

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**MAYA KARBONİK ANHİDRAZİNİN EKSPRESYONU,
SAFLAŞTIRILMASI, ELEKTROFORETİK VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Semra IŞIK

Balıkesir, Kasım - 2008

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

MAYA KARBONİK ANHİDRAZİNİN EKSPRESYONU,
SAFLAŞTIRILMASI, ELEKTROFORETİK VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Semra IŞIK

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Oktay ARSLAN
İkinci Danışman: Doç.Dr. Feray KÖÇKAR

Sınav Tarihi : 07.11.08

Jüri Üyeleri : Prof.Dr. Leman TARHAN (DEÜ)

Prof.Dr. Şule PEKYARDIMCI (AÜ)

Prof.Dr. Oktay ARSLAN (Danışman-BAÜ)

Doç.Dr. Turgut KILIÇ (BAÜ)

Yard.Doç.Dr. Selma SİNAN (BAÜ)

Balıkesir, Kasım - 2008

“Bu doktora çalışması Balıkesir Üniversitesi 2007 / 47 No’lu Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.”

ÖZET

MAYA KARBONİK ANHİDRAZININ EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI, ELEKTROFORETİK VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Semra IŞIK

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

(Doktora Tezi / Tez Danışmanı: Prof.Dr. Oktay ARSLAN)
(İkinci Danışman: Doç.Dr. Feray KÖÇKAR)

Balıkesir, 2008

Karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) CO₂ molekülünün hidratasyonunu ve HCO₃⁻ iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen, Zn²⁺ iyonu içeren bir metaloenzimdir. Bütün bilinen CA'lar α , β , γ , δ ve ϵ -CA olmak üzere beş CA gen ailesi olarak sınıflandırılmıştır. Maya CA enziminin de ait olduğu β -CA sınıfının izoformları, yüksek bitkilerde ve siyanobakterileri de içeren alglerde yaygındır. β -CA'lar genellikle 2-6 monomerden oluşan oligomerlerdir.

Bu çalışmada, bazı klinik sülfonamitlerin Maya CA üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla maya genomik DNA'sı izole edilerek PCR'a dayalı teknik ile NCE103 geni çoğaltılmıştır. Bu gen pGEM-T vektörüne ve daha sonra pET21a ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Maya CA enziminin ekspresyonu *E.coli* BL21(DE3) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hücre ekstraktından Maya CA enzimi Jel Filtrasyon Kromatografisi ile saflaştırılmış ve enzimin saflığı Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi ve inhibisyon çalışmaları Stop-Flow cihazı ile yapılmıştır. Klinik amaçlı kullanılan 15 farklı sülfonamit türevlerinin Maya CA'ya karşı inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Bu amaçla her bir bileşik için IC₅₀ (%50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu) değeri saptanmıştır. Bu değerler sırasıyla; Asetazolamid için 8.27x10⁻⁸ M, Metazolamid için 8.61 x 10⁻⁶ M, Etokszolamid için 5.41 x 10⁻⁶ M, Diklorfenamid için 5.73 x 10⁻⁶ M, Dorzolamid için 7.35 x 10⁻⁶ M, Brinzolamid için 7.58 x 10⁻⁶ M, Benzolamid için 7.37 x 10⁻⁶ M, Topiramid için 7.35 x 10⁻⁶ M, Sulpirid için 8.74 x 10⁻⁶ M, İndisulam için 8.93 x 10⁻⁶ M, Zonisamid için 6.29 x 10⁻⁶ M, Valdekoksib için 1.04 x 10⁻⁵ M, Selekoksib için 7.41 x 10⁻⁶ M, Sulthiam için 1.51 x 10⁻⁵ M, Sakarin için 6.43 x 10⁻⁴ M olarak tespit edilmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER : Karbonik anhidraz, β -CA, maya CA, klonlama, ekspresyon, inhibisyon, sülfonamid

ABSTRACT

EXPRESSION AND PURIFICATION OF YEAST CARBONIC ANHYDRASE AND INVESTIGATION OF ITS ELECTROPHORETIC AND KINETIC PROPERTIES

Semra IŞIK

Balikesir University, Institute of Science, Department of Chemistry

(PhD. Thesis / Supervisor : Prof. Dr. Oktay ARSLAN)
(CoSupervisor: Assoc. Prof. Dr. Feray KÖÇKAR)
Balikesir-Turkey, 2008

Carbonic anhydrase (CA, EC 4.2.1.1) is a Zn^{2+} containing metalloenzyme which catalyses the reversible hydration of CO_2 to the bicarbonate ion. All known CAs can be grouped in five evolutionarily unrelated CA families designated α -, β -, γ -, δ -, ϵ -CA. β -CAs, in which yeast CA belongs, are common in higher plants and algae including cyanobacteria. β -CAs are usually oligomers, generally formed of two to six monomers.

In this study the inhibition effects of some clinical sulfonamides on yeast CA were investigated. For this purpose yeast genomic DNA was isolated and NCE103 gene was amplified by PCR based strategy. NCE103 gene was cloned into pGEM-T vector and subsequently into pET21a expression vector. The expression of yeast CA was performed in *E.coli* BL21(DE3). Yeast CA was purified by Gell Filtration Chromatography. The purity of enzyme was determined by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Enzyme activity and inhibition studies were performed by Stop Flow spectrophotometer. The inhibition effects of 15 clinically used sulfonamides on yeast CA were investigated.

Inhibition for yeast CA was calculated as IC_{50} value. IC_{50} values were determined as 8.27×10^{-8} M (mol/L) for Acetazolamide, 8.61×10^{-6} M for Metazolamide, 5.41×10^{-6} M for Ethoxzolamide, 5.73×10^{-6} M for Dichlorophenamide, 7.35×10^{-6} M for Dorzolamide, 7.58×10^{-6} M for Brinzolamide, 7.37×10^{-6} M for Benzolamide, 7.35×10^{-6} M for Topiramate, 8.74×10^{-6} M for Sulpiride, 8.93×10^{-6} M for Indisulam, 6.29×10^{-6} M for Zonisamide, 1.04×10^{-5} M for Valdecoxib, 7.41×10^{-6} M for Selexcoib, 1.51×10^{-5} M for Sulthiame and 6.43×10^{-4} M for Saccharin respectively.

KEY WORDS: Carbonic anhydrase, β -CA, yeast CA, clonning, expression, inhibition, sulfonamide

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER

ii

ABSTRACT, KEYWORDS

iii

İÇİNDEKİLER

iv

SEMBOL LİSTESİ

viii

ŞEKİL LİSTESİ

ix

ÇİZELGE LİSTESİ

xii

ÖNSÖZ

xiv

1. GİRİŞ

1

1.1 Karbonik Anhidrazların Dağılımı

3

1.2 CA Ailesinin Sınıflandırılması

4

1.2.1 α -Sınıfı CA

5

1.2.2 β -Sınıfı CA

6

1.2.3 γ -Sınıfı

8

1.3 Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Fonksiyonları

8

1.4 Karbonik Anhidrazların Katalitik Mekanizması

10

1.5 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

13

1.5.1 Asetazolamid

15

1.5.2 Metazolamid

15

1.5.3 Etokszolamid

16

1.5.4 Benzolamid

16

1.5.5 Diklorfenamid

16

1.5.6 Dorzolamid

17

1.5.7 Brinzolamid

17

1.5.8 Sulthiam

18

1.5.9 İndisulam

18

1.5.10 Sakarin

19

1.5.11 Sulpirid

19

1.5.12 Zonisamid

20

1.5.13 Selekoksib

20

1.5.14 Valdekoksib	21
1.5.15 Topiramet	21
1.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
1.7 Çalışmanın Amacı	25
2. MATERYAL VE METOD	26
2.1 MATERYAL	26
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	26
2.1.3 Maya, Bakteriyel Soylar ve Plazmidler	27
2.1.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	29
2.1.4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> için Maya Kültür Ortamları	29
2.1.4.2 <i>E.coli</i> için Bakteriyel Kültür ortamları	29
2.1.4.3 Antibiyotik Hazırlanması	29
2.1.4.4 Maya Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar	29
2.1.4.5 Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar	30
2.1.4.6 Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit	31
2.1.4.7 Agaroz Jel Elektroforez Tamponu	31
2.1.4.8 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlama Çözeltileri	31
2.1.4.9 Protein Ekspresyonu ve Lizis için Kullanılan Tamponlar	32
2.1.4.10 Afinite Jeli Sentezinde Kullanılan Tamponlar	33
2.1.4.11 Afinite Kromatografisinde Kullanılan Tamponlar	34
2.1.4.12 CO ₂ - Hidrataz Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar	35
2.1.4.13 Jel Filtrasyon Kromatografisinde Kullanılan Tamponlar	36
2.1.4.14 CA-CO ₂ Hidrataz EnzimAktivitesi için Kullanılan Tamponlar	36
2.1.4.15 SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Tamponlar	37
2.2 METOD	40
2.2.1 Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması	40
2.2.2 DNA ile İlgili Teknikler	40
2.2.2.1 Maya Genomik DNA İzolasyonu	40
2.2.2.2 Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu ve Etanol Çöktürmesi	41
2.2.2.3 DNA Miktarı ve Kalitesinin Ölçülmesi	41
2.2.2.3.1 Spektrofotometrik Yöntem	41
2.2.2.3.2 Agaroz Jel Elektroforez	41

2.2.2.4 Primer Tasarımı	42
2.2.2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)	42
2.2.2.6 pGEM-T Vektörüne NCE103 Geninin Klonlanması	43
2.2.2.7 Dizi Analizi	44
2.2.2.8 Plazmid DNA İzolasyonu (Alkalin Lizis Plazmid Miniprep)	44
2.2.2.8.1 <i>E.Coli</i> 'den Mini Prep Kiti ile Plazmid DNA İzolasyonu	45
2.2.2.9 NCE103 Geninin pET21a Vektörüne Klonlanması	45
2.2.2.10 Agaroz Jelde Yürütülen Vektör ve Genlerin Geri Kazanılması	45
2.2.3 Mikrobiyolojik Metotlar	45
2.2.3.1 Ön Kültür Hazırlanması	45
2.2.3.2 Bakteri Stoklarının Korunması	46
2.2.3.3 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlanması	46
2.2.3.4 Transformasyon	47
2.2.3.5 Rekombinant Protein Ekspresyonu	47
2.2.3.5.1 IPTG Kullanılarak Hedef Proteinin İndüklenmesi	47
2.2.3.5.2 Bakterilerin Yıkınması	47
2.2.3.5.3 Bakteri hücrelerinin Lizisi	48
2.2.4 Biyokimyasal Metodlar	48
2.2.4.1 Afinite Kromatografisi	48
2.2.4.1.1 Karbonik Anhidraz Afinite Jelinin Hazırlanması	48
2.2.4.1.2 Enzim Çözeltilisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu	50
2.2.4.2 CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi	51
2.2.4.3 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	52
2.2.4.4 Jel Filtrasyon Kromatografisi	52
2.2.4.5 Kalitatif Protein Tayini	53
2.2.4.6 CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi (Stop Flow Kinetik Cihazı ile)	53
2.2.4.7 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	54
2.2.4.8 İnhibitörler için IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	55
3. BULGULAR	58
3.1. Maya Genomik DNA'sı	58
3.2 Primer Tasarımı	59
3.3 PCR	60

3.4. NCE103 Geninin pGEM-t Vektörüne Klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye Transformasyonu	61
3.5 Dizi Analizi	63
3.6 NCE103 Geninin pET21a Vektörüne Klonlanması ve <i>E.coli</i> 'ye Transformasyonu	66
3.7 Maya CA'nın Ekspresyonu ve Saflaştırılması	67
3.7.1 Maya CA'nın Ekspresyonu	67
3.8 Afinite Kromatografisi	69
3.9 Jel Filtrasyon Kromatografisi	70
3.10 Bazı CA İnhibitörleri ile Maya CA'nın İnhibisyonu	71
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	81
5. EKLER	88
6. KAYNAKLAR	90

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
CA	Karbonik anhidraz
YPD	Yeast Pepton Dekstroz
LB	Luria Broth
DNA	Deoksiribonükleikasit
RNA	Ribonükleikasit
EDTA	Etilendaimin tetraasetikasit
EGTA	Etilenglikol tetraasetikasit
IPTG	İzopropil β -D-Tiogalaktopiranozit
PMSF	Fenilmetilsülfonil Florür
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	Poliakrilamit Jel Elektroforezi
RPM	Dakikadaki Dönüş Sayısı
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Raksyonu
TEMED	N,N,N',N',-tetrametil etilendiamin
HEPES	4-hidroksietil-1-piperazinetansülfonikasit
EC	Enzim kod numarası
hCA I	İnsan Karbonik Anhidraz I İzoenzimi
hCA II	İnsan Karbonik Anhidraz II İzoenzimi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No:
Şekil 1.1 Bazı CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonları	4
Şekil 1.2 CA II izoenziminin: A. aktif bölge, B. CA II'nin üç boyutlu yapısı	6
Şekil 1.3 <i>P. Purpureum</i> CA enziminin aktif bölgesindeki Zn^{2+} atomunun koordinasyonu	7
Şekil 1.4 Bazı β -CA'lara ait üç boyutlu yapıları: A. <i>P. purpureum</i> - 62.1 kDa (doğal yapısında bir tetramer), B. <i>P. sativum</i> - 193.6 kDa (doğal oktamerin dimerik ünitesi), C. <i>M. thermoautotrophicum</i> - 75.6 kDa (doğal tetramerin dimerik ünitesi), D. <i>E.coli</i> - 98.8 kDa (doğal tetramerin dimerik ünitesi)	7
Şekil 1.5 A. <i>Methanosarcina thermophila</i> CA'sı, 69 kDa (homotrimer), B. Cam aktif bölgesinde metal ligasyonu	8
Şekil 1.6 Karbonik Anhidraz Enziminin CO_2 -Hidrataz Mekanizması	11
Şekil 1.7 β -CA'ların Zn(II) koordinasyonunun gösterimi: A: <i>P.purpureum</i> ve <i>E.coli</i> , B: <i>P. sativum</i> kloroplast ve <i>M. thermoautotrophicum</i> enzimi	12
Şekil 1.8 Prokaryotik β -CA'lar için önerilen katalitik mekanizma (<i>P.purpureum</i> enzim numaralandırması)	13
Şekil 1.9 Karbonik anhidrazın inhibisyonunun mekanizması. A- sülfonamid ile, B- anyonik inhibitörler ile	14
Şekil 1.10 <i>S. cerevisiae</i> 'nin yaşam döngüsü	23
Şekil 1.11 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> maya hücreleri	25
Şekil 2.1 pGEM-T Vektör Haritası	28
Şekil 2.2 pET21a(+) Vektör Haritası	28
Şekil 2.3 Afinite jeli sentezinin şematik gösterimi	50
Şekil 2.4 SF cihazının diagramı	53
Şekil 2.5 SF cihazının fotoğrafı	54
Şekil 3.1 a)Maya Genomik DNA'sı. M marker, 1-4 DNA örnekleri b) Yıkama sonrası Maya Genomik DNA'sı. M marker, 5-6 yıkanmış DNA.	58
Şekil 3.2 Primerlerinin saç tokası oluşturmaları . a) Forward primer, b) Reverse primer	60
Şekil 3.3 PCR sonucu oluşan ürün; 1. ve 5. Marker, 2. ve 3. PCR ürünü, 4. PCR negatif kontrol.	61
Şekil 3.4 Transformasyon sonrası oluşan mavi beyaz koloniler.	62
Şekil 3.5 a)Mini Prep Kiti ile pGEM-T + NCE103 plazmidinin izolasyonu; M. 1 kb'lık Marker, 1. ve 2. pGEM-T + NCE103 plazmidi. b) M. 1kb'lık Marker, 3. BamH I ve Sac I enzimleri ile kesilen pGEM-	62

T+NCE103 plazmidinden, Jel Ekstarksiyon Kiti ile geri kazanılan kesilmiş NCE103 geni.	
Şekil 3.6 NCE103 geninin aminoasit dizisine çevrilmesi	64
Şekil 3.7 NCE103 geni ile dizi analizinden gelen Maya CA dizisinin karşılaştırılması	64
Şekil 3.8 Maya CA'nın <i>Candida albicans</i> ve <i>Candida glabrata</i> ile multiple alignment	65
Şekil 3.9 M. Marker, 1. pGEM-T + NCE103 plazmidinin izolasyonu, 2. pET21a vektörü izole edilmiş, 3. ve 4. pGEM-T + NCE103 kesim sonucu, 5. ve 6. pET21a kesim sonucu, 7. pGEM-T + NCE103 plazmidinin izolasyonu – 2. elüsyon	66
Şekil 3.10 M. Marker, 1. , 2. ve 3. sırası ile 1 , 1.1 ve 2 numaralı örneklerden izole edilen pET21a + NCE103 plazmidinin kesim sonuçları.	67
Şekil 3.11 IPTG uygulaması ile rekombinant proteinlerin ekspresyonu	68
Şekil 3.12 M. Marker, 1. 1mM IPTG ile indüklenmiş ekstrakt, 2. indüklenmemiş ekstrakt , 3. saf hCAI ve 4. saf HCAII	69
Şekil 3.13 Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan Maya CA enziminin grafiği	69
Şekil 3.14 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile ayrılan proteinlerin absorbansları	70
Şekil 3.15 JFK ile ayrılan proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü. 2-8 fraksiyonlar, M Marker	71
Şekil 3.16 Asetazolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	72
Şekil 3.17 Metazolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	72
Şekil 3.18 Etokszolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	73
Şekil 3.19 Diklorfenamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	73
Şekil 3.20 Dorzolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	74
Şekil 3.21 Brinzolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	74
Şekil 3.22 Benzolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	75
Şekil 3.23 Topiramet inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	75
Şekil 3.24 Sulpirid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	76
Şekil 3.25 Indisulam inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	76
Şekil 3.26 Zonisamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	77
Şekil 3.27 Valdekoksib inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	77
Şekil 3.28 Selekoksib inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	78

Şekil 3.29 Sulthiam inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	78
Şekil 3.30 Sakarin inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	79
Şekil 4.1 Sülfonamid bileşiklerinin Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon dağılımları	85
Şekil A.1 Maya CA genini kesmeyen enzimler	88
Şekil A.2 1kb DNA Marker	89
Şekil A.3 Protein Marker	89

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No:

Çizelge 1.1 Yüksek omurgalılarda α -CA izoenzimleri, onların nispi CO ₂ hidrataz aktiviteleri, sülfonamid inhibitörlerine karşı afiniteleri ve hücre içindeki yerleşimleri	2
Çizelge 2.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	26
Çizelge 2.2 Maya Hücre Duvarını Parçalamak için Kullanılan Tampon	29
Çizelge 2.3 Maya genomik DNA izolasyonu için Lizis Tamponu	30
Çizelge 2.4 Solüsyon I	30
Çizelge 2.5 Solüsyon II	30
Çizelge 2.6 Solüsyon III	31
Çizelge 2.7 0.5X TBE (Tris-Borat-EDTA) Tampon	31
Çizelge 2.8 Kompetent Hücre için Kullanılan Solüsyon (DH5 α <i>E.coli</i> soyu için)	31
Çizelge 2.9 Kompetent Hücre İçin Kullanılan Uygulama tamponu (BL-21 <i>E.coli</i> soyu için)	32
Çizelge 2.10 Bakteri Yıkama tamponu:	32
Çizelge 2.11 Lizis Tamponu : 20mM Tris / 0.5mM EDTA / 0.5mM EGTA (pH:8.7)	32
Çizelge 2.12 100mM PMSF (=100X , PMSF Stok çözelti)	33
Çizelge 2.13 0.1 M NaHCO ₃ , pH: 10.0 Tamponu:	33
Çizelge 2.14 0.2 M NaHCO ₃ , pH: 8.8 Tamponu:	33
Çizelge 2.15 0.05 M Tris-SO ₄ , pH: 7.5 Tamponu:	34
Çizelge 2.16 Dengeleme Tamponu: 25mM Tris-HCl/22mM Na ₂ SO ₄ /0.05mM EDTA (pH:8.7)	34
Çizelge 2.17 Jel Yıkama Tamponu: 25mM Tris-HCl/22mM Na ₂ SO ₄ /0.05mM EDTA (pH:8.7)	34
Çizelge 2.18 Afinite Jeli Elüsyon Tamponu : 0.1 M NaCH ₃ COO / 0.5 M NaClO ₄ (pH:5.6)	35
Çizelge 2.19 CO ₂ Hidrataz Aktivite Tamponu: 0.15 M Na ₂ CO ₃ / 0.1 M NaHCO ₃ (pH:10)	35
Çizelge 2.20 CO ₂ Hidrataz Aktivitesi - İndikatör Çözeltisi:	35
Çizelge 2.21 CO ₂ Hidrataz Aktivitesi - CO ₂ Çözeltisi :	36
Çizelge 2.22 Sephadex G-100 polimer materyalinin şişirilmesi ve kolonda uygulanan tampon:	36
Çizelge 2.23 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu	37
Çizelge 2.24 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:	37

Çizelge 2.25 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı:	38
Çizelge 2.26 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi:	39
Çizelge 2.27 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile su	39
Çizelge 2.28 PCR Reaksiyonu	43
Çizelge 2.29 PCR Koşulları	43
Çizelge 2.30 Ligasyon reaksiyonu	44
Çizelge 2.31 Maya CA inhibisyonunda kullanılan inhibitörler	56
Çizelge 3.1 Maya CA primerleri	59
Çizelge 3.2 Maya CA'nın diğer β -CA yapıları ile karşılaştırılması	63
Çizelge 3.3 İnhibitörlerin Maya CA enzimi üzerindeki IC ₅₀ değerleri	80

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel aşamaların ilk kısmı Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya laboratuvarlarında, ikinci kısmı İtalya/Floransa Üniversitesi Bioorganik Kimya laboratuvarında yapılmış olup, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve dekanı Prof. Dr. Oktay ARSLAN ve Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Feray KÖÇKAR danışmanlığında sonuçlanmıştır.

