbonic anhydrase-VI in saliva and sheep tissues. *Biochemical Journal*, 274, 313-316, Part 2.
- Finnie, M. D., Cottrall, K., Seakins J. W., and Snedden, W. (1976). Massive excretion of 2-oxoglutaric acid and 3-hydroxyisovaleric acid in a patient with a deficiency of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *Clin. Chim. Acta* 73: 513-519.
- Fleming, R.E., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H., Waheed, A., Sly, W.S., 1995. Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular, and subcellular localization. *J Clin Invest*, 96 (6), 2907-13.
- Flemstrom, G., 1986. Gastroduodenal mucosal secretion of bicarbonate and mucus - physiological control and stimulation by prostaglandins.
- Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Sakamoto, S., Morita, M., Onishi, S., Yonezawa, S. & Hollingsworth, M.A., 1999a. Identification of carbonic anhydrase IV and VI mRNA expression in human pancreatic and salivary glands. *Pancreas*, 18, 329-335.
- Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T. & Onishi, S. 1999c. Human carbonic anhydrase XIV (CA14), cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. *Genomics*, 61 (1), 74-81.

- Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., Yuri, K. & Onishi, S. 1999d. cDNA sequence, mRNA expression, and chromosomal localization of human carbonic anhydrase-related protein, CA-RP XI. *Acta biochimica et Biophysica Sinica*, 1431 (2), 518-524.
- Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T. & Onishi, S., 1999b. Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. cDNA cloning, mRNA expression, subcellular localization, and mapping to chromosome X. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 21228-21233.
- Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Sakamoto, S., Morita, M., Onishi, S., Yonezawa, S., Hollingsworth, M.A., 1999. Identification of carbonic anhydrase IV and VI mRNA expression in human pancreas and salivary glands. *Pancreas*, 18 (4), 329-35.
- Garcia-Cazorla A, Rabier D, Touati G, Chadeaux-Vekemans B, Marsac C, de Lonlay P, Saudubray JM 2006 Pyruvate carboxylase deficiency: Metabolic characteristics and new neurological aspects *Annals of Neurology* 59 (1), 121-127
- Gassen, H.G., Schrimph, G. (Hrsg.), (1999), *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 2.Auflage, s.295-332, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin.
- Ghandour, M.S., Langley, O.K., Zhu, X.L., Waheed, A., Sly, W.S., 1992. Carbonic anhydrase-IV on brain capillary endothelial-cells - a marker associated with the blood-brain-barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (15), 6823-6827.
- Gibson, K. M., Bennett, M. J., Naylor, E. W., and Morton, D. H. (1998). 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in Amish/Mennonite adults identified by detection of increased acylcarnitines in blood spots of their children. *J. Pediatr.* 132: 519–523.
- Guchhait, R. B., S. E. Polakis, P. Dimroth, E. Stoll, J. Moss, and M. D. Lane. 1974. Acetyl-coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 249:6633–6645.
- Haapasalo, J.A., Nordfors, K.M., Hälvo, M., Rantala, I.J., Soini, Y., Parkkila, A.K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Parkkila, S.M., Haapasalo, H.K., 2006. Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis. *Clinical Cancer Research*, 12 (2), 473-477.
- Haase, F. C., Beegen, H., and Allen, S. H., 1984. *Eur. J. Biochem*, 140, 147–151.
- Hageman, G.S., Zhu, X.L., Waheed, A., Sly, W.S., 1991. Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (7), 2716-20.
- Halmi, P., Parkkila, S., Honkanen, J., 2006. Expression of carbonic anhydrases II, IV, VII, VIII and XII in rat brain after kainic acid induced status epilepticus. *Neurochemistry International*, 48 (1), 24-30.
- Halsted, C.H., Villanueva, J., Chandler, C.J., Ruebner, B., Munn, R.J., Parkkila, S. & Niemela, O., 1993. Centrilobular distribution of acetaldehyde and collagen in the ethanol-fed micropig. *Hepatology*, 18 (4), 954-960.
- Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J., 1996. Differentiation-dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEB Journal*, 10 (4), 481-490.

- Heath, R., Schwartz, M.S., Brown, I.R., Carter, N.D., 1983. Carbonic anhydrase III in neuromuscular disorders. *J Neurol Sci*, 59 (3), 383-8.
- Heck, R.W., Tanhauser, S.M., Manda, R., Tu, C.K., Laipis, P.J., Silverman, D.N., 1994. Catalytic properties of mouse carbonic-anhydrase-V. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (40), 24742-24746.
- Henrikson, K.P., Allen, S.H.G., 1979. Purification and subunit structure of propionyl coenzyme-a carboxylase of mycobacterium-smegmatis. *Journal of Biological Chemistry*, 254 (13), 5888-5891.
- Henrikson, K., and S. H. G. Allen. 1979. Purification and subunit structure of propionyl coenzyme A carboxylase of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* 254:5888–5891.
- Henry, R.P., Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Respiration Physiology*, 121 (1), 1-12.
- Hewett-Emmett, D., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 29-78.
- Hewett-Emmett, D., Tashian, R.E., 1996. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5 (1), 50-77.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-Anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, 392, 83-92, Part 1.
- Hiep, T. T., Kulikov, V. N., Noskov, V. N., Sizonenko, G. I., Chernoff, Y. O. and Pavlov, Y. I., 1993. The 5-aminoimidazole ribonucleotide-carboxylase structural gene of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*: cloning, sequencing and homology analysis. *Yeast* 9, 1251–1258.
- Higgins, J.J., Glasgow, A.M., Lusk, M., Kerr, D.S., 1994. MRI, clinical, and biochemical features of partial pyruvate carboxylase deficiency. *J Child Neurol*, 9 (4), 436-9.
- Higuchi, Y., Ito, M., Tajima, M., Higuchi, S., Miyamoto, N., Nishio, M., Kawano, M., Kusagawa, S., Tsurudome, M., Sudo, A., Katou, K., Uchida, A., Ito, Y., 1999. Gene expression during osteoclast-like cell formation induced by antiresorptive regulatory protein-1/CD98/4F2 monoclonal antibodies (MAbs): c-src is selectively induced by anti-FR-1 MAb. *Bone*, 25 (1), 17-24.
- Holmes, R.S., 1976. Mammalian carbonic-anhydrase isozymes - evidence for a 3rd locus. *Journal of Experimental Zoology*, 197 (2), 289-295.
- Hori, T., N. Nakamura, and H. Okuyama. 1987. Possible involvement of acetyl coenzyme A carboxylase as well as fatty acid synthetase in the temperature-controlled synthesis of fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 101:949–956.
- Hu, P.Y., Ernst, A.R., Sly, W.S., Venta, P.J., Skaggs, L.A., Tashian, R.E., 1994. Carbonic-anhydrase-II deficiency - single-base deletion in exon-7 is the predominant mutation in caribbean hispanic patients. *American Journal of Human Genetics*, 54 (4), 602-608.
- Huder, J. B., and P. Dimroth. 1993. Sequence of the sodium ion pump methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella parvula*. *J. Biol. Chem.* 268:24564–24571.