Tez çalışmalarım sırasında engin bilgi ve tecrübeleriyle beni yetiştiren ve bana yol gösteren değerli hocam Prof.Dr. Oktay ARSLAN 'a ve doktora tezimin bütün aşamalarında beni yönlendiren, maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Feray KÖÇKAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunarak bilimsel destek ve ilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof.Dr. Leman TARHAN ve Prof.Dr. Mahir ALKAN'a şükranlarımı sunarım.

Çalışmamda kullandığım maya soyunu temin eden Almanya Johann Wolfgang Goethe-Üniversitesi Frankfurt Mikrobiyoloji Enstitüsü'nden Dr. Karl D. Entian'a ve İtalya'daki deneysel çalışmalarında beni destekleyen Dr. Claudiu T. SUPURAN'a, Dr. Alessio INNOCENTI ve Yard.Doç.Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e teşekkür ederim.

Yoğun laboratuvar çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Meltem AYDIN, Serap BEYAZTAŞ, Sümeyye AYDOĞAN, Öznur SUAKAR, Ayşegül ŞAHİN, Nurcan DEDEOĞLU ve bütün üniversite hayatım boyunca desteğim olan Arzu GÜMÜŞ'e teşekkür etmek isterim.

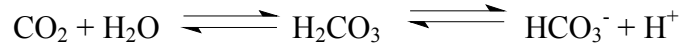
Bugünlere gelmemi sağlayan, bütün eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, bütün sıkıntılı anlarımda yalnız bırakmayan ve beni ayakta tutan sevgili anneme, babama, ağabeyime ve ablama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, Kasım 2008

Semra IŞIK

1. GİRİŞ

Karbonik anhidraz (CA), bütün organizmalarda bulunan Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimdir (Karbonat Hidroliyz E.C.4.2.1.1). İlk olarak, sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz, canlılarda CO_2 molekülünün hidratasyonunu ve HCO_3^- iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen bir enzimdir [1,2].



Bütün bilinen CA'lar, α - , β - , γ - , δ - ve ϵ -CA olmak üzere beş CA gen ailesi olarak sınıflandırılmıştır[3-7]. α -sınıfının birçok izoformu bütün omurgalı dokularda bulunur. Bunun dışında, β -sınıfının izoformları, yüksek bitkilerde ve siyanobakterileri de içeren alglerde yaygındırlar. β ve γ izoformları, başta bakteriler olmak üzere prokaryotların geniş bir aralığında bulunur. Tek δ -CA, marine diatom *Thalassosira weissfloggi*'de saptanmıştır [8-10]. ϵ -sınıfının temsilcisi son zamanlarda kemolitotrofik bakteride keşfedilmiştir [7].

Detaylı kinetik ve yapısal çalışmalar sadece α - , β - , γ - ve δ -CA'lar için bulunmaktadır [6,9,11]. Bağımsız orijinlerine rağmen bu sınıflar yaygın olarak katalitik aktivite için önemli olan aktif bölgelerinde bir Zn^{2+} iyonu içerirler. Ayrıca, tüm türlerin reaksiyon mekanizmalarının benzer olması da dikkat çekmektedir. Söz konusu mekanizmaya göre reaksiyon iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak, enzimin aktif bölgesinde bulunan çinkoya bağlı bir hidroksit iyonunun karbon dioksit nükleofilik atağını kapsar. İkinci basamak ise çinkoya bağlı su molekülünün iyonlaşması ve bir protonun aktif bölgeden taşınması ile aktif bölgenin rejenerasyonudur [6].

İnsanları da kapsayan yüksek omurgalılarda, çok farklı hücresel yerleşimler ve doku dağılımları ile, 16 farklı α -CA izoenzimi veya CA-ilişkili protein (CARP) saptanmıştır (Çizelge 1.1, Şekil 1.1). Beş tane sitozolik formu (CA I, II, III, VII ve

XIII), beş tane membrana bağlı (CA IV, IX, XII, XIV ve XV), iki mitokondriyal form (CA VA ve VB) ve bir salgı CA izoenzimi CA VI (tükürük ve süte) vardır. Ayrıca çekirdekte bir tane NonO/p54^{nrb} formu tespit edilmiştir [12,13]. Ek olarak CA gen ailesine ait olan üç tane CA-ilişkili protein (CARP) vardır [14].

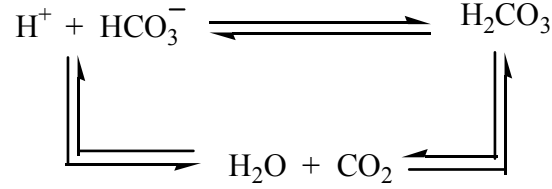
Çizelge 1.1 Yüksek omurgalılarda α -CA izoenzimleri, onların nispi CO₂ hidrataz aktiviteleri, sülfonamid inhibitörlerine karşı afiniteleri ve hücre içindeki yerleşimleri [12].

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

* pH 7,4'te orta derece, pH 8,2 veya daha yüksekte yüksek aktivite. □ doğal CARP proteinleri Zn(II) içermezler, bundan dolayı onların sülfonamidlere karşı afiniteleri ölçülememiştir.

Eritrosit CA'sının en önemli fonksiyonu, doku kılcal damarlarında, metabolizma ürünü olan CO₂'i H₂CO₃'e, akciğer pulmoner kapilerde ise H₂CO₃'in

CO₂'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek, solunum olayında yer almaktadır. Katalizlenen reaksiyon şekildeki gibidir.



Böbrek tubüllerinde ise, aynı reaksiyonlarla, Na⁺ ve H₂O geri emilimini sağlamaktadır. Diğer dokularda da yine yukarıdaki reaksiyonlarda belirtildiği gibi, CO₂ transferini, ya da H⁺ iyonu birikimini temin ederek, hücre için gerekli ortamı meydana getirir. Nitekim omurgalıların kan ve hücreler arası sıvısındaki en önemli tampon bikarbonat tampon sistemidir [15,16].

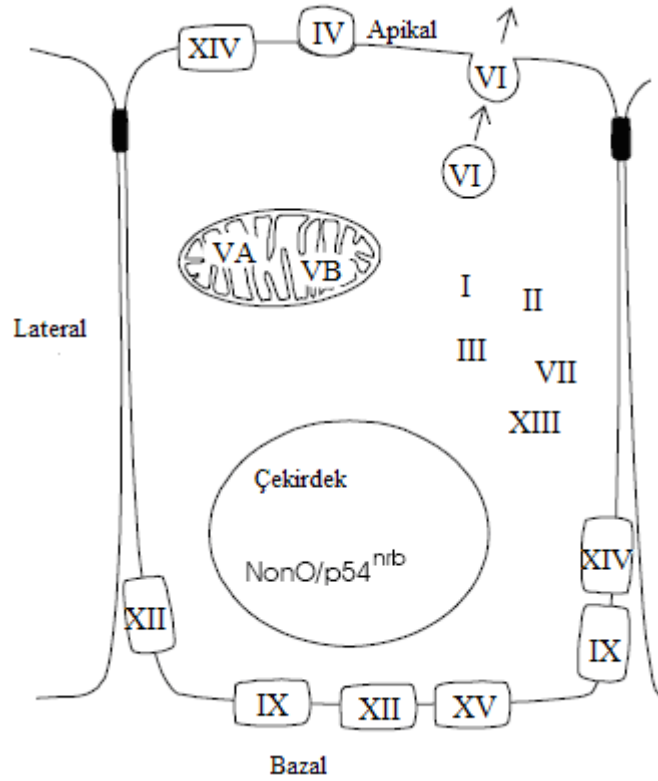
1.1 Karbonik Anhidrazların Dağılımı

Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucu, prokaryotların çoğunda CA'ların varlığı ortaya çıkmıştır. Prokaryotlarda bu enzimlerin solunum, CO₂'in taşınması ve fotosentez gibi önemli fonksiyonlara sahip olduğu saptanmıştır [5]. Pek çok bakteri türünden α-, β- ve γ-CA'ları saflaştırılmıştır. Örneğin, *Neisseria spp.*, *E.coli*, *Synechocystis spp.*, *Asetobacterium woodi*, *Anabaena variabilis* ve *Rhodospirillum rubrum*'da [5,17-19]. Patojenik bakteri olan *Helicobacter pylori* ve *Neisseria gonorrhoeae*'den bazı α-CA'ların saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır [18-20]. Krunkrai ve ark. malaraya neden olan *Plasmodium falciparum* protozoanında iki farklı α-CA'nın varlığını keşfetmişlerdir [21]. Heinhorst ve ark. *Halothiobacillus neapolitanus*'tan CA saflaştırmışlar ve karakterizasyonunu yapmışlardır [22].

Yüksek bitkiler, algler ve siyanobakterilerde üç CA ailesinin bütün üyeleri bulunmaktadır. Örn: *Arabidopsis* verilerinin analizi, bu bitkide en az 14 farklı CA enziminin varlığını göstermektedir [23]. Alglerde, CA'lar mitokondri, kloroplast tilakoidi, sitoplazma ve periplazmik boşlukta bulunurlar [23-25]. Archaeon

Methanosarcina thermophila'dan, kırmızı alg olan *Porphyridium purpureum* ve dikotil bir bitki olan *Pisum sativum*'dan CA izoenzimleri saflaştırılmıştır [26-28].

İnsanlardaki CA'nın tüm izoformları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Tavşan, rat, balık, maymun, deve kuşu, sığır CA'ları saflaştırılmış ve bu enzimlerin bazı özellikleri incelenmiştir [29-32].



Şekil 1.1 Bazı CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonları [34].

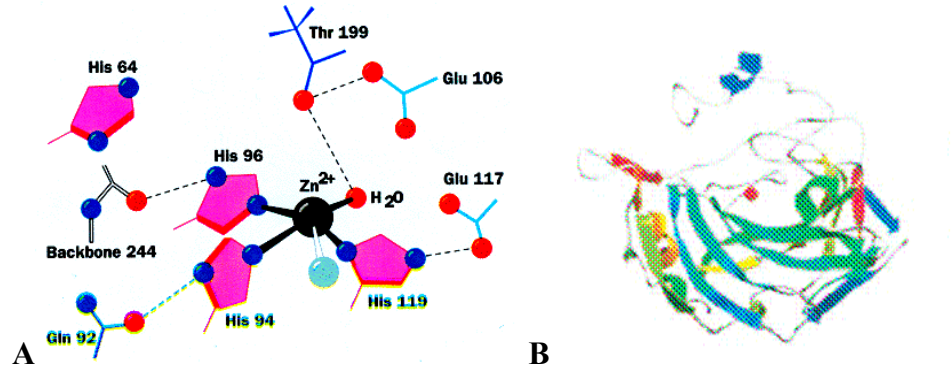
1.2 CA Ailesinin Sınıflandırılması

Memeli ve bitki enzimlerinin dizi analizleri ve kristal yapılarının karşılaştırılması sonucu söz konusu izoenzimlerin belirli oranda farklı oldukları ve α - , β - , γ - , δ - ve ε -sınıfı şeklinde sınıflandırıldığı literatürde anlaşılmaktadır. Bu sınıfların önemli bölgelerde aminoasitlerinin farklı olması, katlanmalarının ve dolayısıyla yapılarının da farklı olmasına sebep olmaktadır. Ancak yukarıda

belirtildiği gibi aktif bölgelerinde Zn^{2+} atomu içermesi ve reaksiyon mekanizmasının aynı olması son derece ilginçtir. Bütün bunlara rağmen CA'nın canlı organizmalardaki dağılımı tam olarak aydınlatılmamış bir konudur. Bitkilerde CA'ların ilk üç ailesinin hepsi bulunmaktadır, *Arabidopsis thaliana* genomunda üçünün de bulunması gibi. *Chlamidomonas reinhardtii*'de α -CA ve β -CA'nın bulunduğu bilgisi de bir örnektir [23,35].

1.2.1 α -Sınıfı CA

Katalizin mekanizması bakımından şimdiye kadar en iyi çalışılan ve en yaygın dağılımı olan sınıfıdır. α -CA'lar hayvanlar, bitkiler, eubakterilerde ve virüslerde tespit edilmiştir. α -CA'ların yıllarca hayvanlarda bulunduğu bilinmesine rağmen, son zamanlarda bitkilerde de bulunmuştur. İnsanlarda 16 farklı α -CA izoenzimi veya CA aktivitesi olmayan CA-ilişkili proteinler (CARP) saptanmıştır. X-ray kristalografik veriler, metal iyonunun $15^\circ A$ derinliğindeki aktif bölgede bulunduğunu gösterir. Enzimatik olarak aktif olan bütün CA'larda Zn^{2+} iyonu üç histidin rezidüsü ve bir su molekülü/hidroksil iyonu tarafından koordine edilmiştir (Şekil 1.2A). İnsan CAII izoenzimindeki histidin rezidüleri H94, H96 ve H119'dur. Bu histidinler ve aktif bölgedeki bazı rezidüler bütün aktif α -CA'larda korunmuştur. Aktif merkezde Zn^{2+} iyonu ile koordine olan su, aynı zamanda Thr199'un hidroksil kısmı ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Thr199, Glu106'nın karboksilat kısmı ile de bağı olması dikkat çekicidir. Bu etkileşimler Zn^{2+} ile koordine olan su molekülünün nükleofil karakterini artırdığı gibi substratı (CO_2), nükleofil atak için uygun konuma yönlendirmesi de önemlidir. *C. reinhardtii* periplazmik CA'sının iki tane 37 kDa ve iki tane 4 kDa'dan oluşan bir heterotetramer olmasına rağmen, çoğu α -CA'lar yaklaşık 30 kDa molekül ağırlığına sahip monomerler olarak aktiftirler. α -CA'lar aynı zamanda eubakteriler, algler ve yüksek bitkilerde de bulunmuştur. Örneğin, söz konusu izoenzimler bir tane siyanobakteride, üç tane yeşil alg *C. reinhardtii* ve *Dunaliella salina*'da tespit edilmiştir [12,23,36-38].

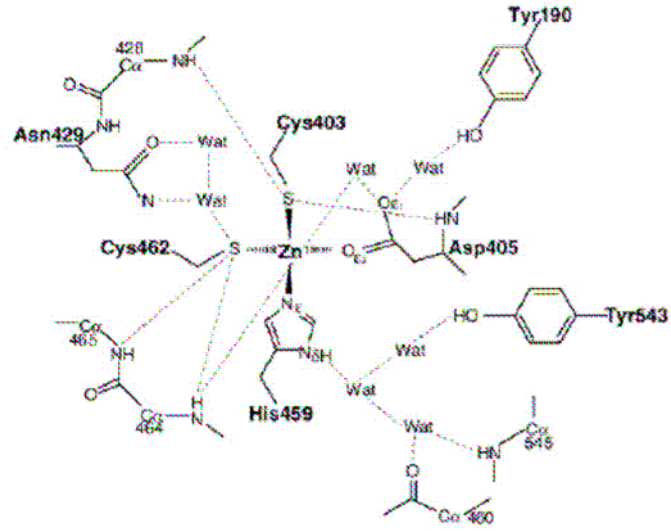


Şekil 1.2 CA II izoenziminin: A.aktif bölge, B. CA II'nin üç boyutlu yapısı [6,39]

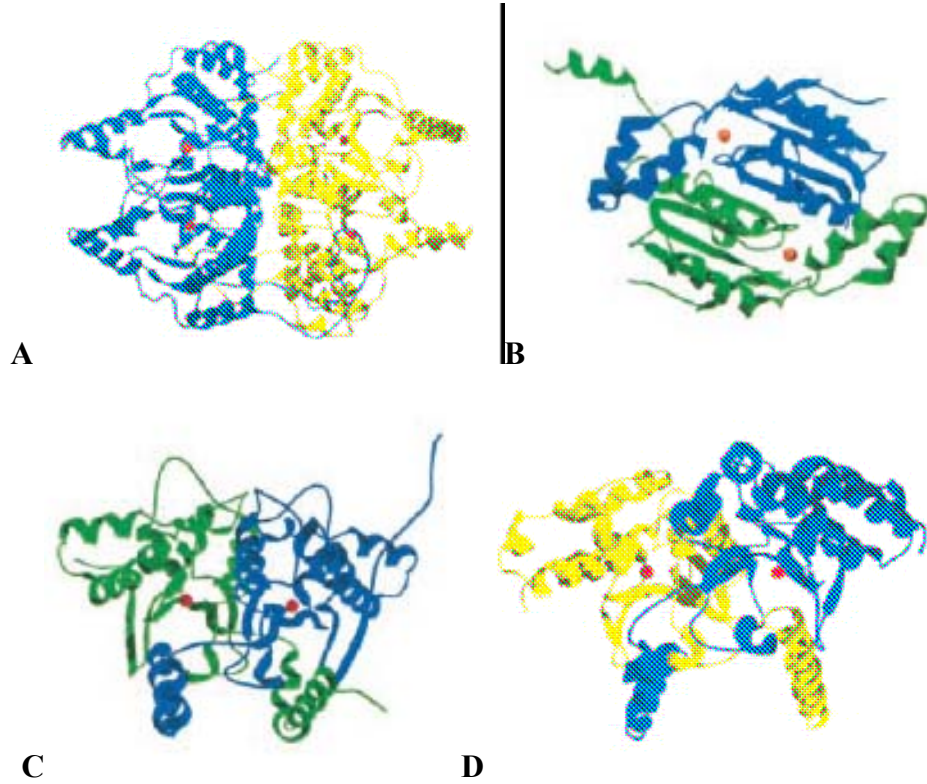
1.2.2 β -Sınıfı CA

Canlı organizmalarda β -CA'lar α -CA'lar kadar yaygın değildir. Çoğu bakteriler, bazı archaealar, algler ve yüksek bitkilerin kloroplastları β -sınıfına ait olan CA'ları ihtiva eder. Bu enzimler ile α -CA'ların arasındaki en önemli fark, β -CA'ları genellikle 25-30 kDa molekül ağırlığına sahip 2-6 kadar monomerlerden oluşan oligomerlerdir [23,36]. İncelenen bazı β -CA'ların X-ray yapıları elde edilmiştir. Bu türler kırmızı alg *Porphyridium purpureum* [27], *Pisum sativum*[28], *E.coli* [40], bir archaeon olan, *Methanobacterium thermoautotrophicum* [41] ve *Mycobacterium tuberculosis*'tir (Şekil 1.4) [42].

α ve γ sınıfı CA'ların tersine, β -CA izoenzimleri, kayda değer α sarmal karaktere sahiptir. Zn^{2+} iyonu, her iki enzim ailesinin katalizleme reaksiyonları için gereklidir fakat koordinasyonu farklıdır. Özellikle bu koordinasyon β -CA'lar için oldukça değişkendir. Prokaryotik β -CA'larda, Zn^{2+} iyonu iki sistein rezidüsü, bir histidin rezidüsüne ait bir imidazol halkası ve bir aspartat rezidüsüne ait karboksilat ile koordine edilir. Oysa *P.purpureum* β -CA'sı ve *P.sativum* kloroplast β -CA'sının her ikisi için de saptanan kristal yapılarda çinko iyonunun iki sistein ve bir histidin rezidüsü ile koordine edildiği bulunmuştur. Bu, bütün β -CA dizi analizleri arasında dizi analizi homolojisine dayalı tahminler ile örtüşmektedir [3,27,28,40]. Polipeptid zincir katlanmaları ve aktif bölge yapısı α -CA'lardan farklı olduğu açıkça görülmektedir.



Şekil 1.3 *P. Purpureum* CA enziminin aktif bölgesindeki Zn^{2+} atomunun koordinasyonu [27]

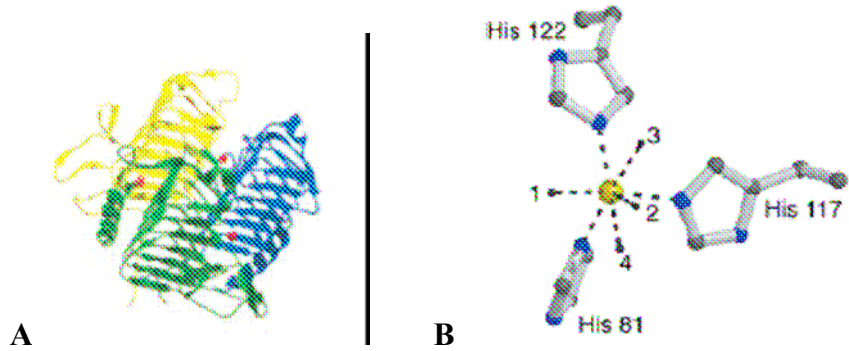


Şekil 1.4 Bazı β -CA'lara ait üç boyutlu yapıları: **A**, *P. purpureum* - 62.1 kDa (doğal yapısında bir tetramer), **B**, *P. sativum* - 193.6 kDa (doğal oktamerin dimerik ünitesi), **C**, *M. thermoautotrophicum* - 75.6 kDa (doğal tetramerin dimerik ünitesi), **D**, *E. coli* - 98.8 kDa (doğal tetramerin dimerik ünitesi) [6].