- Hunaiti, A., and P. E. Kolattukudy. 1982. Isolation and characterization of an acyl-coenzyme A carboxylase from an erythromycin-producing *Streptomyces erythreus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 216:362–371.
- Ihara, K., Kuromaru, R., Inoue, Y., Kuhara, T., Matsumoto, I., Yoshino, M., and Fukushima, J. (1997). An asymptomatic infant with isolated 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency detected by newborn screening for maple syrup urine disease. *Eur. J. Pediatr.* 156: 713–715.
- Ivanov, S.V., Kuzmin, I., Wei, M.H., Pack, S., Gell, L., Johnson, B.E., Stanbridge, E.J., Lerman, M.I., 1998. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von hippel-lindau transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (21), 12596-12601.
- J.R. Knowles, The mechanism of biotin-dependent enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 58 (1989) 195–221.
- Jeffery, S., Edwards, Y., Carter, N., 1980. Distribution of CAIII in fetal and adult human tissue. *Biochem Genet*, 18 (9-10), 843-9.
- Jiang, H., Rao, K.S., Yee, V.C., Kraus, J.P., 2005. Characterization of four variant forms of human propionyl-CoA carboxylase expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 280. (30), 27719-27
- Jones, G.L., Shaw, D.C., 1983. A chemical and enzymological comparison of the common major human erythrocyte carbonic anhydrase II, its minor component, and a new genetic variant, CA II Melbourne (237 Pro leads to His). *Hum Genet*, 63 (4), 392-9.
- Juvonen, T., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Niemela, O., Lajunen, L.H.J., Kairaluoma, M.I., Peramaki, P., Rajaniemi, H., 1994. High-activity carbonic-anhydrase isoenzyme (CA-II) in human gallbladder epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 42 (10), 1393-1397.
- Kadoya, Y., Kuwahara, H., Shimazaki, M., Ogawa, Y., Yagi, T., 1987. Isolation of carbonic-anhydrase from human-saliva and immunohistochemical demonstration in salivary-glands. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 20 (6), 710-710.
- Karhumaa, P., Parkkila, S., Waheed, A., Parkkila, A.K., Kaunisto, K., Tucker, P.W., Huang, C.J., Sly, W.S., Rajaniemi, H. 2000. Nuclear NonO/p54(nrb) protein is a nonclassical carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 275 (21), 16044-9.
- Karhumaa P, Kaunisto K, Parkkila S, Waheed A, Pastorekova S, Pastorek J, Sly WS, Rajaniemi H. 2001. Expression of the transmembrane carbonic anhydrases, CA IX and CA XII, in the human male excurrent ducts. *Mol Hum Reprod.* 7(7):611-6.
- Kato, K., 1990. Sequence of a novel carbonic anhydrase-related polypeptide and its exclusive presence in purkinje-cells. *Febs Letters*, 271 (1-2), 137-140.
- Kaunisto, K., Parkkila, S., Tammela, T., Ronnberg, L., Rajaniemi, H., 1990. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes in the human male reproductive tract. *Histochemistry*, 94 (4), 381-6.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., (2004) *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*