1.2.3 γ -Sınıfı

γ -CA, ilk olarak bir archaebakteri olan *Methanosarcina thermophila*'da keşfedilmiştir [26]. Bazı γ -CA'lar Zn^{2+} iyonu içerdiği gibi, bazıları da Co içerdiği saptanmıştır [43].

γ -sınıfını diğer sınıflardan ayıran birkaç farklı özellik vardır. γ -monomeri, yaklaşık 70 kDa'luk molekül ağırlığına sahip homotrimer yapılar oluşturmak üzere etkileşirler. γ -CA'ların aktif bölgelerinin koordinasyonu oldukça farklıdır. Koordinasyon geometrisi Zn içeren γ -CA için üçgen bipiramid ve Co-substitüe enzim için oktahedraldir. *Methanosarcina thermophila*'da metal iyonunu koordine eden histidin rezidülerinin iki tanesi (His81 ve His122) bir monomere aittir (Monomer A), diğer üçüncüsü ise (His117) bir başka monomere aittir (Monomer B). Böylece, üç aktif bölge, monomerlerin yüzeylerinde yerleşmiştir. Aktif bölge yüzeyde bulunmasına rağmen γ -CA'nın aktif bölge yapısı α -CA'ninkine benzer. Katalitik mekanizması α -sınıfı CA'ların mekanizmasına benzer olduğu belirlenmiştir [23,43,44].



Şekil 1.5 A, *Methanosarcina thermophila* CA'sı, 69 kDa (homotrimer), B, γ -CA'nın aktif bölgesinde metal ligasyonu [6,43].

1.3 Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Fonksiyonları

İnsan CA II çoğu hücrelerde bulunmasına karşın, insan CA I eritrositlere spesifiktir. CA II'nin kalıtsal eksikliği, kemiklerde kalsiyum emilimindeki

başarısızlık ve diğer dokulardaki kalsifikasyon sonucu meydana gelen osteopetroz (Albert-Schonberg hastalığı) ile ilişkilidir. İzoenzim III ve VII daha özelleşmiş bir dağılıma sahiptir. CA III, bikarbonatı yağ asidi sentezinde kullanan adipozitlerde daha yüksek oranda bulunmaktadır. İzoenzim V ise mitokondriyal matrikste, adipozitlerde ve karaciğerde de bol bulunmaktadır. İzoenzim VI tükürükte salgılanırken izoenzim IV membrana bağlı olarak daha büyük bir formda bulunur [45]. I, II ve IV. izoenzimler solunum ve asit-baz homeostasisinin düzenlenmesinde görev alır. Bu kompleks süreç $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 'ün metabolize olduğu dokular ile boşaltım bölgeleri arasında taşınmasını içerir (akciğer, böbrekler). Kılcal damarlar ve pulmoner mikrovaskülerde CO_2 eliminasyonunun kolaylaştırılmasında, böbreklerde bikarbonatın geri emilimini ve H^+ iyonlarının renal tübüllerde ve damarlarda eliminasyonunu sağlar [36].

CA'lar gözde bikarbonatça zengin humor aköz üreterek görme olayında görev almaktadır. Bazı patolojik durumlarda yüksek göz içi basıncı glokoma neden olur (II ve IV). Bu olayın en önemli tedavi şekli CA II'nin inhibisyonudur [2,46]. CA'lar, tükürük üretimi, gastrik asit üretimi, safra üretimi, pankreas özsuğu üretimi, bağırsakta iyon taşınması gibi diğer birçok doku ve organda elektrolit salgılanmasında görev alır [2,47]. CA'lar tat ve koku almada da görev alırlar. Gastrointestinal bölgeyi ekstrem pH koşullarından korurlar. Seminal sıvıdaki pH ve bikarbonat konsantrasyonunu, kas fonksiyonlarını düzenlerler ve hücrel strese adaptasyonu sağlarlar [46-48].

CA V gibi bazı izoenzimler moleküler sinyal iletiminde görev alır (pankreasın β hücrelerinden insülin salgılanması) [47].

İzoenzim II ve V glukoneogeneze bikarbonat sağlamak, yağ asidi biyosentezi ve pirimidin sentezi gibi önemli metabolik süreçlerde yer alır [48]. CA IX, XII, CARP VIII gibi bazı izoenzimlerin tümörde bol olduğu onkogeneze ve tümör gelişiminde yer aldığı aydınlatılmıştır [36].

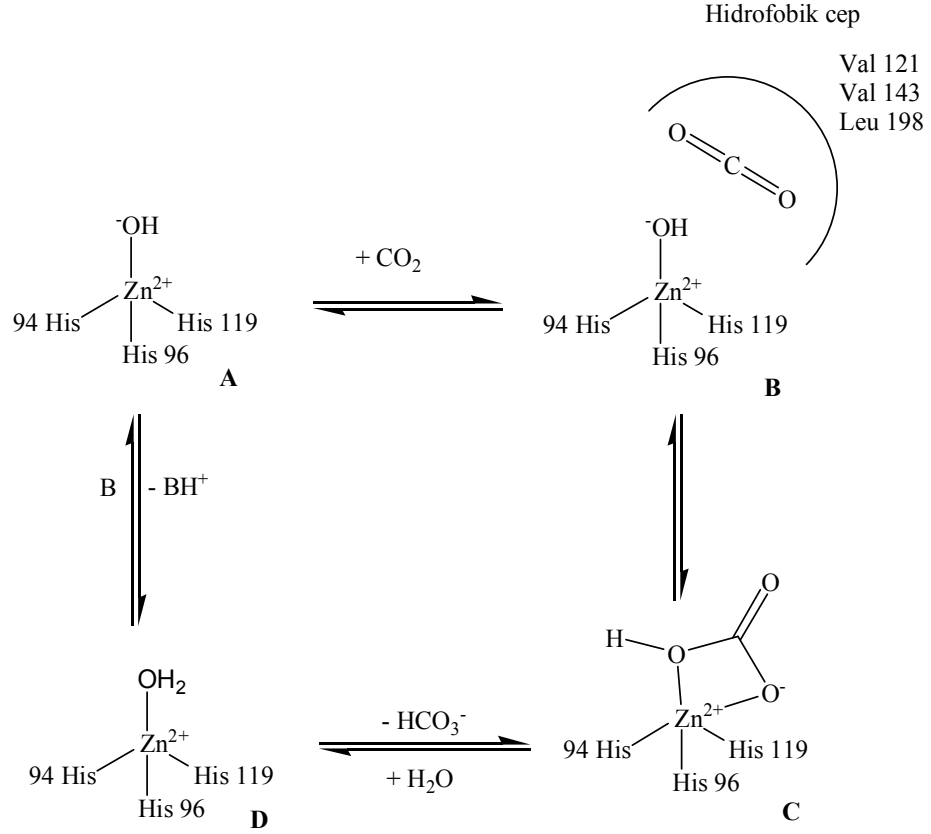
Prokaryotlarda CA'lar iki genel fonksiyona sahiptir; Organizmada farklı dokular arasında $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ taşınması ve enzimatik reaksiyonlar için $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 'ün

sağlanmasıdır [5]. Siyanobakterilerde ve C₄ yüksek bitkilerinde CA aktivitesinin yokluğu fotosentez hızını yaklaşık 10⁴ kat azalttığı hesaplanmıştır [25]. Fotosentez yapmayan organizmalarda genel olarak CA aktivitesi kaybı, büyüme bozuklukları ve oksidatif strese karşı hassasiyet ile sonuçlanabilir [49].

1.4 Karbonik Anhidrazların Katalitik Mekanizmaları

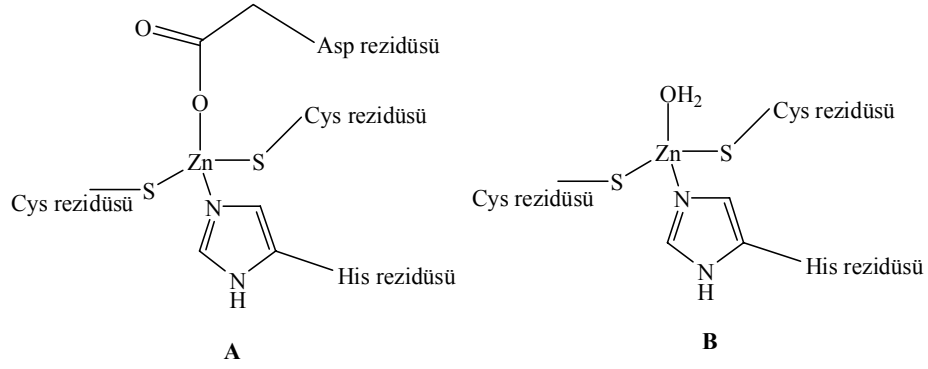
CA enzimi aktif bölgede bir Zn⁺² iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. Aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmiştir [36].

CA enziminin aktivitesinde, Zn⁺² iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-ray kristalografi sonuçları, α -CA'larda metal iyonunun bir H₂O veya OH⁻ iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96, His 119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 Å derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir. Çinko bağlı H₂O, Glu106'nın karboksilat grubuna sırasıyla köprü oluşturan Thr199'un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilliğini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun yerdeki CO₂' e doğru hareket etmektedir. Zn⁺² iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur (Şekil 1.6A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO₂ molekülüne atak yapar (Şekil 1.6B). Bu etkileşim, Zn⁺² iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 1.6C). Daha sonra, HCO₃⁻ iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Zn⁺² iyonuna su molekülü bağlanır. Bu durum Şekil 1.6D'de görüldüğü gibi enzimin katalitik olarak inaktif asit formuna dönüşmesini sağlar. Temel formu elde etmek için aktif bölgedeki rezidüler ve/veya tamponda bulunan iyonların etkisi ile aktif bölgeden çevreye bir H⁺ transferi gerçekleşir. Enzimin temel hale dönmesi hız belirleyici basamak olduğu için son derece önemlidir [36].



Şekil 1.6 Karbonik Anhidraz Enziminin CO₂-Hidratase Mekanizması [36].

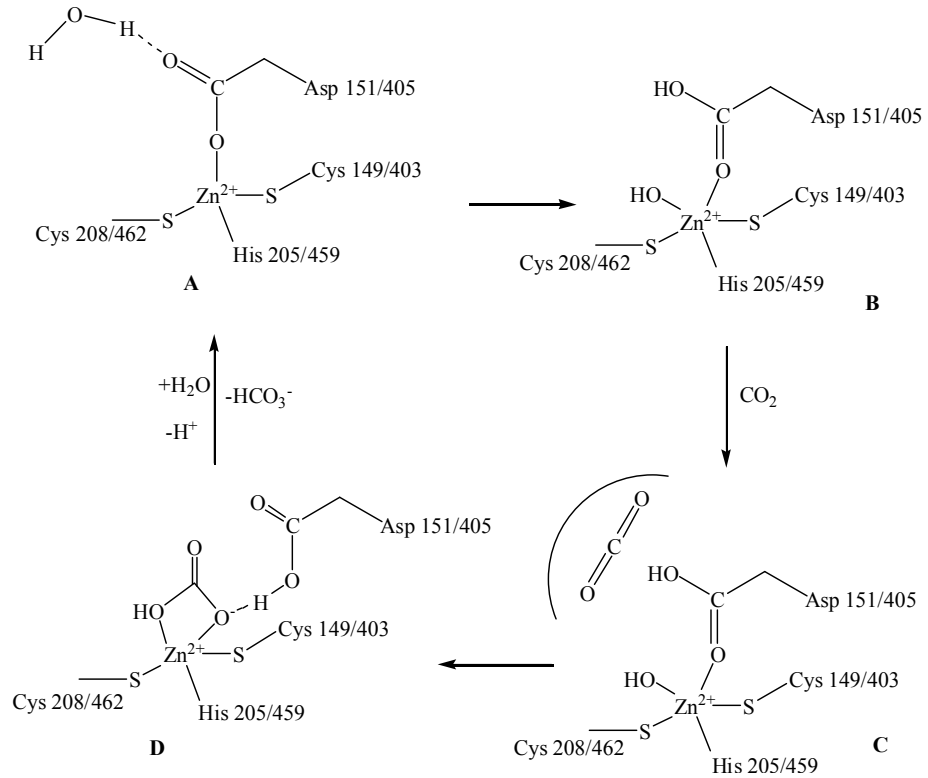
Zn(II) iyonu her iki ailedeki CA enzimlerinin katalizi için gereklidir fakat β -CA'lar için koordinasyonu farklıdır ve oldukça değişkendir. Böylece prokaryotik β -CA'larda, Zn(II) iyonu iki sistein rezidüsü, histidin rezidüsünden bir imidazol ve aspartat rezidüsüne ait bir karboksilat ile koordine edilmiştir (Şekil 1.7A), oysa kloroplast enzimine ait olan Zn (II) iyonu iki sistein, histidine ait bir imidazol ve bir su molekülü ile koordine edilmiştir (Şekil 1.7B). Polipeptid zincir katlanmaları ve aktif bölge yapıları α -CA'lardan açıkça çok farklıdır [36].



Şekil 1.7 β -CA'ların Zn(II) koordinasyonunun gösterimi: **A:** *P.purpureum* ve *E.coli*, **B:** *P. sativum* kloroplast ve *M. thermoautotrophicum* enzimi [36].

α -CA'ların aksine β -CA üyelerinde Zn^{2+} iyonuna doğrudan bir su molekülünün bağlı olmaması α -CA'ların gerçekleştirdiği çinko hidroksid mekanizmasında belirli ölçüde farklılığın olduğu anlamına gelir. Bunun için Mitsuhashi ve arkadaşları Şekil 1.8'deki gibi bir katalitik mekanizma önermişlerdir [27].

P.purpureum enziminin bir monomerinin iki simetrik yapı motifi vardır. İki çinko iyonu yukarıda bahsedilen dört amino asit ile koordine edilmiştir. Bu durumda bu çiftler Cys 149/Cys 403, His 205/His 459, Cys 208/Cys 462 ve Asp 151/Asp 405 [27]. Her metal iyonun yakınında bir su molekülü de bulunmaktadır, ancak α -CA'larda olduğu gibi Zn^{2+} iyonuna doğrudan bağlı değildir. Söz konusu su molekülü Zn^{2+} iyonuna bağlı Asp 151/Asp 405'e ait karbonil oksijeni ile hidrojen bağı oluşturur (Şekil 1.8A). Daha sonra proton transferi ile yaklaşık trigonal bipiramid formunda bir enol yapı oluşturduğu düşünülmektedir (Şekil 1.8B). Böylece enzimin hidrofobik cebinde bulunan CO_2 'e atak yapabilecek güçte nükleofil oluşur (Şekil 1.8C). Bundan sonraki basamak Zn^{2+} iyonuna bağlı bikarbonat oluşmasıdır (Şekil 1.8D). Son olarak α -CA'larda olduğu gibi enzimin rejenerasyonu gerçekleşir [27].



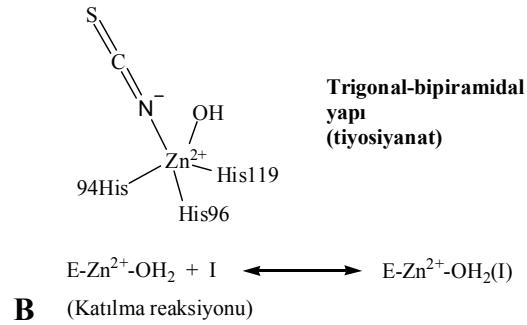
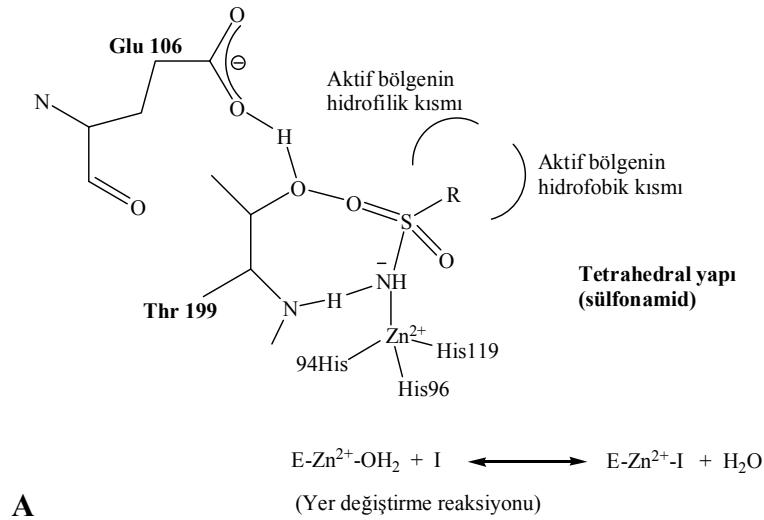
Şekil 1.8 Prokaryotik β -CA'lar için önerilen katalitik mekanizma (*P.purpureum* enzim numaralandırması) [36].

1.5 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

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

bölgelerinin aydınlatılması, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine fırsat vermektedir [50,51].

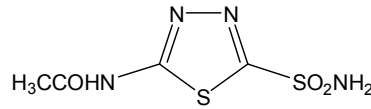
CA inhibitörlerinin iki ana sınıfı bilinmektedir: metal ile kompleks oluşturan anyonlar (Şekil 1.9B) ve aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir (Şekil 1.9A). En önemli CA inhibitörü olan sülfonamidler, çinko iyonuna tetrahedral geometride bağlanırlar. Sülfonamidin azot atomu Zn^{2+} iyonu ile koordine olur. Ayrıca Thr 199 ve Glu 106 rezidüleri hidrojen bağları ile inhibitörün metal iyonuna bağlanmasına katılırlar. İnhibitörün bağlanmasına bir diğer katkı, aromatik/heteroaromatik kısmın aktif bölgenin hidrofilik ve hidrofobik rezidüleri ile etkileşimi sonucu sağlanır. Anyonlar metal iyonunun hem terahedral geometrisinde hem de trigonal-bipiramidal şekilde bağlanabilirler (Şekil 1.9B) [36].



Şekil 1.9 Karbonik anhidrazın inhibisyonunun mekanizması. **A-** sülfonamid ile, **B-** anyonik inhibitörler ile [36].

1.5.1 Asetazolamid

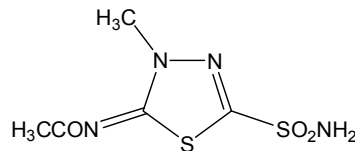
Sekonder glokom tedavisinde kullanılan güçlü karbonik anhidraz inhibitörüdür. Akut konjestif glokomun pre-operatuar evresinde, konjestif kalp yetersizliği ve ilaçlarla oluşan sekonder ödemlerin tedavisinde diğer ajanlarla birlikte, epilepsi tedavisinde diğer ajanlarla birlikte yardımcı olarak ve akut yükseklik hastalığında semptomların önlenmesi ve iyileştirilmesinde endikedir [52]. Aynı zamanda diüretik olarak da kullanılmaktadır [53].



N-(5-(aminosulfonil)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-asetamid

1.5.2 Metazolamid

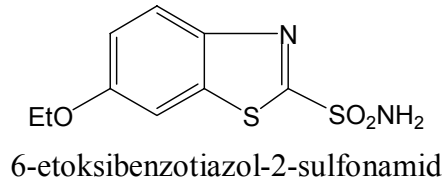
Bir sülfonamid türevi ve muhtemel antineoplastik aktiviteye sahip karbonik anhidraz inhibitörüdür. Metazolamid tümör ilişkili CA IX'u inhibe ederek hipoksiya tümörlerinde artan hücre ölümü ile sonuçlanabilir. Hipoksiya indükleyici bir transmembran glikoprotein olarak CA IX CO₂ ve suyun bikarbonat ve protona hızlıca dönüşmesini katalizler ve bikarbonat iyonları, tümör mikro çevresinin asitleştirmesini sürdürmek için yardım eder ve bazı hipoksiya tümörlerinde sitotoksik tedavilere karşı direnç geliştirir [54].



N-(3-Metil-5-sulfamoil-3*H*-1,3,4-tiadiazol-2-iliden) etanamid

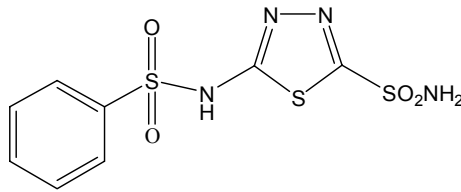
1.5.3 Etokszolamid

Etokszolamid karbonik anhidraz inhibitörü gibi işlev gören bir sülfonamid ilacıdır. Glokom, düodenal ülser tedavilerinde ve diüretik olarak kullanılır. Epilepsinin bazı formlarının tedavisinde de kullanılabilir. Etokszolamid su, sodyum, potasyum ve bikarbonatın reabsorpsiyonunu azaltmak için proksimal renal tübüllerdeki CA aktivitesini inhibe eder [53].



1.5.4 Benzolamid

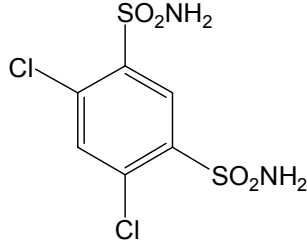
Seçici renal karbonik anhidraz inhibitörüdür. Solunum yetmezliği durumlarında da kullanılabilir [55].