- Keiko Obata, Takayuki Fukuda, Riyo Morishita, Shunnosuke Abe,† Shuichi Asakawa, Seiji Yamaguchi,§ Makoto Yoshino, Kenji Ihara, Keiko Murayama, Kazuhiro Shigemoto, Nobuyoshi Shimizu, and Ikuko Kondo (2001) Human Biotin-Containing Subunit of 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Gene (MCCA): cDNA Sequence, Genomic Organization, Localization to Chromosomal Band 3q27, and Expression Genomics 72, 145–152
- Kelly, C.D., Carter, N.D., Deboer, P., Jeffery, S., Moorman, A.F.M., Smith, A., 1991. Detection of CAIII messenger-RNA in rat skeletal-muscle and liver by insitu hybridization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39 (9), 1243-1247.
- Khalifah, R.G., 1971. Carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase I stop-flow kinetic studies on native human isoenzyme-B and isoenzyme-C. *Journal of Biological Chemistry*, 246 (8), 2561.
- Kivela, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T.J., Kivela, J., Parkkila, A.K., Waheed, A., Sly, W.S., Grubb, J.H., Shah, G., Tureci, O., Rajaniemi, H., 2000. Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *American Journal of Pathology*, 156 (2), 577-584.
- Kivela, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Lemonen, J., Rajaniemi, H., 1999. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. *Journal of Physiology-London*, 520 (2), 315-320.
- Kivilaakso, E., Silen, W., 1981. The role of mucosal carbonic-anhydrase in the protection of gastric-mucosa against luminal H⁺. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 16, 219-221.
- Kim, G., Selengut, J., Levine, R.L., 2000. Carbonic anhydrase III: the phosphatase activity is extrinsic. *Arch Biochem Biophys*, 377 (2), 334-40.
- Kimura, Y., R. Sato, K. Mimura, and M. Sato. 1997. Propionyl coenzyme A carboxylase is required for development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 179:7098–7102
- Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B.E., Ferry, J.G., Rees, D.C., 1996. A left-handed beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *EMBO Journal*, 15 (10), 2323-2330.
- Kivela, A.J., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T.J., Kivela, J., Parkkila, A.K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W.S., Rajaniemi, H., 2000. Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochem Cell Biol*, 114 (3), 197-204.
- Kivela, A.J., Saarnio, J., Karttunen, T.J., Kivela, J., Parkkila, A.K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, T.S., Rajaniemi, H., 2001. Differential expression of cytoplasmic carbonic anhydrases, CA I and II, and membrane-associated isozymes, CA IX and XII, in normal mucosa of large intestine and in colorectal tumors. *Dig Dis Sci*, 46 (10), 2179-86.
- Kivela, J., Parkkila, S., Metteri, J., Parkkila, A.K., Toivanen, A., Rajaniemi, H., 1997. Salivary carbonic anhydrase VI concentration and its relation to basic characteristics of saliva in young men. *Acta Physiologica Scandinavica*, 161 (2), 221-225.
- Klug W.S., Cummings R.M ve grupları (2002) Genetik kavramlar (Çeviri: C. Öner) Palme Yayıncılık.

- Koester, M.K., Pullan, L.M., Noltmann, E.A., 1981. The para-nitrophenyl phosphatase-activity of muscle carbonic-anhydrase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 211 (2), 632-642.
- Kolar, C., Caffrey, T., Hollingsworth, M., Scheetz, M., Sutherlin, M., Weide, L., Lawson, T., 1997. Duct epithelial cells cultured from human pancreas processed for transplantation retain differentiated ductal characteristics. *Pancreas*, 15 (3), 265-71.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. and Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- Kummola, L., Hamalainen, J.M., Kivela, J., Kivela, A.J., Saarnio, J., Karttunen, T., Parkkila, S., 2005. Expression of a novel carbonic anhydrase, CA XIII, in normal and neoplastic colorectal mucosa. *BMC Cancer* 5, Art. No. 41.
- Kumpulainen, T., Jalovaara, P., 1981. Immunohistochemical localization of carbonic-anhydrase isoenzymes in the human-pancreas. *Gastroenterology*, 80 (4), 796-799.
- Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. Gen ekspresyon analizi ve mikroarrayler, (Editörler: Telefoncu A., Küfrevioğlu, Ö.İ., Pazarlıoğlu N.) *Biyoinformatik-1* S.167-175 (2003)
- Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005. Gen Ekspresyon Analizi Ders Notları.
- Lakkis, M.M., Bergenheim, N.C.H., Tashian, R.E., 1996. Expression of mouse carbonic anhydrase VII in E-Coli and demonstration of its CO₂ hydrase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226 (1), 268-272.
- Lakkis, M.M., Oshea, K.S., Tashian, R.E., 1997. Differential expression of the carbonic anhydrase genes for ca VII (Car7) and CA-RP VIII (Car8) in mouse brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45 (5), 657-662.
- Lamhonwah, A.M., Barankiewicz, T.J., Willard, H.F., Mahuran, D.J., Quan, F., Gravel, R.A., 1986. Isolation of cDNA clones coding for the alpha and beta chains of human propionyl-CoA carboxylase: chromosomal assignments and DNA polymorphisms associated with PCCA and PCCB genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (13), 4864-8.
- Lamhonwah, M. A., D. LeClerc, M. Loyer, R. Clarizio, and A. R. Gravel. 1994. Correction of the metabolic defect in propionic acidemia fibroblasts by microinjection of a full-length cDNA or RNA transcript encoding the propionyl-CoA carboxylase beta subunit. *Genomics* 19:500-505.
- Laurila, A.L., Jeffery, S., Savolainen, J., Takala, T.E.S., Carter, N.D., Vaananen, H.K., 1991. Immobilization induces carbonic anhydrase-III in type-II fibers of rat skeletal-muscle. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39 (5), 617-624.
- Layward, E. M., Tanner, M. S., Pollitt, R. J., and Bartlett, K. (1989). Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting as a Reye syndrome-like illness. *J. Inherit. Metab. Dis.* 12: 339-340.
- Lehnert, W., Niederhoff, H., Suormala, T., and Baumgartner, E. R.(1996). Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: Long-term outcome in a case with neonatal onset. *Eur. J. Pediatr.* 155: 568-572
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Principles of Biochemistry*, 3.Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.

- Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivela, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S., 2004. Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 2719-2727.
- Leimonen, J., Kivela, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H., 1999. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. *Caries Research*, 33 (3), 185-190.
- Lesburg, C.A., Christianson, D.W., 1995. X-RAY crystallographic studies of engineered hydrogen-bond networks in a protein-zinc binding-site. *Journal of the American Chemical Society*, 117 (26), 6838-6844.
- Ling, B., Bergenheim, N.C.H., Dodgson, S.J., Forster, R.E., Tashian, R.E. 1994. Determination of mRNA levels for six carbonic anhydrase isozymes in rat lung. *Isozyme Bull*, 27,47
- Li, S.-J., and J. E. Cronan, Jr. 1992. The genes encoding the biotin carboxylase subunits of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* 267:16841-16847.
- Li, S.-J., and J. E. Cronan, Jr. 1993. Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175:323-340.
- Liao, S.Y., Ivanov, S., Ivanova, A., Ghosh, S., Cote, M.A., Keefe, K., Coca-Prados, M., Stanbridge, E.J., Lerman, M.I., 2003. Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12 (CAXII) in glaucoma. *J Med Genet*, 40 (4), 257-61.
- Lindskog, S. and Silverman, D.W., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 175-196.
- Lindskog, S., Engberg, P., Forsman, C., Ibrahim, S.A., Jonsson, B.H., Simonsson, I., Tibell, I., 1984. Kinetics and mechanism of carbonic-anhydrase isoenzymes. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 429 (JUN), 61-75
- Liu, Y., Nelson, A.N., Lipsky, J.J., 1996. Vitamin K-dependent carboxylase : mRNA distribution and effects of vitamin K-deficiency and warfarin treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 224(2):549-54.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., (2001), *Molecular Cell Biology*, 4nd edition, pp.248-251, W.H. Freeman and Company, New York.
- Lonnerholm, G., Selking, O., Wistrand, P.J., 1985. Amount and distribution of carbonic-anhydrases CA-I and CA-II in the gastrointestinal-tract. *Gastroenterology*, 88 (5), 1151-1161.
- Lovejoy, D.A., Hewett-Emmett, D., Porter, C.A., Cepoi, D., Sheffield, A., Vale, W.W. & Tashian, R.E., 1998. Evolutionary conserved, "Acatalytic" carbonic anhydrase-related protein XI contains a sequence motif present in the neuropeptide sauvagine, the human CA-RP XI gene (CA11) is embedded between the secretor gene cluster and the dbp gene at 19q13.3. *Genomics*, 54, 484-493.
- M.C. Scrutton, M.F. Utter, Pyruvate carboxylase. IX. Some properties of the activation by certain acyl derivatives of coenzyme A, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 1723-1735.
- M.F. Utter, D.B. Keech, Formation of oxaloacetate from pyruvate and CO₂, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 17-1

- M.J. MacDonald, Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20051–20058.
- Maa, J.S., Rodriguez, J.F. and Esteban, M., 1990. Structural and functional characterization of a cell surface binding protein of Vaccinia virus. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 1569-1577.
- Mafra, D., Cozzolino, S.M., 2004. Erythrocyte zinc and carbonic anhydrase levels in nondialyzed chronic kidney disease patients. *Clin Biochem*, 37 (1), 67-71
- Mao, J., Chirala, S.S., Wakil, S.J., 2003. Human acetyl-CoA carboxylase 1 gene: presence of three promoters and heterogeneity at the 5'-untranslated mRNA region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (13), 7515-20.
- Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., Godman, D.F., 1997. Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280 (1), 98-104.
- Martinez-Zaguillan, R., Seftor, E.A., Seftor, R.E., Chu, Y.W., Gillies, R.J., Hendrix, M.J., 1996. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 14 (2), 176-86
- Mazelis, M. (1980). In “The Biochemistry of Plants, Vol. 5, Amino Acids and Derivatives” (B. J. Mifflin, Ed.), pp. 542–567, Academic Press, New York
- McMahon, C., Will, A., Hu, P., Shah, G.N., Sly, W.S., Smith, O.P., 2001. Bone marrow transplantation corrects osteopetrosis in the carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Blood*, 97 (7), 1947-50.
- Meldrum, N.N. and Roughton, F.J.F., 1933. Carbonic Anhydrase , Its preparation and properties. *Nature*, 80, 113-142.
- Metcalfe, H.K., Monson, J.P., Drew, P.J., Iles, R.A., Carter, N.D., Cohen, R.D. 1985. Inhibition of gluconeogenesis and urea synthesis in isolated rat hepatocytes by acetazolamide. *Biochemical Society Transactions*, 13, 255
- Meyers, R.L., Orlando, R.C., 1992. *In Vivo* bicarbonate secretion by human esophagus. *Gastroenterology*, 103 (4), 1174-1178.
- Mezquita, P., Mezquita, C., Mezquita, J., 1999. Novel transcripts of carbonic anhydrase II in mouse and human testis. *Mol Hum Reprod*, 5 (3) 199-205.
- Montgomery, J.C., Venta, P.J., Eddy, R.L., Fukushima, Y.S., Shows, T.B., Tashian, R.E., 1991. Characterization of the human gene for a newly discovered carbonic-anhydrase, CA-VII, and its localization to chromosome-16. *Genomics*, 11 (4), 835-848.
- Montgomery, R., Thomas, W., Spector, A.A., 2000. *Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım. Çeviri Editörü : Nilgün Altan.*
- Moss, J., and Lane, M. D. (1971). The biotin-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 35: 321–442.
- Muhlhauser, J., Crescimanno, C., Rajaniemi, H., Parkkila, S., Milovanov, A.P., Castellucci, M., Kaufmann, P., 1994. Immunohistochemistry of carbonic-anhydrase in human placenta and fetal membranes. *Histochemistry*, 101 (2), 91-98.
- Murakami, H., Sly, W.S., 1987. Purification and characterization of human salivary carbonic-anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 262 (3), 1382-1388.