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

1.5.5 Diklorfenamid

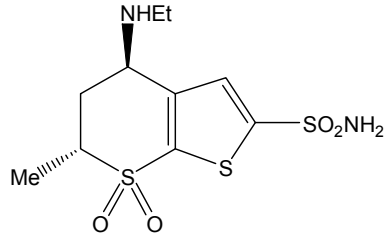
Bir sülfonamid ve karbonik anhidraz inhibitörüdür [53].



4,5-diklorobenzen-1,3-disulfonamid

1.5.6 Dorzolamid

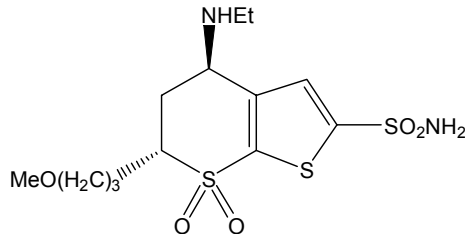
Oküler hipertansiyon, açık açılı glokom, psödoeksfolyatif glokomu ya da diğer sekonder açık açılı glokomu olan hastalarda, kombine tedavinin uygun olduğu durumlarda, yükselmiş intraoküler basıncın tedavisinde endikedir [52].



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

1.5.7 Brinzolamid

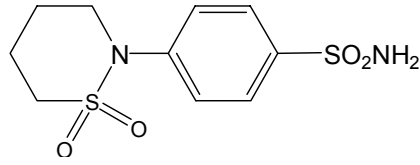
Karbonik anhidraz inhibitörü antiglokomdur. Oküler hipertansiyon ve açık açılı glokomda yüksek intraoküler basıncın tedavisinde endikedir [52].



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

1.5.8 Sulthiam

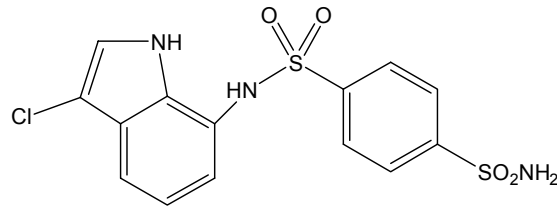
Sulthiam bir sülfonamiddir ve CA enziminin inhibitörüdür. Antikonvülzan olarak kullanılır. Önceleri sulthiam kısmi felç tedavisinde kullanılmıştır. Avustralya’da şu anda epilepsi, hiperkinetik davranış, geçici lob epilepsisi, miyoklonik felç, sara atakları ve Jacksonian felci ile ilişkili davranış bozukluklarında kullanılmaktadır. Diğer sülfonamid ilaçlarının tersine, sulthiam antibakteriyel aktiviteden yoksundur [52].



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

1.5.9 İndisulam

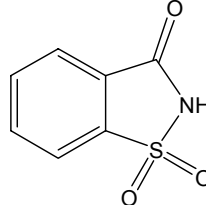
İndisulam katı tümörlerin tedavisi için klinik olarak geliştirilmekte olan yeni bir sülfonamid antikanser ajanıdır. Etki mekanizması multifaktoriyeldir. İndisulam hücre döngüsünü G1 fazında tutar, çoğu fizyolojik süreçte görev alan önemli bir enzimdir. Son zamanlarda kanserle ilişkisi ortaya çıkan CA’yı kuvvetlice inhibe eder ve belirgin bir şekilde en az 60 tane transkriptin ekspresyon seviyesini değiştirir [56].



N-(3-kloro-7-indolil)-1,4-benzendisulfonamid

1.5.10 Sakarin

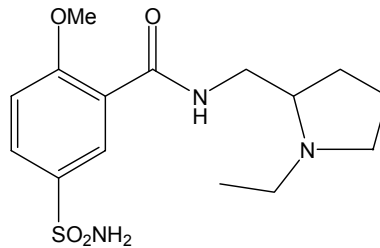
Sakarin en eski yapay tatlandırıcıdır. Temel madde olan benzoik sulfinidin etkili besin enerjisi yoktur ve sakarozdan 300 kat daha tatlıdır fakat yüksek konsantrasyonlarda ağızda istenmeyen acı veya metalik bir tat bırakır. Sakarinin izin verildiği ülkelerde; içecek, şekerlemeler, ilaç ve diş macunu gibi ürünlerde tatlandırıcı olarak kullanılır. Daha yeni bir yapay tatlandırıcı olan Aspartam'dan farklı olarak, sakarin asit varlığında bile ısıtıldığında daha karardır. Kimyasal olarak diğer gıda içerikleri ile etkileşmez ve kolay saklanabilir [53].



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

1.5.11 Sulpirid

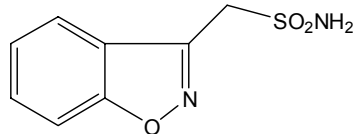
Sulpirid, nöroleptik etkilidir. Preparatın tablet ve ampul formu negatif ve/veya pozitif semptomlarda seyreden akut ve kronik şizofreni ve diğer psikozlarda endikedir. Solüsyon formu ise erişkinlerde şizofreni ile ülser ve hemorajik rektokolitlerde psikosomatik komponentin tedavisi ile çocuklarda psikoz ve davranış bozukluklarında endikedir [52].



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

1.5.12 Zonisamid

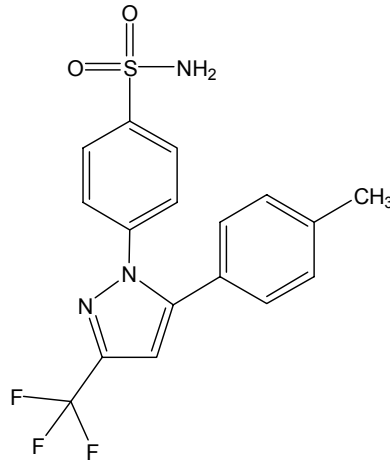
Zonisamid, kısmi felç olan yetişkinlerde ek bir tedavi gibi kullanmak için geliştirilen bir sülfonamid antikonvülzandır. Parkinson hastalığı, obezite, epilepsi ve migren'e karşı etkisi çalışılmıştır [53].



1,2-benzisokazol-3-metansülfonamid

1.5.13 Selekoksisib

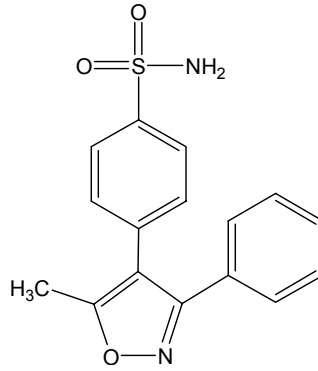
Selekoksisib, Siklooksijenaz-2 inhibitörü antienflamatuar, analjezik ve antipiretikdir. Osteoartrit belirti ve semptomlarının tedavisinde, yetişkinlerde romatoid artrit belirti ve semptomlarının tedavisinde, yetişkinlerde akut ağrının giderilmesinde ve primer dismenorenin tedavisinde endikedir [53].



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

1.5.14 Valdekoksib

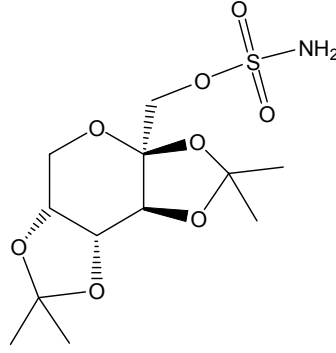
Valdekoksib, osteoartrit, romatoid artrit ve sancılı menstruasyon ve menstrual semptomların tedavisinde kullanılan bir reçete ilacıdır. Nonsteroidal antienflamatuar ilaç olarak sınıflandırılır [53].



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

1.5.15 Topiramate

Topiramate, antiepileptiktir. Yeni epilepsi teşhisi konmuş hastalarda monoterapi olarak ya da epilepsi hastalarında monoterapiye geçişte endikedir. Parsiyel başlangıçlı nöbetleri veya generalize tonik-klonik nöbetleri olan erişkinlerde 2 yaş üzeri çocuklarda ve Lenox Gastuat sendromuna bağlı nöbetlerin tedavisinde adjuvan olarak endikedir. Erişkinlerde migren profilaksisinde endikedir. Akut migren tedavisinde etkinliği değerlendirilmemiştir [53].



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

1.6 *Saccharomyces cerevisiae*

Bilimsel sınıflandırma

Alem: Fungi

Bölüm: Ascomycota

Alt bölüm: Saccharomycotina

Sınıf: Saccharomycetes

Takım: Saccharomycetales

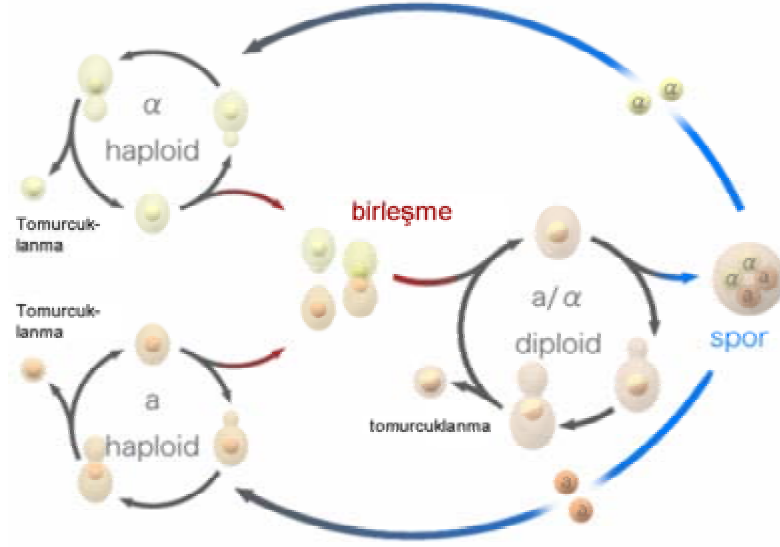
Familya: Saccharomycetaceae

Cins: *Saccharomyces*

Tür: *Saccharomyces cerevisiae* [58]

Maya tek hücreli bir ökaryottur. Maya hücreleri bakteri hücrelerine göre çok daha büyüktür. Bazı mayalar eşeyli olarak da ürer. Bu üremede birbirine uygun iki haploid maya hücresi birleşir ve zigot oluştururlar. Zigot kendi hücresi içerisinde mayoz bölünme geçirir ve dört tane haploid askospor oluşturur. Zigotun hücre çeperi de askus olarak görev yapar. Askuslar parçalandığında askosporlar serbest kalır. Askosporlar tomurcuklanmak suretiyle eşeysiz olarak çoğalabilir ve popülasyonlarını arttırabilirler. Ayrıca bunlar genetik olarak kendilerine karşılık gelen diğer askosporlarla birleşip yeniden diploid hücreler oluşturabilirler. Bu hücreler aktif şekilde tomurcuklanarak eşeysiz üremeye devam edebildikleri gibi mayoz bölünme geçirerek yeniden askus ve askosporları da oluşturabilirler. Bu durumda eşeyli üreyen mayaların hayat devrinde haploid ve diploid olarak iki faz bulunmaktadır.

En iyi araştırılmış maya türü *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Bu organizma tomurcuklanarak eşeysiz olarak üreyebildiği gibi askospor oluşturarak eşeyli olarak da ürer. Hayat devresinde hem haploid hem diploid safha vardır [57].



Şekil 1.10 *S. cerevisiae*'nin yaşam döngüsü [58]

Maya hücreleri haploit ve diploit biçimde varlıklarını sürdürebilirler. Haploit hücreler mitoz ve büyümeden ibaret basit bir yaşam döngüsüne sahiptirler ve yüksek stresli ortamda genelde ölürlür. Diploit hücreler de mitoz ve büyümeden oluşan bir yaşam döngüsüne sahip olmakla beraber stres halinde sporlanıp mayoz bölünmeye giderler, çeşitli haploit sporlar oluştururlar ve bu sporlar çiftleşip yeniden bir diploit hücre oluştururlar. Mayanın a ve α olarak adlandırılan iki eşey tipi vardır, haploit hücrelerin eşleşebilmek için iki farklı eşey tipine sahip olmaları gerekir [58].

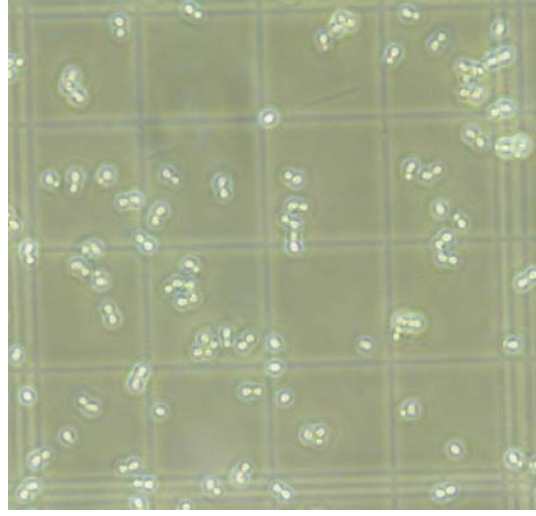
Mayalar genellikle şekerlerin bulunduğu meyveler, çiçekler ve ağaç kabukları gibi ortamlarda yaygındırlar. Birçok maya türü hayvanlarla, özellikle böceklerle birlikte simbiyoz olarak yaşar. Bazı türler ise insan ve hayvanlarda patojendir. Ticari olarak en önemli mayalar hamur, bira ve şarap mayalarıdır. Bunlar, *Saccharomyces* cinsinin türleridir.

Mayaların orijinal habitatları meyveler ve meyve sularıdır. Ancak günümüzde kullanılan ticari mayalar, bu orijinal ırklardan çok farklı olup yıllar boyunca seleksiyona uğramış ve genetik olarak manipüle edilmiş kültür ırklarıdır. Hamur ve alkollü içki sanayinde kullanılan mayalar bütün funguslar içerisinde biyolojik olarak en iyi bilinen organizmalardır. Tek hücreli olduklarından kolayca incelenirler. *Saccharomyces cerevisiae* (*E.coli* gibi) biyolojide en çok çalışılmış model organizmalardan biridir. *S. cerevisiae* bu konuma endüstrideki yaygın kullanımından dolayı ulaşmıştır. İnsan biyolojisinde önemli olan pek çok protein önce mayada bulunan karşılıklarının araştırılması sonucunda keşfedilmiştir. Ökaryot biyolojisindeki problemler en kolay şekilde bu organizmalar üzerinde çalışılarak çözülebilmektedir [57,58].

Gelişmekte olan *Saccharomyces cerevisiae* ökaryotlarda hücresel ve moleküler süreçleri anlamak için önemli bir model organizmadır. *Saccharomyces cerevisiae* genomu 1996'da tamamlanmıştır [59].

16 tane kromozomu bir de mitokondri DNA'sı vardır. CA enzimini kodlayan NCE103 geni XIV. kromozom üzerinde bulunur ve intron bölge içermez. Enzim 221 aminoasit rezidüsünden oluşur ve 24.8 kDa ağırlığındadır [60].

Cleves ve ark. yaptıkları çalışmada, mayadaki NCE103 geni tarafından kodlanan Nce103p proteinin amino asit dizilişi, prokaryot ve eukaryotların karbonik anhidraz enzimi ile yüksek derecede benzerlik gösterdiğini açıklamışlardır [61]. Daha sonra Götz ve ark. mayadaki bu geni kesip çıkararak nasıl bir etkisi olduğunu incelemişler ve delesyona uğramış maya soyunun (*nce103-Δ*) oksijenli ortamda büyümediğini, bu genin kodladığı proteinin peroksitlere karşı korunmak için gerekli olduğunu bulmuşlar [49]. Clark ve ark. bölge yönlendirilmiş mutagenез ile maya mutant Δ NCE103 üzerinde çalışmışlardır [62]. Aguilera ve ark. CA enziminin anaerobik kültürlerde mayanın büyümesi için zorunlu olduğunu ve maya CA'nın glukozdaki büyüme sürecinde anahtar bir biyosentetik enzim olduğunu tespit etmişlerdir [63]. Amoroso ve ark. *Saccharomyces cerevisiae*'deki NCE103 geninin görev gören bir karbonik anhidraz kodladığını ve transkripsiyonunun ortamdaki inorganik karbon konsantrasyonu ile düzenlendiğini bulmuşlar [35].



Şekil 1.11 *Saccharomyces cerevisiae* maya hücreleri

1.7 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada β -ailesine ait CA enziminin saflaştırılması, kinetik ve elektroforetik özelliklerinin aydınlatılması planlanmıştır. Ayrıca sözkonusu enzimin klinikte kullanılan farklı sülfonamidlere karşı ilgisi araştırılacaktır. Bölüm 1.3'te belirtildiği gibi CA metabolizmada son derece önemli fizyolojik fonksiyona sahiptir. Bu nedenle bu enzim üzerinde araştırmalar yoğun bir şekilde artarak devam etmektedir. Çalışmaların büyük kısmı α -CA'larda yoğunlaşmıştır. Ancak β -CA'lara yönelik çalışmalara literatürde fazla rastlanmaması dikkat çekmektedir. Bunun en temel nedeni söz konusu enzimin çok az ve aktivitesinin son derece düşük olmasıdır. Bu amaçla; model olarak seçilen *Saccharomyces cerevisiae*'den genomik DNA izole edilerek proteini şifreleyen genin çoğaltılması planlanmıştır. Daha sonra söz konusu gen vektör içerisine klonlanarak *E.coli* içerisine transforme edilerek burada ekspresyonu gerçekleştirilecektir.

Araştırmamızda bir diğer amacımız enzim saflaştırılarak bazı sülfonamidlere karşı ilgisinin araştırılmasıdır. Elde edilecek sonuçların söz konusu β -CA'nın kinetik mekanizmasına önemli katkılar sağlayacağı gibi α -CA'larla karşılaştırma olanağı da sağlayacaktır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 MATERYAL

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Merck ve Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Moleküler biyoloji materyalleri, kullanılan kimyasal ve enzimler Stratagene ve Fermentas MBI firmalarından temin edildi.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

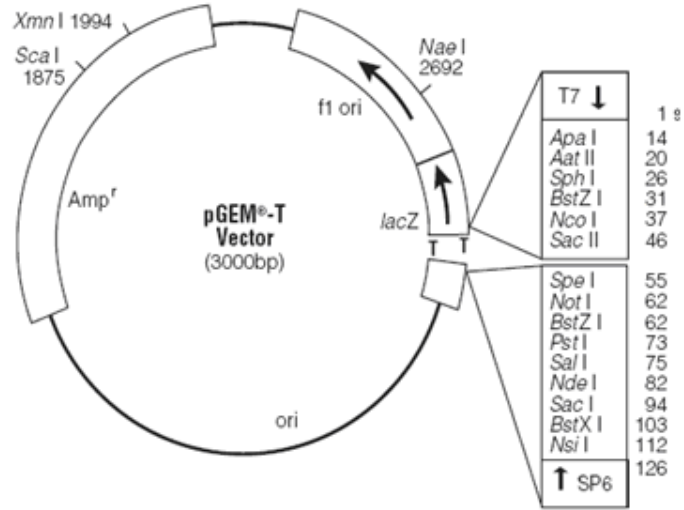
Çizelge 2.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
-80°C Derin dondurucu	Sanyo, Japonya
Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	She-Lab, USA
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Kromatografi Kolonu	Sigma (1cm çap ve 20cm uzunluk)
Otoklav	Hirayama, Japonya
Thermocycler	Techne Progene, İngiltere
pH Metre	WTW, Almanya
Dijital Görüntüleme Sistemi	UVP, İngiltere
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
MikroSantrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Germany

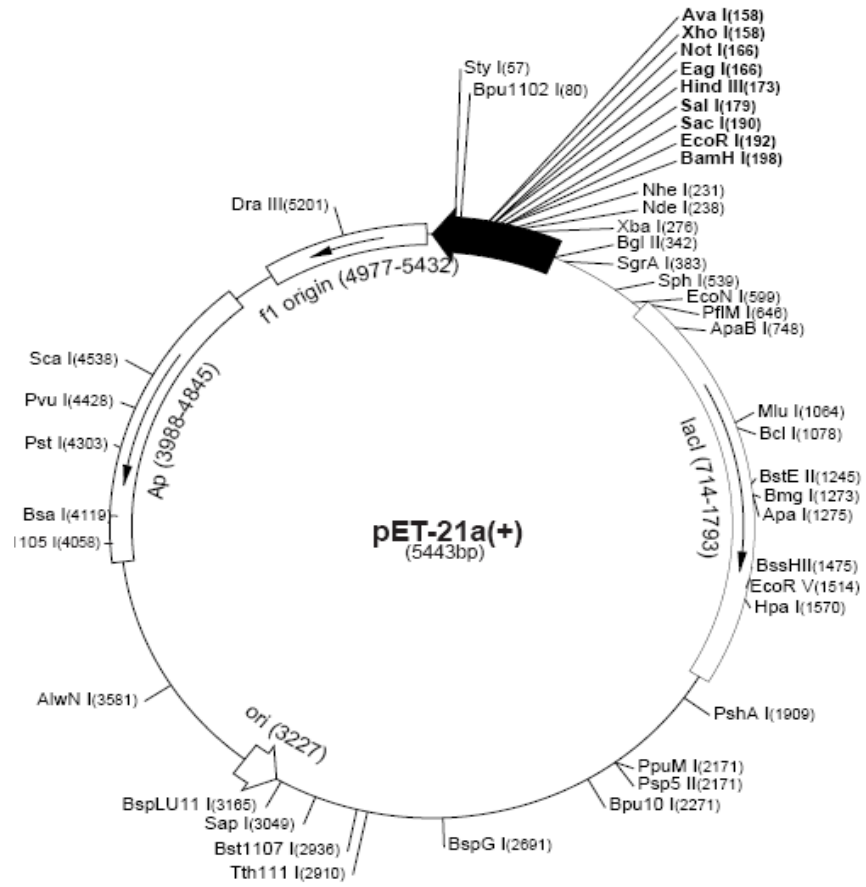
Çizelge 2.1'in devamı	
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
SDS PAGE Aparatları	Atto, Japonya
Horizontal Çalkalayıcı	GFL, Almanya
Elektroforez için Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Sıcak su banyosu	Elektro-mag, Türkiye
Isı kontrollü Çalkalamalı etüv	GFL , Almanya
Isıtıcı blok	FALC, İtalya
UV visible Spektrofotometreler	Heios α (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Stop-Flow Kinetic Instrument	SX.18MV-R Applied Photophysics

2.1.3 Maya, Bakteriyel Soylar ve Plazmidler

Çalışmada kullanılan maya soyu CEN.PK2-1C (MATa; ura3-52; trp1-289; leu2-3_112; his3 Δ 1; MAL2-8C; SUC2) Almanya, Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt Institute of Microbiology, K.D. Entian'dan temin edildi. Klonlama ve stok amaçlı DH5 α (SupE44 Δ lacU169 (Φ 80 LacZ Δ M15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 r1 A1) E.coli soyu kullanıldı. Ekspresyon amaçlı çalışmada kullanılan bakteri soyu BL_21 (DE3) 'dır. Bu soyun genotipi (E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) gal λ (DE3) şeklindedir [64]. Çalışmada PCR ürünlerinin klonlanması amacıyla pGEM-T vektör sistem I kullanıldı. Plazmid haritası Şekil 2.1 'de gösterildiği gibidir [65]. Ekspresyon amaçlı kullanılan plazmid pET21a(+)'dır. Plazmit haritası Şekil 2.2 'de gösterildi [66].