- Murakami, H., Marelich, G.P., Grubb, J.H., Kyle, J.W., Sly, W.S. 1987. Cloning, expression, and sequence homologies of cDNA for human carbonic anhydrase II. *Genomics*, 1 (2), 159-66.
- Murayama, K., Kimura, M., Yamaguchi, S., Shinka, T., and Kodama, K. (1997). Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 15-year-old girl. *Brain Dev.* 19: 303-305.
- N.K. Brewster, D.L. Val, M.E. Walker, J.C. Wallace, Regulation of pyruvate carboxylase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth, *Arch.*
- Nagao, Y., Platero, J.S., Waheed, A., Sly, W.S., 1993. Human mitochondrial carbonic-anhydrase - cDNA cloning, expression, subcellular-localization, and mapping to chromosome-16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (16), 7623-7627.
- Nagao, Y., Srinivasan, M., Platero, J.S., Svendrowski, M., Waheed, A., Sly, W.S., 1994. Mitochondrial carbonic-anhydrase (isozyme-V) in mouse and rat - cDNA cloning, expression, subcellular-localization, processing, and tissue distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (22), 10330-10334.
- Nakagawa, Y., Perentes, E., Rubinstein, L.J., 1987. Non-specificity of anti-carbonic anhydrase C antibody as a marker in human neurooncology. *J Neuropathol Exp Neurol*, 46 (4), 451-60.
- Nakai, H., Byers, M.G., Venta, P.J., Tashian, R.E., Shows, T.B., 1987. The gene for human carbonic anhydrase-II (CA2) is located at chromosome 8q22. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 44 (4), 234-235.
- Narisawa, K., Gibson, K. M., Sweetman, L., Nyhan, W. L., Duran, M., and Wadman, S. K. (1986). Deficiency of 3-methylglutaconylcoenzyme A hydratase in two siblings with 3-methylglutaconic aciduria. *J. Clin. Invest.* 77: 148-1152.
- Nishimori, I., 2004. Acatalytic CAs, Carbonic anhydrase related proteins, in *Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators* (Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.) pp 24-43, CRC Press, Boca Raton, FL
- Nishimori, I., Onishi, S., 2001. Carbonic anhydrase isozymes in the human pancreas. *Dig Liver Dis*, 33 (1), 68-74.
- Noda, Y., Sumitomo, S., Hikosaka, N., Mori, M., 1986. Immuno histochemical observations on carbonic anhydrase I and II in human salivary glands and submandibular obstructive adenitis. *J Oral Pathol*, 15 (4), 187-90.
- Nogradi, A., Kelly, C., Carter, N., 1993. Localization of acetazolamide-resistant carbonic anhydrase III in human and rat choroid plexus by immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Neurosci Lett*, 151 (2), 162-5.
- Nork, T.M., Wallow, I.H., Sramek, S.J., Stevens, T.S., De Venecia, G., 1990. Immunocytochemical study of an eye with proliferative vitreoretinopathy and retinal tacks. *Retina*, 10 (1), 78-85.
- Obata, K., Fukuda, T., Morishita, R., Abe, S., Asakawa, S., Yamaguchi, S., Yoshino, M., Ihara, K., Murayama, K., Shigemoto, K., Shimizu, N., Kondo, I., 2001. Human biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase gene (MCCA): cDNA sequence, genomic organization, localization to chromosomal band 3q27, and expression. *Genomics*, 72 (2), 145-52.

- O'Brien, P., Rosen, S., Trencisbuck, L., Silen, W., 1977. Distribution of carbonic-anhydrase within gastric-mucosa. *Gastroenterology*, 72 (5), 870-874.
- Ogawa, Y., Chang, C.K., Kuwahara, H., Hong, S.S., Toyosawa, S., Yagi, T., 1992. Immunoelectron microscopy of carbonic-anhydrase isozyme-VI in rat submandibular-gland - comparison with isozyme-I and isozyme-II. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 40 (6), 807-817.
- Ogawa, Y., Hong, S.S., Toyosawa, S., Kuwahara, H., Shimazaki, M., Yagi, T., 1993. Immunoelectron microscopy of Carbonic-anhydrase isozyme-VI in human submandibular-gland - comparison with isozyme-I and isozyme-II. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41 (3), 343-351.
- Oguni, M., Setogawa, T., Tanaka, O., Shinohara, H., Kato, K., 1992. Immunohistochemical study of carbonic anhydrase III in the extraocular muscles of human embryos. *Acta Anat (Basel)*, 144 (4), 316-9.
- Okamoto, N., Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taniuchi, K., Onishi, S., 2001. cDNA sequence of human carbonic anhydrase-related protein, CA-RP X: mRNA expressions of CA-RP X and XI in human brain. *Biochim Biophys Acta*, 1518 (3), 311-6.
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X.L., Sly, W.S., 1995. Carbonic-anhydrase .4. role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320 (2), 315-322.
- P.V. Attwood, J.C. Wallace, Chemical and catalytic mechanisms of carboxyl transfer reactions in biotin-dependent enzymes, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 113–120.
- Parkkila, S., Kaunisto, K., Kellokumpu, S., Rajaniemi, H., 1991. A high-activity carbonic-anhydrase isoenzyme (CA-II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry*, 95 (5), 477-482.
- Parkkila, S., Kaunisto, K., Rajaniemi, L., Kumpulainen, T., Jokinen, K., Rajaniemi, H., 1990. Immunohistochemical localization of carbonic-anhydrase isoenzyme-VI, isoenzyme-II, AND isoenzyme-I in human parotid and submandibular glands. *JouRNAl of Histochemistry & Cytochemistry*, 38 (7), 941-947.
- Parkkila, S., Parkkila, A.K., Lehtola, J., Reimila, A., Sodervik, H.J., Rannisto, M., Rajaniemi, H., 1997. Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 42 (5), 1013-1019.
- Parkkila, S., Parkkila, A.K., Vierjoki, T., Stahlberg, T., Rajaniemi, H., 1993. Competitive time-resolved immunofluorometric assay for quantifying carbonic anhydrase-VI in saliva. *Clinical Chemistry*, 39 (10), 2154-2157.
- Parkkila, A.K., Parkkila, S., Serlo, W., Reunanen, M., Vierjoki, T., Rajaniemi, H., 1994. A competitive dual-label time-resolved immunofluorometric assay for simultaneous detection of carbonic anhydrase-I and anhydrase-II in cerebrospinal-fluid. *Clinica Chimica Acta*, 230 (1), 81-89.
- Parkkila, A.K., Scarim, A.L., Parkkila, S., Waheed, A., Corbett, J.A., Sly, W.S., 1998. Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (38), 24620-24623.
- Parkkila, S., Parkkila, A.K., Juvonen, T., Rajaniemi, H., 1994. Distribution of the carbonic-anhydrase isoenzyme-I, Isoenzyme-II, and Isoenzyme-VI In the human allimentary-tract. *Gut*, 35 (5), 646-650.