Şekil 2.1 pGEM-T Vektör Haritası [65]



Şekil 2.2 pET21a(+) Vektör Haritası [66]

2.1.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

2.1.4.1 *Saccharomyces cerevisiae* için Maya Kültür Ortamları

Saccharomyces cerevisiae için gerekli kültür ortamı olarak YPD (Yeast – Peptone-Dekstroz) ve YPD-agar kullanıldı. Maya kültürleri [67]'deki prosedürlere göre hazırlanarak otoklav edilmiştir.

2.1.4.2 *E.coli* için Bakteriyel Kültür ortamları

E.coli için gerekli kültür ortamı olarak LB ve LB-agar kullanılmıştır. Toz halinde temin edilen bakteriyel medyumlar üretici firmanın belirttiği şekilde destile H₂O ile hazırlanarak otoklav edildi.

2.1.4.3 Antibiyotik Hazırlanması

Kültürlerde kullanılan Ampisilin stokları 100 mg/ml olacak şekilde steril destile su ile hazırlandı ve 0.22 mikronluk filtrelerden geçirilerek steril edildi.

2.1.4.4 Maya Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.2 Maya Hücre Duvarını Parçalamak için Kullanılan Tampon

Stok solüsyon	Son Konsantrasyon
1 M Tris HCl	100 mM
0.5 M EDTA pH:7.5	10 mM
β-merkaptetanol	10 µl/ml
Zimoliyaz	0.2 mg/ml

Çizelge 2.3 Maya genomik DNA izolasyonu için Lizis Tamponu

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
NaOH	0.2 M
SDS	10 g/l

2.1.4.5 Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.4 Solüsyon I

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon estile
1M Glukoz	50 mM
1M Tris-HCl (pH 8)	25 mM
0.5M EDTA (pH 8)	10 mM
Destile H ₂ O	100 mL'ye tamamlanır
Otoklavlanır.	

Çizelge 2.5 Solüsyon II

Stok Solüsyonlar	Son Konsantrasyon
1M NaOH	200 mM
% 10 SDS	%1
Destile H ₂ O	10 mL'ye tamamlanır.

Çizelge 2.6 Solüsyon III

Kimyasal Madde	Miktar
$K^+ CH_3COO^-$	29.44 g
%99 Glasiyal Asetik Asit	11.5 mL
Destile H_2O	100 mL'ye tamamlanır
Potasyum asetat, yaklaşık 50 mL suda çözülür, asetik asit ilave edilir. Su eklenerek 100 mL'ye tamamlanır. $-20^\circ C$ 'de saklanır.	

2.1.4.6 Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit

Plazmid DNA izolasyonu QIAprep Spin Mini Prep Kiti (Qiagen-Kat.No:27104) ile yapıldı.

2.1.4.7 Agaroz Jel Elektroforez Tamponu

Çizelge 2.7 0.5X TBE (Tris-Borat-EDTA) Tampon

Stok solüsyon	Son Konsantrasyon
1 M Tris Borat	0.045 M
0.5 M EDTA pH:8	0.001 M

2.1.4.8 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlama Solüsyonu

Çizelge 2.8 Kompetent Hücre için Kullanılan Solüsyon (DH5α *E.coli* soyu için)

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
$CaCl_2$	100 mM
Gliserol	%40

Çizelge 2.9 Kompetent Hücre İçin Kullanılan Uygulama tamponu (BL-21 *E.coli* soyu için)

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
CaCl ₂	100 mM
MnCl ₂	70 mM
Na ⁺ CH ₃ COO ⁻	40 mM
pH 5.5'e ayarlanır	

2.1.4.9 Protein Ekspresyonu ve Lizis için Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.10 Bakteri Yıkama tamponu:

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-baz	0.6 g
Destile su	100 mL'ye tamamlanır
Tris-baz 90mL destile suda çözülür. 1 M HCl ile pH'sı 7.6'ya ayarlanarak toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.11 Lizis Tamponu : 20mM Tris / 0.5mM EDTA / 0.5mM EGTA (pH 8.7)

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-baz	2.44 g
0.5 M EDTA	1.0 mL
0.5 M EGTA	1.0 mL
Destile su	1 L'ye tamamlanır.
Tris-baz, 0.5 M EDTA, 0.5 M EGTA 800 mL suda çözülür. 1M HCl ile pH'sı 8.7'ye ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır. +4°C'de saklanır.	

Çizelge 2.12 100mM PMSF (=100X , PMSF Stok çözelti)

Kimyasal Madde	Miktar
PMSF	174.0 mg
2-propanol	10 mL
-20° C’de saklanır.	

2.1.4.10 Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar:

Çizelge 2.13 0.1 M NaHCO₃, pH 10.0 Tamponu:

Kimyasal Madde	Miktar
NaHCO ₃	8.401 g
Destile su	1 L’ye tamamlanır
950 mL destile suda çözülerek, 1 M NaOH ile pH’sı 10.0’a getirildi ve son hacim destile su ile 1 L’ye tamamlandı.	

Çizelge 2.14 0.2 M NaHCO₃, pH 8.8 Tamponu:

Kimyasal Madde	Miktar
NaHCO ₃	8.401 g
Destile su	500 mL’ye tamamlanır
450 mL destile suda çözülerek, 1 M NaOH ile pH’sı 8.8’e getirildi ve son hacim destile su ile 500 mL’ye tamamlandı.	

Çizelge 2.15 0.05 M Tris-SO₄, pH 7.5 Tamponu:

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-base	6.055 g
Destile su	1 L'ye tamamlanır
950 mL destile suda çözülerek, 1 M NaSO ₄ ile pH'sı 7.5'e getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.	

2.1.4.11 Afinite Kromatografisinde Kullanılan Tamponları

Çizelge 2.16 Dengeleme Tamponu: 25mM Tris-HCl/22mM Na₂SO₄/0.05mM EDTA (pH 8.7)

Kimyasal Madde	Miktar
Na ₂ SO ₄	14.20 g
Tris-HCl	3.0275 g
100 mM EDTA	5 mL
Destile su	1L 'ye tamamlanır
Na ₂ SO ₄ ve Tris-HCl 950 mL suda çözülür. 1 M HCl ile pH'sı 8.7'ye ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.17 Jel Yıkama Tamponu: 25mM Tris-HCl/22mM Na₂SO₄/0.05mM EDTA (pH 8.7)

Kimyasal Madde	Miktar
Na ₂ SO ₄	3.124 g
Tris-HCl	3.0275 g
100 mM EDTA	5 mL
Destile su	1L 'ye tamamlanır
Na ₂ SO ₄ ve Tris-HCl 950 mL suda çözülür. EDTA ilave edilir ve 1 M HCl ile pH'sı 8.7'ye ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.18 Afinite Jeli Elüsyon Tamponu : 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6)

Kimyasal Madde	Miktar
Na ⁺ CH ₃ COO ⁻	2.04 g
NaClO ₄	9.187 g
Destile su	150 mL'ye tamamlanır
NaCH ₃ COO ve NaClO ₄ 120 mL suda çözülür. 1 M HCl ile pH'sı 5.6'ya ayarlanarak toplam hacim 150 mL'ye tamamlanır.	

2.1.4.12 CO₂ - Hidrataz Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.19 CO₂ Hidrataz Aktivite Tamponu: 0.15 M Na₂CO₃ / 0.1 M NaHCO₃ (pH 10)

Kimyasal Madde	Miktar
Na ₂ CO ₃	15.9 g
NaHCO ₃	8.4 g
Destile su	1L'ye tamamlanır
Na ₂ CO ₃ ve NaHCO ₃ 950 mL suda çözülür. pH'sı 10'a ayarlanır ve toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.	

Çizelge 2.20 CO₂ Hidrataz Aktivitesi - İndikatör Çözeltilisi:

Kimyasal Madde	Miktar
Fenol red	0.01256 g
NaHCO ₃	0.2184 g
Destile su ile 1 L'ye tamamlanır	

Çizelge 2.21 CO₂ Hidrataz Aktivitesi - CO₂ Çözeltisi :

Kimyasal Madde	Miktar
Destile su	500mL
0 °C'de 1 dakika süre ile CO ₂ geçirilerek hazırlanır. Ölçümler süresince yenilenir.	

2.1.4.13 Jel Filtrasyon Kromatografisinde Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.22 Sephadex G-100 polimer materyalinin şişirilmesi ve kolonda uygulanan tampon

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-baz	6.05 mg
950 mL saf suda çözülerek, 1M H ₂ SO ₄ ile pH'ı 7.4'e ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.	

2.1.4.14 CA-CO₂ Hidrataz EnzimAktivitesi için Kullanılan Tamponlar

Stop-Flow ve Maren metodu için doygun CO₂ çözeltisi: 20°C'de bidestile su içinden CO₂ geçirilerek hazırlanır.

Stop-Flow Tampon çözeltisi: 0.01 M HEPES 4-(hidroksil etil)-1-Piperazinetansulfonik asit 0.01 M Tris[hidroksimetil]aminometan hidroklorür (TRIZMA HIDROKLORÜR) , 0.1 M Na₂SO₄ pH 7.5.

Stop-Flow Fenol-red çözeltisi: 0.2 mM fenol red alınarak (pH 6.8-8.4) HEPES tamponu içerisine katılır.

Stop-Flow Stok CA enzim çözeltisi: Saflaştırılmış Maya CA için 1 x10⁻⁶M olarak kullanıldı.

Stop-Flow Stok inhibitör çözeltileri: Stok inhibitör çözeltiler 1 M olarak hazırlandıktan sonra, 1x10⁻⁶M, 1x10⁻⁴M ve 1x10⁻²M olarak hazırlanarak kullanıldı.

2.1.4.15 SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.23 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

Kimyasal Madde	Miktar
0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)	2.5 mL
% 10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkaptoetanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 g
Destile su	0.5 mL

Çizelge 2.24 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-HCl	3.0 g
Glisin	14.4 g
SDS	1.0 g
Destile su ile son hacim 1L'ye tamamlanır	

Çizelge 2.25 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı:

	Ayırma Jeli	Yığma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akrilamid/Bis (% 30)</u> Akrilamid 15 g Bisakrilamid 0.4 g Son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16.65 mL	2.6 mL
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<u>1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)</u> Tris-HCl 11.82 g pH:8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12.5 mL	—
<u>0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)</u> Tris-HCl 3.94 g pH:6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	—	5 mL
<u>% 10'luk SDS</u> SDS 1 g Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.5 mL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>% 10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1 g Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

Çizelge 2.26 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi:

Kimyasal Madde	Miktar
Coomassie Brilliant blue R-250	0.66 g
Metanol	120 mL
Glasiyal asetik asit	24 mL
Destile su	120 mL

Çizelge 2.27 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile su

Kimyasal Madde	Miktar
Metanol	50 mL
Glasiyal asetik asit	75 mL
Destile su	875 mL

2.2 METOD

2.2.1 Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Isıya dayanıklı malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, çözeltiler, kültür ortamları ve cam malzeme 121°C’ de 20 dakika (1.02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

2.2.2 DNA ile İlgili Teknikler

2.2.2.1 Maya Genomik DNA İzolasyonu

Maya genomik DNA izolasyonu [67]’de belirtildiği gibi yapıldı. 2 mL YPD kültürüne YPD agarda büyütülen mayadan tek koloni seçilerek ekimi yapıldı ve 30°C’ de 1 gece inkübe edildi. YPD kültüründe büyüyen mayadan 1.3 mL ependorf tüpüne aktarıldı ve 6000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Daha sonra pellet 1 mL destile suda dağıtıldı ve vorteks ile karıştırıldıktan sonra tekrar 6000 rpm’de 3 dakika süreyle santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler; Çizelge 2.2’de belirtilen maya hücre duvarını parçalama tamponunun 0.2 mL’sinde dağıtıldı ve 37°C’ de 1-2 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra Çizelge 2.3’de belirtilen lizis tamponunun 0.2 mL’sinde yavaşça alt üst edilerek yine dağıtıldı. Örnek, 65°C’de 20 dakika inkübe edildi ve hemen ardından buz ortamında soğutuldu. Buna 0.2 mL 5 M potasyum asetat (pH: 5.4) eklendi ve 15 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Tüp 3 dakika 13000 rpm’de santrifüj edildi ve süpernatant temiz tüpe aktarıldı. Etanol çöktürmesi ile elde edilen DNA 50 µL destile su içerisinde çözülerek -20°C’de saklandı.

2.2.2.2 Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu ve Etanol Çöktürmesi

RNA kirliliği içeren DNA örneğine 1 µL Ribonükleaz A ilave edildi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. DNA materyaline eşit hacimde Fenol pH: 8 ilave edildi. Vortekste 1 dakika karıştırıldı ve 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. En üstteki faz bir ependorfa aktarıldı. Kloroform:izoamil alkol (24:1)’ün eşit hacmi de alınarak 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatanta iki hacim % 95 etanol eklendi. En az 30 dakika -80 °C’de inkübe edildi. 10 dakika 10.000 rpm’de çevrildi. Süpernatant atıldı ve 700 µL %70’lik etanol eklenerek DNA pelleti yıkandı. Yıkama sonunda elde edilen pellet havada kurutuldu ve 30 µL destile su eklenerek -20°C’ de saklandı [68].

2.2.2.3 DNA Miktarı ve Kalitesinin Ölçülmesi

2.2.2.3.1 Spektrofotometrik Yöntem

DNA, 1:200 oranında destile su ile seyreltildi ve kuvartz küvetler kullanılarak 260 nm’de DNA’nın absorpsiyonu okundu. Aşağıda belirtilen formül kullanılarak DNA konsantrasyonu hesaplandı. Aynı zamanda elde edilen DNA’nın saflığı da OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranından belirlendi [69].

$$50\mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \text{mL’de } \mu\text{g cinsinden konsantrasyon}$$

2.2.2.3.2 Agaroz Jel Elektroforez

Görüntülenmesi gereken DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Agaroz jel elektroforezinde yürütülmek istenen DNA’nın büyüklüğüne bağlı farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. 0.5X TBE’de (Çizelge 2.7) % 0.7-2 olarak kaynatılarak hazırlanan agaroz jelleri, 50°C’ye kadar soğutulduktan sonra, son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde Etidyum bromür eklendi. Agaroz jel aparatlarına döküldü ve katılaşıncaya kadar beklenildi.

DNA örnekleri yükleme tamponuyla karıştırılarak agaroz jele yüklendi. Agaroz jelleri 80 Voltta yürütülerek, yükleme tamponu izlenerek, tampon jelinin $\frac{3}{4}$ 'ünü geçene kadar beklendi. Elektroforez sonucu UVP Jel Görüntüleme Sistemi kullanılarak resmi çekildi ve değerlendirildi.

2.2.2.4 Primer Tasarımı

Primer tasarlanırken www.restrictionmapper.org , www.bioinformatics.org ve www.idtdna.com adreslerinden yararlanılarak programlar kullanıldı. Primerler tasarlanırken çoğaltılacak genin içerisinde bulunmayan enzim kesim bölgeleri belirlendi, primerlerin kendi içerisinde saç tokası oluşturmamasına dikkat edildi. Primerleri kesen enzimlerin ortak çalıştıkları tampon seçildi ve T_m sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına dikkat edildi. Primerlerin T_m değerinin hesaplanması için en yaygın kullanılan formül aşağıdaki gibidir [69-72].

$$T_m = [(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2 + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4] ^\circ C$$

2.2.2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonüklotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama basamaklarını içerir [69].

Çizelge 2.28 PCR Reaksiyonu

	Örnek	Negatif Kontrol
Tampon 10X	5 µL	5 µL
Mg Cl ₂	4 µL (2 mM)	4 µL
dH ₂ O	32.5 µL	37.5 µL
dNTP mix (10 mM)	1 µL	1 µL
DNA örnek (3850 ng/µL)	5 µL	-
Primer Forward (100 µM)	1 µL	1 µL
Primer Reverse (100 µM)	1 µL	1 µL
Taq Polimeraz (500 EU)	0.5 µL	0.5 µL
Toplam	50 µL	50 µL

Çizelge 2.29 PCR Koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	2 dakika
2	35	94 °C	1 dakika
		57 °C	1 dakika
		72 °C	1 dakika
3	1	72 °C	10 dakika

2.2.2.6 pGEM-T Vektörüne NCE103 geninin klonlanması

PCR ile çoğaltılan geni uzun süre saklamak için plazmide klonlayarak hücre içerisine transforme edildi. pGEM-T vektörünün doğrusal olması ve uçlarında timin bazı bulunmasından dolayı herhangi bir kesime ihtiyaç duymadan, PCR ile çoğaltılan gen doğrudan vektöre klonlandı [65].

Çizelge 2.30 Ligasyon reaksiyonu

	Örnek NCE103	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
Buffer	5 µL	5 µL	5 µL
pGEM-T	1 µL	1 µL	1 µL
DNA (NCE103)	3 µL	-	-
Kontrol DNA	-	2 µL	-
T ₄ DNA Ligaz (1000 EU)	1 µL	1 µL	1 µL
dH ₂ O	-	1 µL	3 µL
Toplam	10 µL	10 µL	10 µL

Bütün çalışmalar buz üstünde yapılır ve reaksiyona en son enzim katılır. + 4°C’de 1 gece bekletildi.

2.2.2.7 Dizi Analizi

Genin Dizi analizi İngiltere de Lark Technologies Ltd. de yapılmıştır.

2.2.2.8 Plazmid DNA İzolasyonu (Alkalın Lizis Plazmid Miniprep)

Plazmid DNA izolasyonu [9]’da belirtildiği gibi yapıldı. Tek koloniden alınan bakteri 10 mL sıvı LB kültüre ekildi ve 37°C’ 16-18 saat inkübe edildi. 1.5 ml’lik ependorflara aktarıldı. 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılarak, pellet, 110 µl Solusyon I (Çizelge 2.4.) ile çözüldü. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Solusyon II (Çizelge 2.5)’den 200 µl eklenerek yavaşça karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Buzda bekletilmiş tüpe, Solusyon III (Çizelge 2.6)’den 150 µl eklendi. 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek hücre yığınıyla kromozomal DNA’nın birbirinden ayrılması sağlandı. Supernatant, yeni bir ependorfa aktarıldı. Fenol/kloroform ve etanol çöktürmesi ile elde edilen plazmid DNA 30 µl steril destile H₂O da çözülerek –20°C’de saklandı.

2.2.2.8.1 *E. Coli*'den Mini Prep Kiti ile Plazmid DNA İzolasyonu

E. Coli'den plazmid DNA izolasyonu ayrıca QIAprep Spin Miniprep Kiti (Qiagen-Kat.No:27104) ile de yapıldı.

2.2.2.9 NCE103 Geninin pET21a Vektörüne Klonlanması

Halkasal yapıda olan pET21a vektörüne geni klonlamak için vektör, önce BamH I ve Sac I enzimleri ile kesildi. Daha önce izole edilen pGEM-T vektöründen BamH I ve Sac I enzimleri ile NCE103 geni kesildi. Jelde yürütülen gen geri kazanıldı ve kesilmiş olan pET21a vektörüne [65]'deki protokole göre klonlandı.

2 µL - 10X T ₄ DNA Ligaz Tamponu	
1 µL - T ₄ DNA Ligaz (1000 EU)	
3 µL - pET21a vektör (kesilmiş)	
14 µL - NCE103 geni (kesilmiş)	
20 µL Toplam hacim	1 gece +4°C'de inkübasyona bırakıldı

2.2.2.10 Agaroz Jelde Yürütülen Vektör ve Genlerin Geri Kazanılması

Kesilen vektörleri ve genleri geri kazanmak için QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen -Kat.No: 28704) kullanıldı.

2.2.3 Mikrobiyolojik Metotlar

2.2.3.1 Ön Kültür Hazırlanması

LB-agar'a tek koloni olacak şekilde ekilen bakteri kolonilerinden tek bir koloni önce, son konsantrasyonu 10 µg/mL olan ampisilin içeren LB ortamına aşılandı. 37°C' de çalkalayıcı inkübatörde 16-18 saat inkübe edildi.

2.2.3.2 Bakteri Stoklarının Korunması

İlgili bakteri soyları ve plazmid soyları ön kültürle üretildikten sonra %30'luk steril gliserolle son konsantrasyonu % 15 olması sağlandı ve -80°C 'de depolandı.

2.2.3.3 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlanması

E.coli'nin DH5a soyunu kompetent hale getirmek için tek koloni olarak ekildiği LB-Agar üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C ' de bir gece boyunca üremeye bırakıldı. Bundan alınan 5 mL örnek, içinde 100 mL taze LB olan 500 mL'lik erlene aktarıldı ve 37°C 'de yaklaşık 2-3 saat $\text{OD}_{600} = 0.4$ 'e ulaşmaya kadar inkübe edildi. Bu aşamada kültür, 5 dakika buzda bekletildi. Kültür, falkonlara alınarak $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 5 dakika 3000 rpm'de santrifüjlendi. Supernatant atıldı ve 25 mL soğuk 0.1 M CaCl_2 konuldu ve yavaşça karıştırıldı. 2 dakika buzda bekletildi. $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 10 dakika 3000 rpm' de santrifüjlendi. 10mL soğuk 0.1 M CaCl_2 'de 1-4 saat bekletildi. 10 mL steril % 40 gliserol eklenerek hafifçe karıştırıldı. Önceden buz üzerinde bekletilmiş ependorflara aktarılacak -80°C ' ye konuldu [68,73].

Ayrıca; ekspresyonda kullanılan BL-21(DE3) Codon plus soyu kompetent hale getirmek için tek koloni olarak ekildiği LB-Agar üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C 'de bir gece inkübe edildi. Ortamdan alınan 5 mL'lik örnek, içinde 100 mL taze LB bulunan 500 mL'lik erlene aktarıldı ve 37°C ' de yaklaşık 2-3 saat $\text{OD}_{600}=0,2$ 'e ulaşmaya kadar inkübe edildi. Ortama son konsantrasyon 20 mM MgCl_2 ve yaklaşık olarak % 0.2 olacak şekilde glukoz çözeltileri ilave edildi. Tekrar 37°C 'de çalkalamalı inkübatörde $\text{OD}_{600} = 0.5$ olana kadar inkübe edildi. Kültür $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat bekletildi ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırılıp, pellet uygulama tamponunda (100 mM CaCl_2 , 70 mM MnCl_2 , 40 mM CH_3COONa , pH=5.5) süspanse edildi. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet %15 gliserol içeren 25 mL uygulama tamponu ile süspanse edilir. Önceden buz üzerinde bekletilmiş ependorflara aktarılacak -80°C ' de depolandı [74].

2.2.3.4 Transformasyon

-80 °C'deki kompetent hücreler 5 dakika buzda bekletildi. Ependorfa 50 µL kompetent hücrelerden alındı ve her bir tüpe 3 µL ligasyon çözeltisinden (plazmidten) ilave edildi. Dikkatlice karıştırılarak 20 dakika buzda bekletildi. Sıcak şoku için 42°C' de 45-50 saniye tutuldu ve hemen buza alınarak burada da 2 dakika bekletildi. Ortama 37°C'deki 950 µL LB eklendi. 37 °C' de çalkalamalı etüvde 1-1.5 saat inkübe edildi. Ekim yapmadan 30 dk önce LB-agar + Ampisilin platelerine 20 µL (50 mg/ml) X-Gal ve 100 µL 0,1 M IPTG yayıldı. (X-Gal ve IPTG sadece pGEM-T vektörüne klonlamada mavi beyaz koloni seçimi için uygulanır). Bu kültürün 100 µL'si alınarak taze hazırlanmış, 100 µg/mL ampisilin içeren LB-agar petrisine damlatılarak öze ile tek koloni tarzında ekim yapıldı [65].

2.2.3.5 Rekombinant Protein Ekspresyonu

2.2.3.5.1 IPTG Kullanılarak Hedef Proteinin İndüklenmesi

Ekspresyonu T7 promoter sistemi ile başlatılması için, ilgili genleri taşıyan pET plazmid, BL-21 DE3 hücrelerine transforme edildi. 500 mL'lik steril erlene 100 mL LB konuldu ve 12.5 mg/mL ampisilinden 100 µL katıldı. LB-Agar + Ampisilin petri kabı üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C' de 300 rpm de 3-4 saat inkübasyona bırakıldı.

OD₅₅₀ = 0.6-0.8'e ulaştığında 250 µL 5 mM ZnCl₂ ve 400 µL 0.1M IPTG bakteri kültürüne eklendi. Kültür 30°C' de 300 rpm'de büyümeye bırakıldı [75,76].

2.2.3.5.2 Bakterilerin Yıkanması

Bakteri solüsyonu 50 mL'lik falkonlara aktarıldı ve 3000 rpm'de +4°C' de 10 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı ve bakteriyel hücre pelleti 10 mL 50 mM Tris, pH:7.6 tamponu ile süspanse edildi. 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj sonrası

supernatant uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı ve pelletler kurutularak -20°C’ de liziz prosedürüne geçmeden önce saklandı [75,76].

2.2.3.5.3 Bakteri hücrelerinin Lizisi

Bakteriyel hücre pelleti 10 mL soğuk lizis tamponu ile süspanse edildi ve buz ortamına alındı. 100 µL 100 mM PMSF ve 250 µL 10 mg/mL lizozim çözeltilerinden ilave edildi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 100 µL 5 mM ZnCl₂ eklendi ve 10 dakika buzda bekletildi. Hücre lizatına 1 mL %3’lük protamin sülfat çözeltisinden eklendi ve pipetajla karışması sağlandı. Falkon tüpü içerisindeki örnek 3000 rpm’de +4°C’ de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlenen örneğin viskozitesi kontrol edilip, hala viskoz ise %3’lük protamin sülfat çözeltisinden 500 µL daha eklendi. Tekrar karıştırıldı ve 3000 rpm’de +4°C’ de 2 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant temiz bir falkon tüpe alındı [75,76].

2.2.4 Biyokimyasal Metodlar

2.2.4.1 Afinite Kromatografisi

2.2.4.1.1 Karbonik Anhidraz Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose 4B katı destek materyali üzerinde hazırlandı. Sepharose 4B’nin serbest –OH grupları CNBr ile aktifleştirilmiştir. Sepharose 4B afinite jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, L-tirozin kovalent olarak bağlandı. Sülfonamid diazolanarak L-tirozine kenetlendirildi. Burada, tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfonamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfonamid karbonik anhidraz enziminin spesifik inhibitörü olup afinite jelinin yapısına katılarak CA enziminin saflaştırılmasında kullanılmıştır.

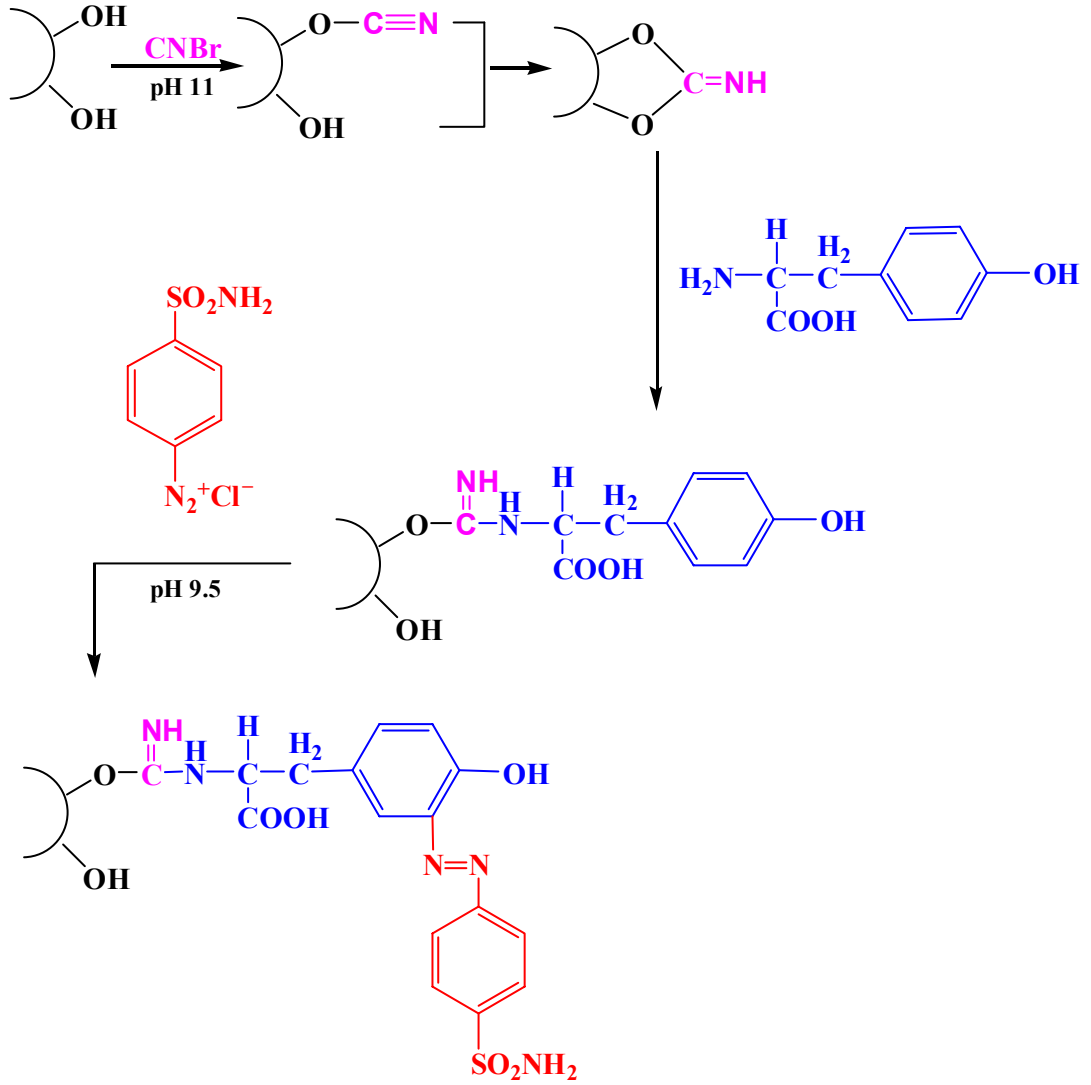
Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı;

- **Sepharose 4-B'nin aktifleştirilmesi ve L-Tirozinin Jele Eklenmesi**

20 mL Sepharose 4B jeli destile su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde destile su ile birleştirilerek bir süspansiyon elde edildi. Karıştırılan süspansiyona 4 g toz haline getirilmiş CNBr katıldı. pH metre ile süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile pH 11'de sabit tutuldu. Buz ilavesi ile reaksiyon sıcaklığı 20°C'de tutuldu. Reaksiyona pH değışmeyinceye kadar devam edildi (15-20 dakika). Karışım bir Bushner hunisine aktarıldı, 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO₃ tampon çözeltisi (pH 10) ile yıkandı ve bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 8 mg tirozin çözöldü. Beherdeki karışıma tirozinin soğuk çözeltisi yavaşça ilave edildi ve 90 dakika süreyle karıştırıldı. Karışım 4°C 16 saat bekletildi. Sürenin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen ortamdan uzaklaştırıldı. Yıkama 100 mL 0.2 M NaHCO₃ tamponu (pH 8.8) ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

- **Sülfonamidin Kenetlenmesi**

25 mg p-amino benzen sülfonamid, 0°C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözöldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0°C'deki 5 mL çözelti, sülfonamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış olan sülfonamid 40 mL Sepharose 4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH:9.5 değerine çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1L destile su ve 200 mL 0.05 M Tris-SO₄ (pH 7.5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde saklandı [74].



Şekil 2.3 Afinite jeli sentezinin şematik gösterimi.

2.2.4.1.2 Enzim Çözeltilisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1×10 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek dengeleme tamponu: 25 mM Tris-HCl/22 mM Na_2SO_4 /0.05 mM EDTA (pH 8.7) ile, üstten ilave edilen ve alttan toplanan tamponun pH değerleri birbirleriyle eşit oluncaya kadar yıkanarak dengeleme sağlandı. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yıkama tamponu: 25 mM Tris-HCl/22 mM Na_2SO_4 /0.05 mM EDTA (pH 8.7) ile yıkandı. Böylece CA'nın büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Daha sonra elüsyon tamponu:

0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6) tamponu ile enzim elüsyonu yapıldı ve 2'er mL halinde tüplerde toplandı. Elüatlarda 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı ve enzim aktivitesine bakıldı [74].

2.2.4.2 CO₂-Hidrataz Aktivitesi

Karbonik anhidraz enziminin, saflaştırılma sürecindeki aktivite tayinleri, CO₂-hidrataz aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Maren ve arkadaşlarının geliştirdikleri bu yöntem, CA enziminin saflaştırılma sürecinde diğer araştırmacılar tarafından yaygın olarak uygulanmıştır.

Bu yöntem, CO₂'nin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ nedeniyle pH değerinin 10.0'dan 7.4'e düşmesi süresinin ölçümüne dayanır. Yöntemde indikatör olarak, pH 7.4 değerinde renk değiştiren fenol kırmızısı, tampon olarak da pH değeri 10.0 olan karbonat tamponu (0.15M Na₂CO₃ / 0.1M NaHCO₃) kullanıldı [2].

Reaksiyon tüpüne önce 2 mL indikatör ve 1.5 mL doygun CO₂ çözeltileri konuldu. Bu karışımın üzerine, enzim çözeltisinden 0.1 mL ve aynı anda karbonat tamponundan 0.4 mL ilave edilerek, rengin kırmızıdan sarıya (pH değerinin 10.0'dan 7.4'e) dönüşmesi için geçen süre belirlendi (tc). Aynı işlemler, enzim çözeltisi yerine 0.1 mL destile su eklenerek yapıldı (to). Yönteme göre CA enzim aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Buna göre;

$$EU = (to) - (tc) / (tc)$$

formülü uygulanarak, kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi değeri hesaplanır.

2.2.4.3 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Lizis sonrası ekstraktın hacmi, S_1 : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu, S_2 : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Jel Filrasyon Kromatografisi için kolona uygulanacak numunenin derişik olması gerektiğı için hücre ekstraktı %80 doygunluğa getirildi ve 15000 rpm'de 30 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Çökelek çok az miktardaki 0.05 M Tris-SO₄ tamponunda (pH 7.4) çözöürölerek kolona uygulanabilir duruma getirildi.

2.2.4.4 Jel Filtrasyon Kromatografisi

Bu teknik, çok ılımlı şartlarda proteinler, polisakkaritler, nükleik asitler ve birçok polipeptidleri saflaştırmak için kullanılır. Jel Filtrasyon Kromatografisinin (JFK) temel prensibi, molekül büyüklüğüne göre bileşikleri ayırmaktır. Bu teknikte sabit fazı jel partikülleri oluştururken hareketli faz ise, yürütücü ve elüsyon çözeltisi olarak kullanılan su ya da tampon çözeltileridir.

1 g Sephadex G-100 200 mL 0.05 M Tris-SO₄ tamponu (pH:7.4) içine alınır. 72 saat 25° C'de bekletilerek polimer materyal (Sephadex G-100) şişirilir. Polimer materyalin içindeki hava, su trompu kullanarak vakumla uzaklaştırılır. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali pH'sı 7.4 olan 0.05 M Tris-SO₄ tamponunda içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde kolona aktarılır. Sistem aynı tamponla dengeye getirilir. Kolonun akış hızı ayarlanır ve amonyum sülfat çöktürmesi ile deriştirilen numune kolona uygulanır. Numune, jelde ilerlerken kolona sürekli tampon ilavesi yapıldı ve eluatlar toplandı [77].

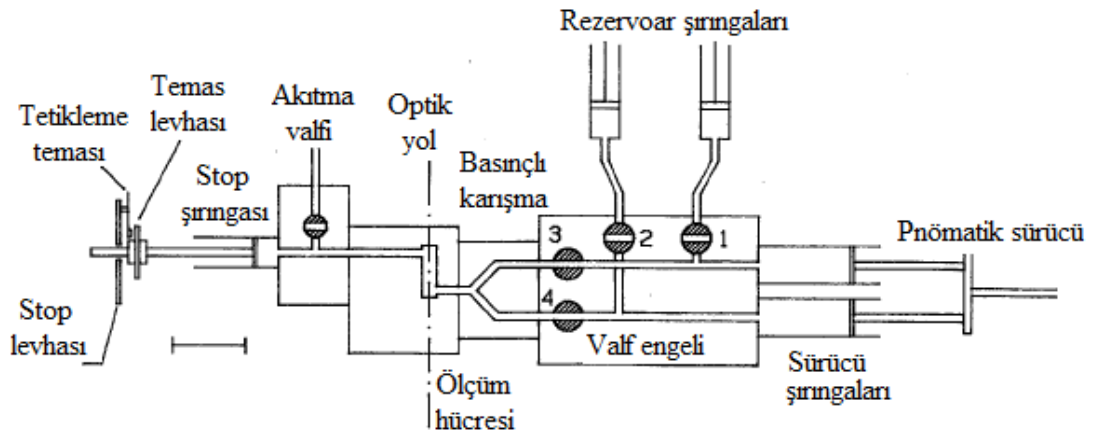
2.2.4.5 Kalitatif Protein Tayini

Kromotografi işlemleri sonunda, eluatlar eşit hacimde alınarak bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi prensibine dayanmaktadır [74]. Kolon fraksiyonları eşit hacimde kuvars küvetlere alınarak, absorbansları UV-spektrofotometrede köre karşı okundu. Örnekler SDS-PAGE ile görüntülenerek Maya CA’nın bulunduğu tüpler tespit edildi.

2.2.4.6 CO₂-Hidrataz Aktivitesi (Stopped Flow Kinetik Cihazı ile)

SX.18MV-R Applied Photophysics Stopped-flow (SF) aleti CA-CO₂ hidratasyon aktivitesi için kullanıldı. Bu alet, hızlı kimyasal, biyokimyasal ve biyolojik reaksiyonların stop-flow ile başlamalarını sağlar. Bu yöntemde reaktifler aynı anda enjekte edilirler karışma bölümüne ve hemen reaksiyona girerler. Daha sonra karışım, ölçüm hücresine doğru ilerleyip stop şırıngasına kadar devam eder ve bu esnada ölçümü alınır (Şekil 2.4) [78].

Temel avantajları arasında, fizyolojik şartlar altında pH ve sıcaklık, reaksiyon zamanlarının ve reaktif miktarlarının indirgemesine sahip olma, tekrarlanabilir üretim verilebilir.



Şekil 2.4 SF cihazının diagramı



Şekil 2.5 SF cihazının fotoğrafı

2.2.4.7 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Ekspresyon sonucunda elde edilen CA enzimi ekstraktı jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofözezi (SDS-PAGE) Laemelli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [79].