- Parkkila, S., Parkkila, A.K., 1996. Carbonic Anhydrase in the alimentary tract - roles of the different isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31 (4), 305-317.
- Pastorekova, S., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Opavsky, R., Zelnik, V., Saarnio, J., Pastorek, J., 1997. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology*, 112 (2), 398-408.
- Peng, L., Hertz, L., Huang, R., Sonnewald, U., Petersen, S.B., Westergaard, N., Larsson, O., Schousboe, A., 1993. Utilization of glutamine and of TCA cycle constituents as precursors for transmitter glutamate and GABA. *Dev Neurosci*, 15 (3-5), 367-77.
- Perez-Cerda, C., Perez, B., Merinero, B., Desviat, L.R., Rodriguez-Pombo, P., Ugarte, M., 2004. Prenatal diagnosis of propionic acidemia. *Prenat Diagn*, 24 (12), 962-4.
- Puscas, I., Coltau, M., Baican, M., Pasca, R., Domuta, G., Hecht, A., 2001. Vasoconstrictive drugs increase carbonic anhydrase I in vascular smooth muscle while vasodilating drugs reduce the activity of this isozyme by a direct mechanism of action. *Drugs. Exp. Clin. Res*, 27 (2), 53-60.
- Puscas, I., Puscas, C., Coltau, M., Torres, J., Marquez, M., Herrero, E., Fillat, O., Ortiz, J.A., 1997. Studies on the protective effect of ebrotidine on experimental ulcers induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung*, 47 (4A), 565-8.
- Raisanen, S.R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rakkila, P., Harkonen, P.L., Vaananen, H.K., 1999. Carbonic Anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Faseb Journal*, 13 (3), 513-522.
- Register, A.M., Koester, M.K., Noltmann, E.A., 1978. Discovery of carbonic-anhydrase in rabbit skeletal-muscle and evidence for its identity with basic muscle protein. *Journal of Biological Chemistry*, 253 (12), 4143-4152.
- Ren, X.L., Lindskog, S., 1992. Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120 (1), 81-86.
- Renzi, G., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors, Topical sulfonamide antiglaucoma agents incorporating secondary amine moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10 (7), 673-676.
- Richardson, C.T., 1985. Pathogenic Factors in Peptic ulcer Disease. *American Journal of Medicine*, 79, 1-7.
- Rodriguez JM, Ruiz-Sala P, Ugarte M, Penalva MA 2004 Fungal metabolic model for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency *Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 4578-4587
- Rodwell, W. W. (1969). In "Metabolic Pathways" (D. M. Greenberg, Ed.), 3rd ed., Vol. 3, pp. 191-235, Academic Press, New York.
- Romero, E.E., Velazquez-Estades, L., Deo, R., Schapiro, B., and Roth, D.A., 1998. Cloning of Rat Vitamin K-Dependent γ -Glutamyl Carboxylase and Developmentally Regulated Gene Expression in Postimplantation Embryos. *Experimental Cell Research*, 243, (2), 334-346

- S. Jitrapakdee, G.W. Booker, A.I. Cassady, J.C. Wallace, The rat pyruvate carboxylase gene structure: alternate promoters generate multiple transcripts with 50-end heterogeneity, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 20520–20528.
- S. Jitrapakdee, J.C. Wallace, Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase, *Biochem. J.* 340 (1999) 1–16.
- S. Jitrapakdee, Q. Gong, M.J. MacDonald, J.C. Wallace, Regulation of rat pyruvate carboxylase gene expression by alternate promoters during development, in genetically obese rats and in insulin-secreting cells. Multiple transcripts with 50-end heterogeneity modulate translation, *J. Biol. Chem* 273 (1998) 34422–34428.
- Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Waheed, A., Casey, M.C., Zhou, X.Y., Pastorekova, S., Pastorek, J., Karttunen, T., Haukipuro, K., Kairaluoma, M.I., Sly, W.S., 1998. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity. *J Histochem Cytochem*, 46 (4), 497-504
- Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Waheed, A., Karttunen, T., Sly, W.S., 1999. Cell-specific expression of mitochondrial carbonic anhydrase in the human and rat gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem*, 47 (4), 517-24.
- Sanyal, G., Maren, T.H., 1981. Thermodynamics of carbonic-anhydrase catalysis - a comparison between human Isoenzyme-B and Isoenzyme-C. *JouRNAl of BIological ChemIstry*, 256 (2), 608-612.
- Sarawut Jitrapakdee, Mark G. Nezc, A. Ian Cassady, Yeesim Khew-Goodall,³ and John C. Wallace Molecular cloning and domain structure of chicken pyruvate carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 (2002) 387–393.
- Sasaki, K., Igarashi, S., Amasaki, T., Amasaki, H., Nishita, T., Kano, Y., Asari, M., 1993. Comparative immunohistolocalization of carbonic-anhydrase isozyme-I, isozyme-II and isozyme-III in the equine and bovine digestive-tract. *Histochemical JouRNAl*, 25 (4), 304-311.
- Sato, S., Zhu, X.L., Sly, W.S., 1990. Carbonic anhydrase isozymes IV and II in urinary membranes from carbonic anhydrase II-deficient patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (16), 6073-6.
- Sato, T., Kashima, K., Gamachi, A., Daa, T., Nakayama, I., Yokoyama, S., 2002. Immunohistochemical localization of pyruvate carboxylase and carbamyl-phosphate synthetase I in normal and neoplastic human pancreatic tissues. *Pancreas*, 25 (2), 130-5.
- Scholte, H.R., Busch, H.F., 1980. Early changes of muscle mitochondria in Duchenne dystrophy. Partition and activity of mitochondrial enzymes in fractionated muscle of unaffected boys and adults and patients. *J Neurol Sci*, 45 (2-3), 217-34.
- Sender, S., Decker, B., Fenske, C.D., Sly, W.S., Carter, N.D., Gros, G., 1998. Localization of carbonic anhydrase IV in rat and human heart muscle. *J Histochem Cytochem*, 46 (7), 855-61.
- Sender, S., Gros, G., Waheed, A., Hageman, G.S., Sly, W.S., 1994. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase IV in capillaries of rat and human skeletal muscle. *J Histochem Cytochem*, 42 (9), 1229-36.
- Shah, G.N., Hewett-Emmett, D., Grubb, J.H., Migas, M.C., Fleming R.E., Waheed, A., Sly, W.S., 2000. Mitochondrial carbonic anhydrase CA VB, differences in tissue