Bu amaçla elektroföze cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Çizelge 2.18’te belirtildiği gibi hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-bütanol uzaklaştırıldı. Daha sonra cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin

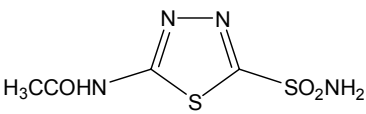
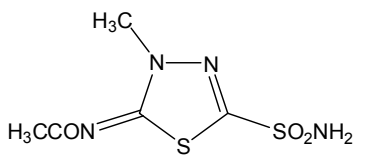
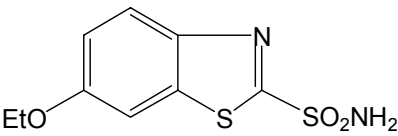
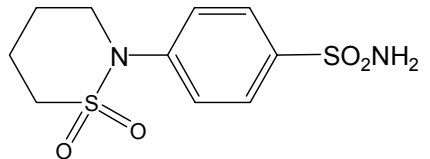
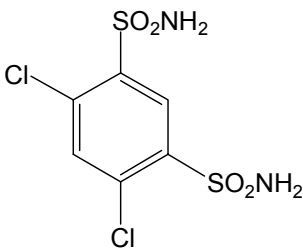
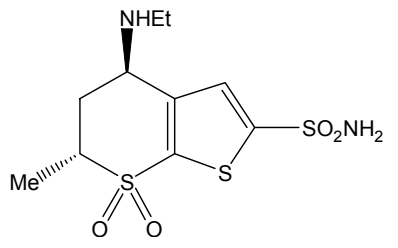
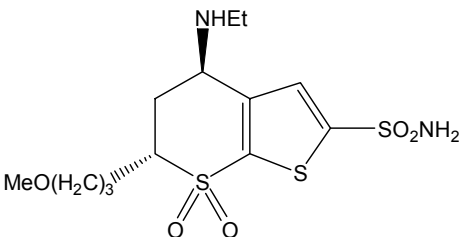
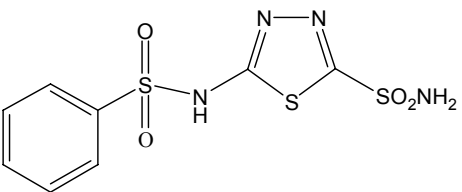
polimerleşmesi beklendi. (yaklaşık 30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Jel filtrasyon kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutularak enjektörle kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volta ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline vardığında voltaj 200 volta çıkartıldı. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jel kesililip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1-1.5saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renk açma çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel, renk açma çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

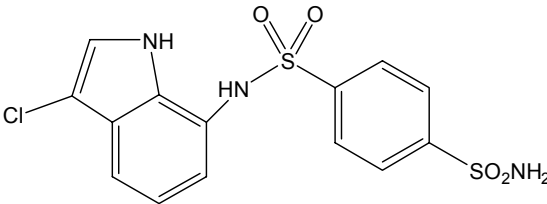
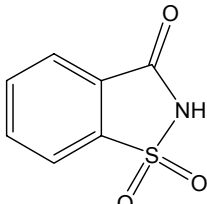
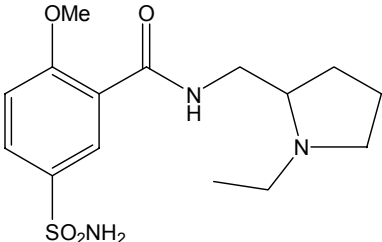
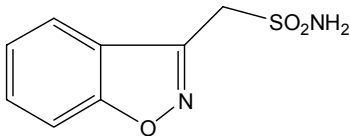
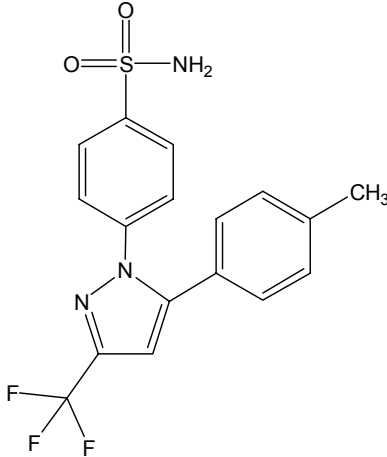
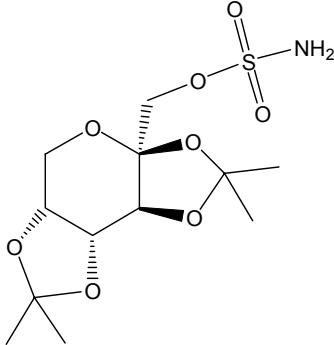
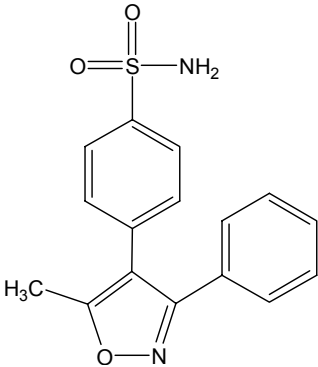
2.2.4.8 İnhibitörler için IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Farklı inhibitörlerin IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda CO₂ substratının 70 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce inhibitör olmadan ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar Stop Flow aletinde 557 nm'de HEPES tamponuna karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite – [I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Çizelge 2.31 Maya CA inhibisyonunda kullanılan inhibitörler

	
Asetazolamid	Metazolamid
	
Etokszolamid	Sultiam
	
Diklorfenamid	Dorzolamid
	
Brinzolamid	Benzolamid

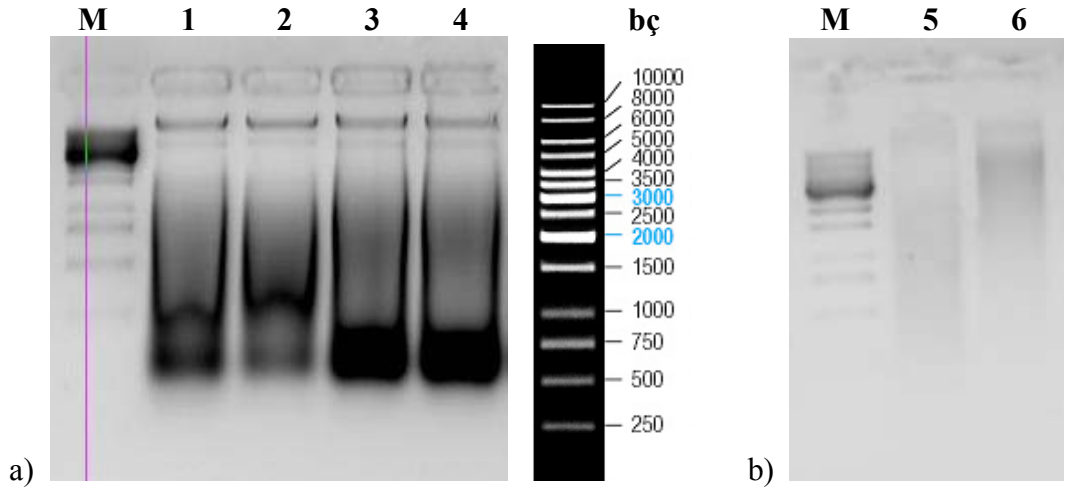
Çizelge 2.22'nin devamı

	
İndisulam	Sakarin
	
Sulpirid	Zonisamid
	
Selekoksisib	Topiramate
	
Valdekoksib	

3. BULGULAR

3.1 Maya Genomik DNA'sı

Prof. Karl Entian'dan temin edilen *Saccharomyces cerevisiae* maya soyu prosedüre göre YPD agarlı petriye ekildi ve bir gece 30 °C'de büyümeye bırakıldı. Petri kabında büyüyen mayalardan tek koloni seçilerek sıvı YPD'ye ekimi yapıldı ve bir gece 30 °C'de inkübe edildi. Prosedüre göre mayanın genomik DNA'sı izole edildi. Elde edilen DNA örnekleri %0,8'lik agaroz jele yüklendi ve yürütüldü. İzole edilen DNA örneklerinin çok fazla miktarda RNA kirliliği içerdiği gözlemlendi ve Ribonükleaz A ile muamele ederek Fenol/Kloroform ekstraksiyonu yapıldı ve etanol çöktürmesi sonucu temiz DNA elde edildi.



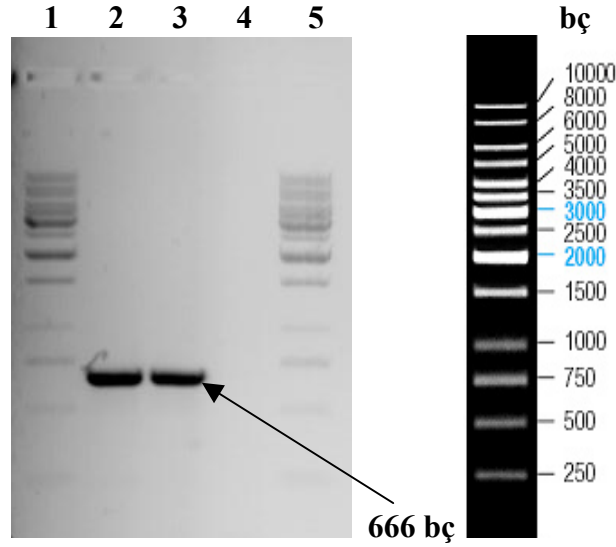
Şekil 3.1 a)Maya Genomik DNA'sı. M marker, 1-4 DNA örnekleri b) Yıkama sonrası Maya Genomik DNA'sı. M marker, 5-6 yıkanmış DNA. .

3.2 Primer Tasarımı

Primer tasarlanırken www.restrictionmapper.org , www.bioinformatics.org ve www.idtdna.com adreslerinden yararlanılarak buradaki programlar kullanıldı. Önce NCE103 genini kesen ve kesmeyen enzimler saptandı. Geni kesmeyenler arasından pET21a vektörünün klonlama bölgesindeki enzimlere bakıldı ve burada bulunan BamH I ve Sac I enzim kesim bölgeleri seçilerek primerlerde kullanıldı. Tasarlanan primerlerin kalıp DNA'ya bağlanmasını engelleyecek şekilde kendi içerisinde hairpin (saç tokası) oluşturup oluşturmadığına bakıldı. Primerlerin özelliklerine bakılarak birbirine yakın olmalarına dikkat edildi. T_m sıcaklıklarının birbirine yakın olması ve nükleotidlerin dağılımı mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi.

Çizelge 3.1 Maya CA primerleri

Primerin Adı	Uzunluk bç	% GC oranı	T_m °C	Dizisi
Forward	22	54.55	64.54	5'-A <u>GGATCC</u> ATGAGCGCTACCGAA-3' BamHI
Reverse	22	45.45	60.81	5'-A <u>GAGCTC</u> CTATTTTGGGGTAAC-3' SacI



Şekil 3.3 PCR sonucu oluşan ürün; 1. ve 5. Marker, 2. ve 3. PCR ürünü, 4. PCR negatif kontrol.

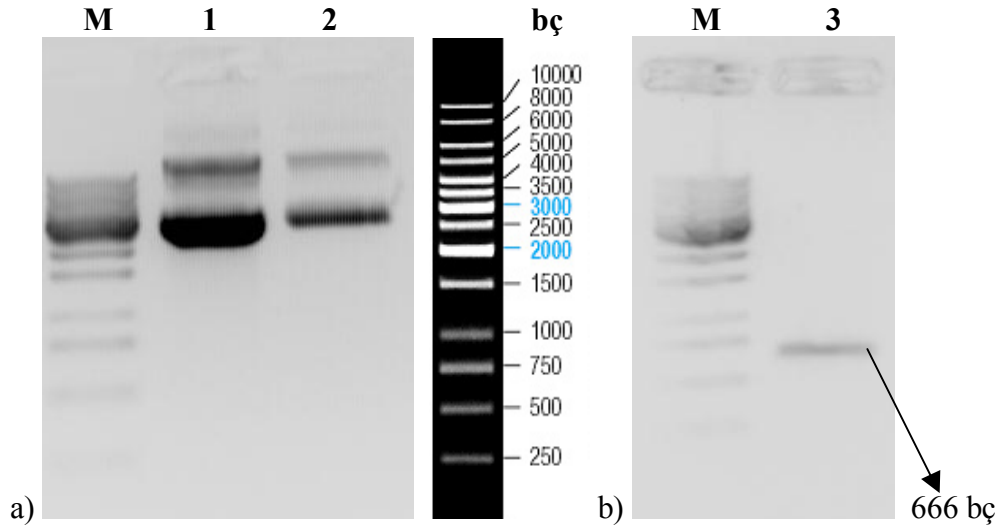
3.4 NCE103 Geninin pGEM-t Vektörüne Klonlanması ve *E.coli*'ye Transformasyonu

pGEM®-T Vector Systems (Promega) kiti kullanarak Promega'nın protokolüne göre pGEM-T vektörü ile PCR sonucu elde edilen NCE103 geni bir gece +4 °C'de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü DH5a *E.coli* soyuna transforme edildi. Ampisilin içeren LB agarlı petri kaplarına X-Gal ve IPTG yayıldı ve bu petri kaplarına transformasyon ürünlerinden ekim yapıldı ve bir gece 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petri kaplarında mavi beyaz koloniler oluştu. Hiçbir DNA parçası içermeyen negatif kontrolde sadece mavi koloniler oluştu. Bunlar da pGEM-T vektörünün kendisi halkalaşarak hücreye transforme olması sonucu ampisiline direnç kazanarak mavi koloni oluşturur. Kontrol DNA içeren pozitif kontrolde hem beyaz hem de mavi koloniler oluştu. NCE103 geni ile transforme edilen hücrelerden mavi beyaz koloniler oluştu. Beyaz koloniler NCE103 genini içeren pGEM-T vektörüne sahip hücrelerdir. Beyaz kolonilerden LB sıvı kültürüne tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. QIAprep Spin Miniprep Kiti ile plazmid izolasyonu yapıldı ve plazmidler BamH I ve Sac I restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim sonucu agaroz jelde yürütüldü ve vektörden kesilen gen QIAquick

Gel Extraction Kiti ile geri kazanıldı. Geri kazanılan maya NCE103 geni tekrar agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.



Şekil 3.4 Transformasyon sonrası oluşan mavi beyaz koloniler.



Şekil 3.5 a) Mini Prep Kiti ile pGEM-T + NCE103 plazmidinin izolasyonu; M. 1 kb'lık Marker, 1. ve 2. pGEM-T + NCE103 plazmidi. b) M. 1kb'lık Marker, 3. BamH I ve Sac I enzimleri ile kesilen pGEM-T+NCE103 plazmidinden, Jel Ekstraksiyon Kiti ile geri kazanılan kesilmiş NCE103 geni.

3.5 Dizi Analizi

Beyaz kolonilerden sıvı LB kültürüne tek koloni ekimi yapıldı ve bir gece 37 °C’de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Bu hücre kültüründen gliserol stok hazırlandı. Beyaz kolonilerin içerdiği vektördeki DNA parçasının PCR ile çoğaltmış olduğumuz gen olup olmadığını belirlemek için vektör otomatik dizi analizi ile kontrol edilmiştir. Bu amaçla ampisilin içeren LB agar petrisinde ekili olan klon LARK Technologies, UK ye gönderilmiştir. Elde edilen dizi analizi sonuçları biyoinformatik olarak NCBI’da analiz edilmiş, Maya CA geni ile karşılaştırılmıştır(Şekil 3.7) ve gen aminoasit dizisine çevrilmiştir (Şekil3.6). Kristal yapıları aydınlatılmış olan bazı β -CA’ların amino asit dizileri ile Maya CA’nın amino asit dizisi arasında karşılaştırılması yapılmıştır ve Maya CA’nın Zn^{2+} iyonunu koordine eden amino asitleri tespit edilmiştir (Çizelge 3.2 [80]’deki kaynaktan uyarlanmıştır).

Çizelge 3.2 Maya CA’nın diğer β -CA yapıları ile karşılaştırılması

β -CA kaynağı	Maya CA ile % benzerlik	Zn ²⁺ iyonunu koordine eden amino asitler			
		Cys ⁵⁷	His ¹¹²	Cys ¹¹⁵	Asp ⁵⁹
<i>M. thermoautotrophicum</i>	33	Cys ³²	His ⁸⁷	Cys ⁹⁰	Asp ³⁴
<i>Pisum sativum</i>	41	Cys ¹⁶⁰	His ²²⁰	Cys ²²³	Asp ¹⁶²
<i>E. coli</i>	29	Cys ⁴²	His ⁹⁸	Cys ¹⁰¹	Asp ⁴⁴
<i>M. tuberculosis</i> , Rv3588c	21	Cys ⁵¹	His ¹⁰⁴	Cys ¹⁰⁷	Asp ⁵³
<i>M. tuberculosis</i> , Rv1284	28	Cys ³⁵	His ⁸⁸	Cys ⁹¹	Asp ³⁷
<i>P. pupureum</i>	35	Cys ⁴⁰³	His ⁴⁵⁹	Cys ⁴⁶²	Asp ⁴⁰⁵
<i>Pichia stipitis</i>	37	Cys ⁹³	His ¹⁴⁸	Cys ¹⁵¹	Asp ⁹⁵
<i>Candida albicans</i>	37	Cys ¹⁰⁶	His ¹⁶¹	Cys ¹⁶⁴	Asp ¹⁰⁸
<i>Candida glabrata</i>	54	Cys ⁵³	His ¹⁰⁸	Cys ¹¹¹	Asp ⁵⁵
<i>Aspergillus fumigatus</i>	36	Cys ¹¹⁹	His ¹⁷⁵	Cys ¹⁷⁸	Asp ¹²¹
<i>Aspergillus clavatus</i>	35	Cys ⁷⁷	His ¹²³	Cys ¹²⁶	Asp ⁷⁹

atgagcgctaccgaatcttcatctatattcacattgagtcacaactcaaacctacaagatatcttggccgccaatgccaaatgg
M S A T E S S S I F T L S H N S N L Q D I L A A N A K W
gcctcccagatgaacaacatacagccaactttgttcccagatcacaatgcgaaggccagtcscctcacactctttcatcggc
A S Q M N N I Q P T L F P D H N A K G Q S P H T L F I G
tgctccgattcgcgttacacgaaaactgtttagggtgtcttgcggcggaagtgttcaacttggaaaaatgttgtaacatatgt
C S D S R Y N E N C L G V L P G E V F T W K N V A N I C
cactcagaggatttaactttgaaggccacttttagagtttgccattatttgcctaaaagttaacaaagtattatttggccac
H S E D L T L K A T L E F A I I C L K V N K V I I C G H
actgattgtggtgtataaagacatgtttaactaaccaaagggaagccttaccaaaagttaactgttctcatctgtacaagtac
T D C G G I K T C L T N Q R E A L P K V N C S H L Y K Y
ttagacgatattgacaccatgtaccatgaagagtcacaaaatttgatccatttgaaaacgcaacgtgaaaaatctcattacctg
L D D I D T M Y H E E S Q N L I H L K T Q R E K S H Y L
tcgcactgtaacgtcaaaaggcagtttaatataggattattgaaaaccctactgtgcaaacgtgtgtacaaaatggagaattacag
S H C N V K R Q F N R I I E N P T V Q T A V Q N G E L Q
gtatacggctgtctttacaacgtagaggacggctactgcaaacagttagcacttacacaaaagttaccccaaatag
V Y G L L Y N V E D G L L Q T V S T Y T K V T P K -

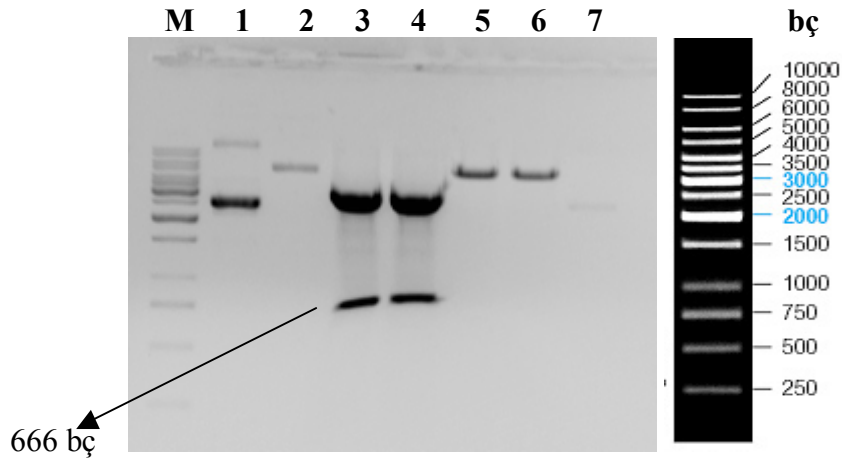
Şekil 3.6 NCE103 geninin aminoasit dizisine çevrilmesi

NCE103	1	ATGAGCGCTACCGAATCTTCATCTATATTCACATTGAGTCACAACCTCAAACCTACAAGAT	60
MayaCA	736	ATGAGCGCTACCGAATCTTCATCTATATTCACATTGAGTCACAACCTCAAACCTACAAGAT	677
NCE103	61	ATCTTGGCCGCCAATGCCAAATGGGCCTCCAGATGAACAACATACAGCCAACCTTTGTTTC	120
MayaCA	676	ATCTTGGCCGCCAATGCCAAATGGGCCTCCAGATGAACAACATACAGCCAACCTTTGTTTC	617
NCE103	121	CCAGATCACAATGCGAAGGGCCAGTCCCTCACAACCTCTTTTCATCGGCTGCTCCGATTTCG	180
MayaCA	616	CCAGATCACAATGCGAAGGGCCAGTCCCTCACAACCTCTTTTCATCGGCTGCTCCGATTTCG	557
NCE103	181	CGTTACAACGAAAACTGTTTAGGTGTCTTGCCCGGCGAAGTGTTCACTTGGAAAAATGTT	240
MayaCA	556	CGTTACAACGAAAACTGTTTAGGTGTCTTGCCCGGCGAAGTGTTCACTTGGAAAAATGTT	497
NCE103	241	GCTAACATATGTCACTCAGAGGATTTAACTTTGAAGGCCACTTTAGAGTTTGCCATTATT	300
MayaCA	496	GCTAACATATGTCACTCAGAGGATTTAACTTTGAAGGCCACTTTAGAGTTTGCCATTATT	437
NCE103	301	TGTCTAAAAAGTTAACAAAGTTATTATTGTGGCCACACTGATTGTGGTGGTATAAAGACA	360
MayaCA	436	TGTCTAAAAAGTTAACAAAGTTATTATTGTGGCCACACTGATTGTGGTGGTATAAAGACA	377
NCE103	361	TGTTTAACTAACCAAAGGGAAGCCTTACCAAAGTTAACTGTTCTCATCTGTACAAGTAC	420
MayaCA	376	TGTTTAACTAACCAAAGGGAAGCCTTACCAAAGTTAACTGTTCTCATCTGTACAAGTAC	317
NCE103	421	TTAGACGATATTGACACCATGTACCATGAAGAGTCACAAAATTTGATCCATTTGAAAACG	480
MayaCA	316	TTAGACGATATTGACACCATGTACCATGAAGAGTCACAAAATTTGATCCATTTGAAAACG	257
NCE103	481	CAACGTGAAAAATCTCATTACCTGTGCGACTGTAACGTCAAAAGGCAGTTTAAATAGGATT	540
MayaCA	256	CAACGTGAAAAATCTCATTACCTGTGCGACTGTAACGTCAAAAGGCAGTTTAAATAGGATT	197
NCE103	541	ATTGAAAACCTACTGTGCAAACTGCTGTACAAAATGGAGAATTACAGGTATACGGTCTG	600
MayaCA	196	ATTGAAAACCTACTGTGCAAACTGCTGTACAAAATGGAGAATTACAGGTATACGGTCTG	137
NCE103	601	CTTTACAACGTAGAGGACGGTCTACTGCAAAACAGTTAGCACTTACACAAAAGTTACCCCA	660
MayaCA	136	CTTTACAACGTAGAGGACGGTCTACTGCAAAACAGTTAGCACTTACACAAAAGTTACCCCA	77
NCE103	661	AAATAG	666
MayaCA	76	AAATAG	71