- distribution and pattern of evolution from those of CA VA suggest distinct physiological roles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (4), 1677-1682.
- Shamsutdinov, N.Sh., Islamov, R.I., Valuillin, V.V., 1991. [Carbonic anhydrase III--a marker of the myoepithelial cells of human salivary glands]. *Biull Eksp Biol Med*, 111 (3), 320-1.
- Shunnosuke Abe, Chhoun Chamnan, Kenichi Miyamoto, Yasutaka Minamino, and Makoto Nouda 2004. Isolation and Identification of 3-Methylcrotonyl Coenzyme A Carboxylase cDNAs and Pyruvate Carboxylase, and Their Expression in Red Seabream (*Pagrus major*) Organs. *Mar. Biotechnol.* 6, 527–540,
- Sjoblom, B., Elleby, B., Wallgren, K., Jonsson, B.H., Lindskog, S., 1996. Two point mutations convert a catalytically inactive carbonic anhydrase-related protein (CARP) to an active enzyme. *FEBS Letters*, 398 (2-3), 322-325.
- Skaggs, L.A., Bergenhem, N.C.H., Venta, P.J., Tashian, R.E., 1993. The deduced amino-acid-sequence of human carbonic anhydrase-related protein (CARP) is 98-percent identical to the mouse homolog. *Gene*, 126 (2), 291-292.
- Sly, W.S., Hewettemmett, D., Whyte, M.P., Yu, Y.S.L., Tashian, R.E., 1983. Carbonic anhydrase-II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular-acidosis and cerebral calcification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 80 (9), 2752-2756.
- Sly, W.S., Hu, P.Y., 1995. Human carbonic-anhydrases and carbonic-anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 375-401.
- Spicer, S.S., Ge, Z.H., Tashian, R.E., Hazenmartin, D.J., Schulte, B.A., 1990. Comparative distribution of carbonic-anhydrase isozyme-III and isozyme-II in rodent tissues. *American Journal of Anatomy*, 187 (1), 55-64.
- Spicer, S.S., Sens, M.A., Tashian, R.E., 1982. Immuno-cytochemical demonstration of carbonic-anhydrase in human epithelial-cells. *Journal of Histochemistry & cytochemistry*, 30 (9), 864-873.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P.A., Hurt, J.D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Silverman, D.N., Christianson, D.W., 1998. Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide, Molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein Science*, 7 (3), 556-563.
- Strisciuglio, P., Sartorio, R., Pecoraro, C., Lotito, F., Sly, W.S., 1990. Variable clinical presentation of carbonic-anhydrase deficiency - evidence for heterogeneity. *European Journal of Pediatrics*, 149 (5), 337-340.
- Strisciuglio, P., Hu, P.Y., LIm, E.J., Ciccolella, J., Sly, W.S., 1998. Clinical and molecular heterogeneity in carbonic anhydrase II deficiency and prenatal diagnosis in an Italian family. *Journal of Pediatrics*, 132 (4), 717-720.
- Sugrue, M.F., 2000. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research* 19 (1), 87-112.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., 2000. *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 867.

- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1, 61-97.
- Swenson, E.R., Leatham, K.L., Roach, R.C., Schoene, R.B., Mills, W.J., Hackett, P.H., 1991. Renal carbonic-anhydrase inhibition reduces high-altitude sleep periodic breathing. *Respiration Physiology*, 86 (3), 333-343.
- Sychrova, H., Braun, V., and Souciet, J., 1999. Molecular Cloning and Sequence Analysis of *Zygosaccharomyces rouxii* ADE2 Gene Encoding a Phosphoribosyl-aminoimidazole Carboxylase. *Yeast*, 15, 1399-1402
- Takeda, K., Nakamoto, M., Yasunaga, C., Nishihara, G., Matsuo, K., Urabe, M., Kitamura, M., Nozoe, T., 1997. Acute hemorrhagic gastritis associated with acetazolamide intoxication in a patient with chronic renal failure. *Clinical Nephrology*, 48 (4), 266-268.
- Taniuchi, K., Nishimori, I., Takeuchi, T., Fujikawa-Adachi, K., Ohtsuki, Y., Onishi, S., 2002. Developmental expression of carbonic anhydrase-related proteins VIII, X, and XI in the human brain. *Neuroscience*, 112 (1), 93-9.
- Tarun, A.S., Bryant, B., Zhai, W., Solomon, C., Shusterman, D., 2003. Gene expression for carbonic anhydrase isoenzymes in human nasal mucosa. *Chem Senses*, 28 (7), 621-9
- Tashian, R.E., 1992. Genetics of the mammalian carbonic-anhydrases. *Advances In Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine*, 30, 321-356.
- Tashian, R.E., 1989. The carbonic anhydrases - Widening perspectives on their evolution, expression and function. *Bioessays*, 10 (6), 186-192.
- Tie, J., Wu, S.M., Jin, D.Y., Nicchitta, C.V., Stafford, D.W., 2000. A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase. *Blood*, 96 (3), 973-978.
- Tsai, M. Y., Johnson, D. D., Sweetman, L., and Berry S. A. (1989). Two siblings with biotin-resistant 3-methylcrotonyl coenzyme A carboxylase deficiency. *J. Pediatr.* 115: 110-113.
- Tureci, O., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Gottert, E., Seitz, G., Parkkila, A.K., Shah, G.N., Grubb, J.H., Pfreundschuh, M., Sly, W.S., 1998. Human carbonic anhydrase XII, cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (13), 7608-7613.
- Vaananen, H.K., Autio-Harmainen, H. 1987. Carbonic anhydrase III: a new histochemical marker for myoepithelial cells. *J Histochem Cytochem*, 35 (6), 683-6.
- Vaananen, H.K., Carter, N.D., Dodgson, S.J., 1991. Immunocytochemical localization of mitochondrial carbonic-anhydrase in rat-tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39 (4), 451-459.
- Vaananen, H.K., Paloniemi, M., Vuori, J., 1985. Purification and localization of human carbonic-anhydrase 3 typing of skeletal-muscle fibers in paraffin embedded sections. *Histochemistry*, 83 (3), 231-235.
- Venta, P.J., Montgomery, J.C., Tashian, R.E., 1987. Molecular-genetics of carbonic-anhydrase isozymes, *Isozymes-Current Topics In Biological and Medical Research* 14, 59-72.

- Vuori, J., Rasi, S., Takala, T., Vaananen, K., 1991. Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneous detection of myoglobin and carbonic anhydrase III in serum. *Clin Chem*, 37 (12), 2087-92.
- Waheed, A., Zhu, X.L., Sly, W.S., Wetzel, P., Gros, G., 1992. Rat skeletal-muscle membrane-associated carbonic-anhydrase is 39-kda, glycosylated, gp1-anchored CA-IV. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294 (2), 550-556.
- Wahlstrand, T., Wistrand, P.J., 1980. Carbonic anhydrase C in the human renal medulla. *Ups J Med Sci*, 85 (1), 7-17.
- Wang QZ, Wu CY, Chen T, Chen X, Zhao XM 2006 Expression of galactose permease and pyruvate carboxylase in Escherichia coli ptsG mutant increases the growth rate and succinate yield under anaerobic conditions *BIOTECHNOLOGY LETTERS* 28 (2): 89-93 JAN
- Weinman, S.A., Reuss, L., 1982. NA⁺-H⁺ exchange at the apical membrane of necturus gallbladder - extracellular and intracellular pH studies. *Journal of General Physiology*, 80 (2), 299-321.
- Wexler, I.D., Du, Y., Lisgaris, M.V., Mandal, S.K., Freytag, S.O., Yang, B.S., Liu, T.C., Kwon, M., Patel, M.S., Kerr, D.S., 1994. Primary amino acid sequence and structure of human pyruvate carboxylase. *Biochim Biophys Acta*, 1227 (1-2), 46-52.
- Whitney, P.L., Briggles, T.V., 1982. Membrane-associated carbonic-anhydrase purified from bovine lung. *Journal of Biological Chemistry*, 257 (20), 2056-2059.
- Wistrand, P.J., 1981. The importance of carbonic anhydrase-B and anhydrase-C for the unloading of CO₂ by the human-erythrocyte. *Acta Physiologica Scandinavica*, 113 (4), 417-426
- Wistrand, P.J., Carter, N.D., Conroy, C.W., Mahieu, I., 1999. Carbonic anhydrase IV activity is localized on the exterior surface of human erythrocytes. *Acta Physiol Scand*, 165 (2), 211-8.
- Yoshio Kimura, Rina Miyake, Yushi Tokumasu, And Masayuki 2000, Sato Molecular Cloning and Characterization of Two Genes for the Biotin Carboxylase and Carboxyltransferase Subunits of AcetylCoenzyme A Carboxylase in *Myxococcus xanthus* *Journal Of Bacteriology*, Oct. p. 5462-5469
- Zavada, J., Zavadova, Z., Zat'ovicova, M., Hyrsi, L., Kawaciuk, I., 2003. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer*, 89 (6), 1067-71.
- Zhang, J., W. L. Xia, K. Brew, and F. Ahmad. 1993. Adipose pyruvate carboxylase: amino acid sequence and domain structure deduced from cDNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1766-1770.
- Zhu, X.L., Sly, W.S., 1990. Carbonic anhydrase IV from human lung. Purification, characterization, and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney. *J Biol Chem*, 265 (15), 8795-801.

ÖZGEÇMİŞ

1980 Yılında Ardahan’da doğdu. İlkokul 1.ve 2. sınıfını Çankırı’da okuduktan sonra ailesiyle Gebze’ye yerleşti. Ortaokul ve liseyi Gebze’de tamamladıktan sonra 2000 yılında girdiği Atatürk üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2004 yılında ‘2000-2004 dönemi Fen-Edebiyat Fakültesi Birincisi’ olarak mezun oldu. 2004 Ekim ayında Yüksek lisans öğrenimine başladığı Atatürk üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Aralık ayında Araştırma görevliliğine atandı. Halen aynı kurumda görevine devam etmektedir.