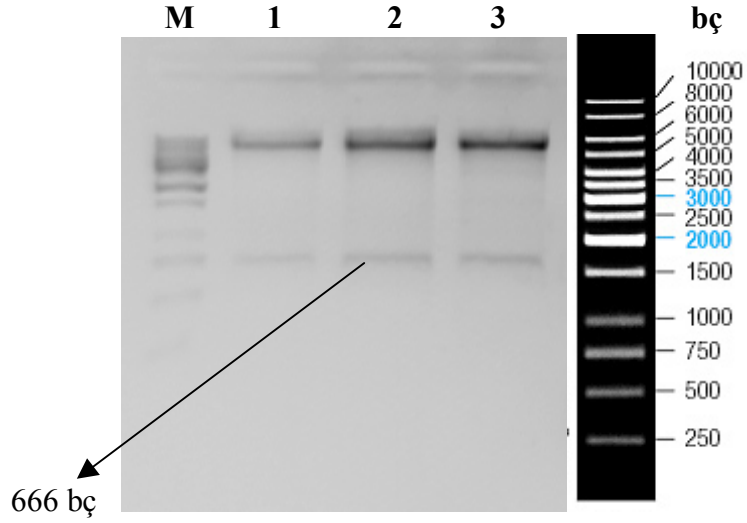
Şekil 3.7 NCE103 geni ile dizi analizinden gelen Maya CA dizisinin karşılaştırılması

3.6 NCE103 Geninin pET21a Vektörüne Klonlanması ve *E.coli*'ye Transformasyonu

Halkasal yapıda olan pET21a vektörü BamH I ve Sac I restriksiyon enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Daha önce pGEM-T vektöründen kesilerek geri kazanılan NCE103 geni ile kesilmiş olan pET21a vektörü Promega'nın protokolüne göre 1 gece +4 °C'de inkübe edildi. Ligasyon ürünü BL-21 Codon Plus *E.coli* soyuna transforme edildi. Ampisilin içeren LB agarlı petri kaplarına transformasyon ürünlerinden ekim yapıldı ve bir gece 37°C'de inkübe edildi. Oluşan kolonilerin ligasyon ürünü içerip içermediklerini kontrol etmek için tek kolonilerden ampisilinli sıvı LB kültürüne ekimi yapıldı ve bir gece 37°C'de inkübe edildi. Büyümüş olan hücre kültürünün bir kısmından gliserol stok hazırlandı ve etiketlenerek -80°C'de saklandı. Geri kalan hücre kültüründen Mini Prep Kiti ile plazmid izolasyonu yapıldı ve NCE103 genini içerip içermediğini kontrol etmek için BamH I ve Sac I kesim enzimleri ile plazmid kesildi. Reaksiyon sonucunu görmek için agaroz jelde yürütüldü. NCE103 genini içeren kolonideki plazmidin kesiminde çift bant gözlemlendi; genin bulunduğu ve plazmidin bulunduğu bölgelerde.



Şekil 3.9 M. Marker, 1. pGEM-T + NCE103 plazmidinin izolasyonu, 2. pET21a vektörü izole edilmiş, 3. ve 4. pGEM-T + NCE103 kesim sonucu, 5. ve 6. pET21a kesim sonucu, 7. pGEM-T + NCE103 plazmidinin izolasyonu – 2. elüsyon



Şekil 3.10 M. Marker, 1., 2. ve 3. sırası ile 1 , 1.1 ve 2 numaralı örneklerden izole edilen pET21a + NCE103 plazmidinin kesim sonuçları.

3.7 Maya CA'nın Ekspresyonu ve Saflaştırılması

3.7.1 Maya CA'nın Ekspresyonu

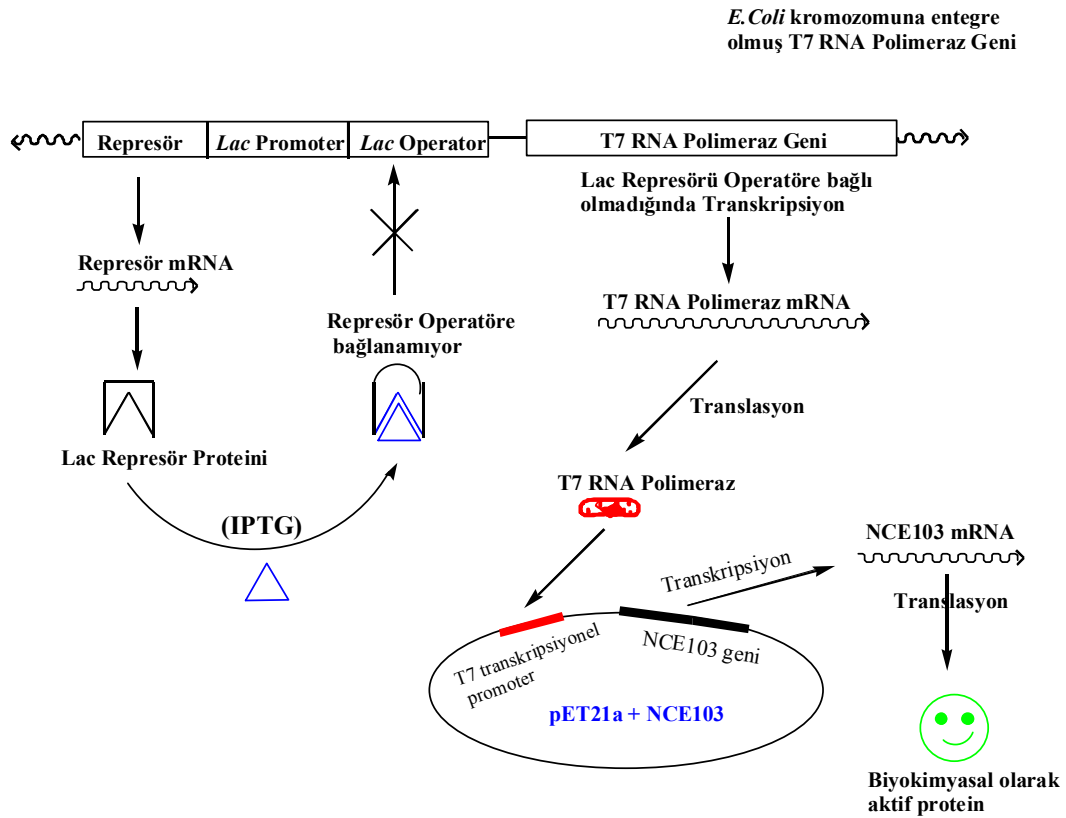
Maya CA enzimini ekspre etmek amacıyla plazmid BL-21(DE3) Codon plus *E.coli* soyuna transforme edilmiştir. Kullanılan pET21a plazmidinde istenilen genin ekspre olabilmesi için *E.coli* soyunun seçimi çok önemlidir. İstenilen genin IPTG uygulaması ile ekspresyonu amacıyla BL-21(DE3) Codon plus kullanılmıştır. Bu soy genomunda T7 RNA polimeraz geni taşımaktadır [76,81].

Şekil 3.9'da IPTG uygulaması ile istenilen genin ekspresyonu gösterilmektedir. IPTG Lac represör proteinine bağlanarak, onun Lac operatör bölgesine bağlanmasını engeller. Böylece T7 RNA polimeraz geni serbest kalarak T7 polimeraz enzimi sentezlenir. T7 RNA polimeraz enzimi pET plazmitteki T7 transkripsiyonel promotera bağlanır ve istenilen proteinin sentezini sağlar [76].

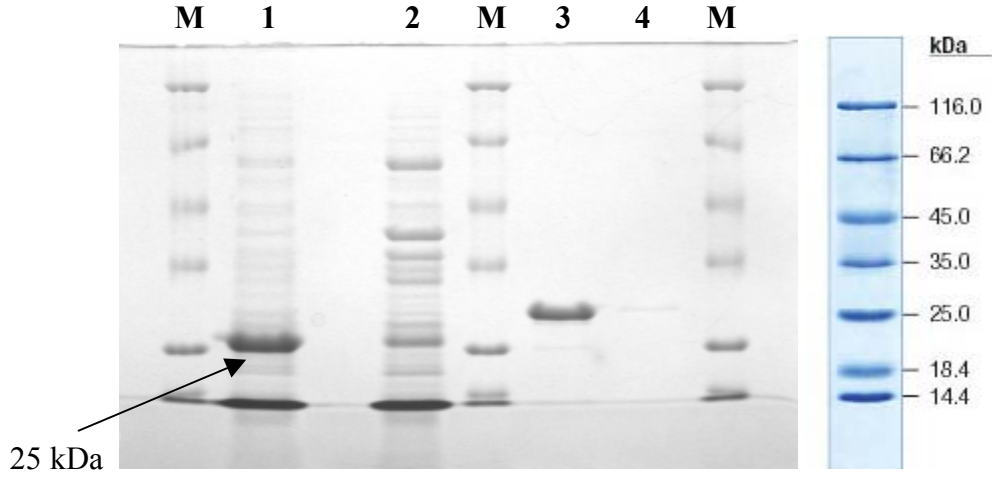
IPTG uygulaması ile ekspresyonun varlığının tespiti için kontrol olarak plazmid içermeyen BL-21(DE3) Codon plus *E.coli* soyu LB Agar üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C' de 300 rpm de 3-4 saat inkübasyona

bırakıldı. $OD_{550} = 0.6-0.8$ 'e ulaştığında 250 μ L 5 mM $ZnCl_2$ ve 400 μ L 0.1 M IPTG bakteri kültürüne eklendi. Kültür 30°C' de 300 rpm'de büyümeye bırakıldı.

Maya CA geni taşıyan plazmidi içeren BL-21(DE3) Codon plus *E.coli* soyu LB-Agar + Ampisilin üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C' de 300 rpm de 3-4 saat inkübasyona bırakıldı. $OD_{550} = 0.6-0.8$ 'e ulaştığında 250 μ L 5 mM $ZnCl_2$ ve 400 μ L 0,1 M IPTG bakteri kültürüne eklendi. Kültür 30°C' de 300 rpm'de büyümeye bırakıldı [76].



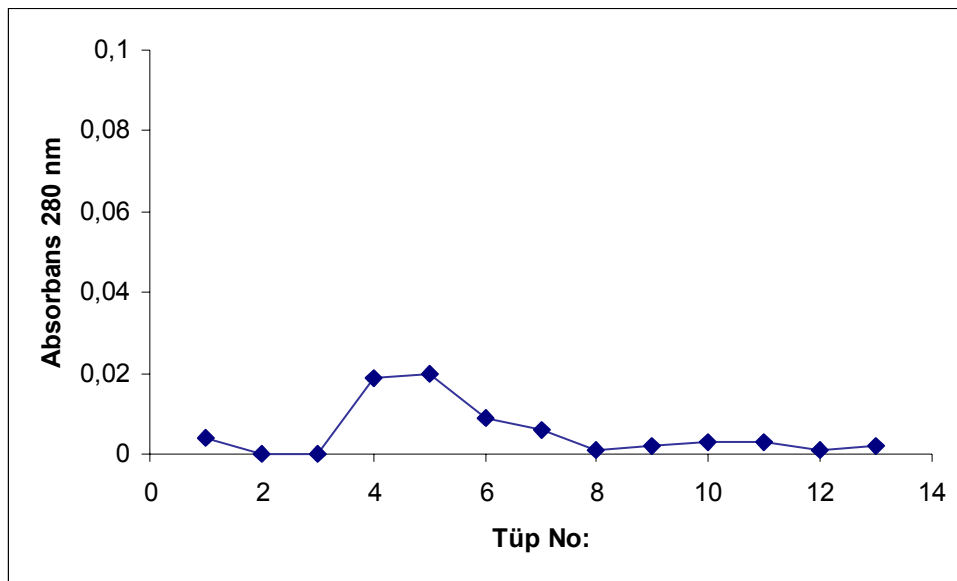
Şekil 3.11 IPTG uygulaması ile rekombinant proteinlerin ekspresyonu[76].



Şekil 3.12 M. Marker, 1. 1mM IPTG ile indüklenmiş ekstrakt, 2. indüklenmemiş ekstrakt , 3. saf hCAI ve 4. saf HCAII

3.8 Afinite Kromatografisi

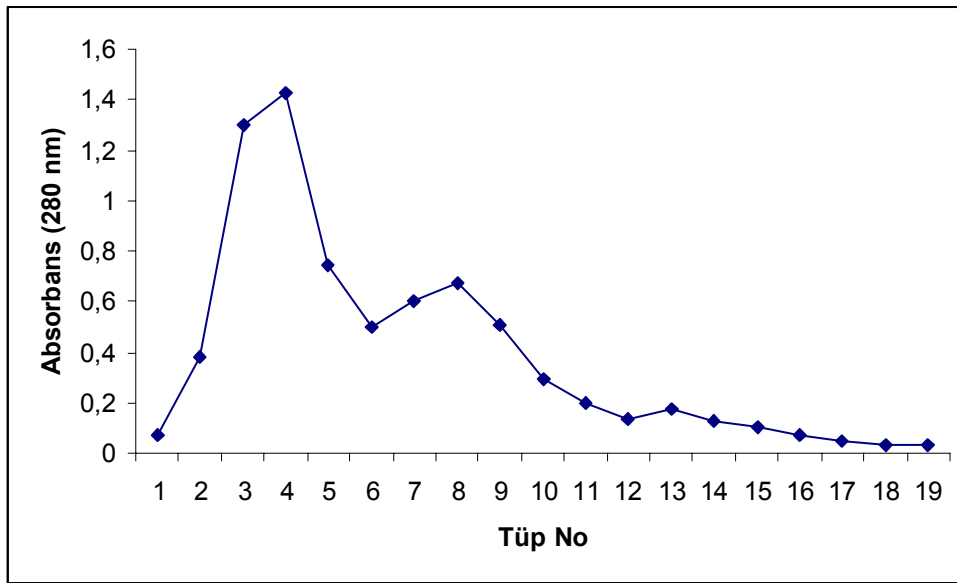
Sepharose4B-L-tirozin-Benzensülfonamid afinite jeli ile proteinler saflaştırıldı. Kolona örneğin uygulanmasından sonra protein gelmeyinceye kadar yıkama işlemine devam edildi ve 280 nm'deki absorbansın düşüşü izlendi. Daha sonra kolonda tutunan örneğin elüsyonu yapıldı. Kolonun elüsyonunda tüplere toplanan örneklerin 280 nm'deki protein varlığı tespit edildi. Ham ekstrakt ve elüe edilen örneklerin hidrataz aktiviteleri ölçüldü fakat aktivite gözlenemedi.



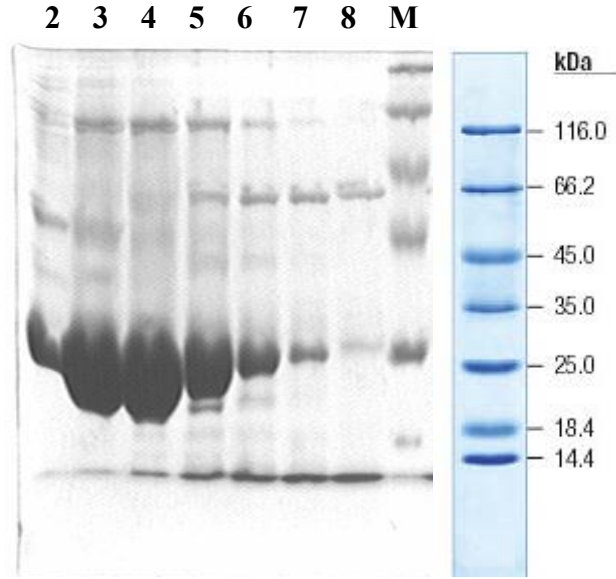
Şekil 3.13 Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan Maya CA enziminin grafiği

3.9 Jel Filtrasyon Kromatografisi

Jel Filtrasyon Kromatografisi ile saflaştırılan Maya CA enziminin aktivitesi laboratuvarımızda belirlenemediği için elde edilen bütün elüatlar SDS-PAGE ile görüntülendi ve Maya CA'nın bulunduğu tüpler tespit edildi daha sonraki aktivite çalışmalarında kullanmak için. Elüsyonlara, son konsantrasyon %5 olacak şekilde steril gliserol eklendi ve -20° C'de saklandı.



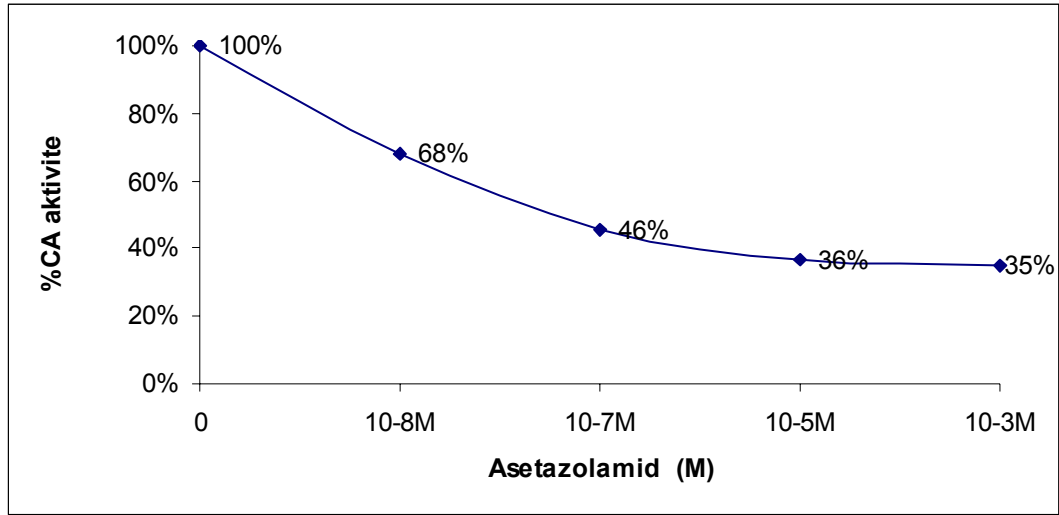
Şekil 3.14 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile ayrılan proteinlerin absorbansları



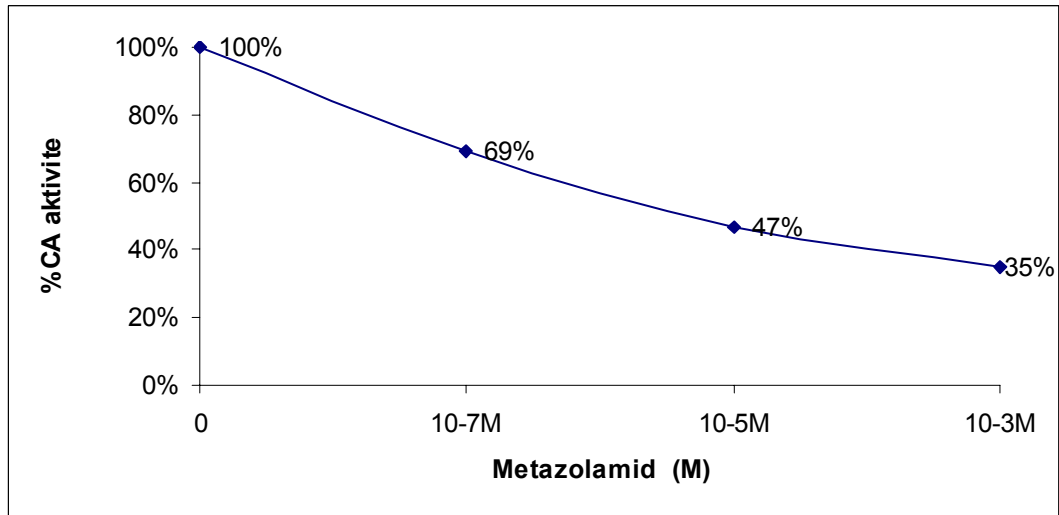
Şekil 3.15 JFK ile ayrılan proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü. **2-8** fraksiyonlar, **M** Marker

3.10 Bazı CA İnhibitörleri ile Maya CA'nın İnhibisyonu

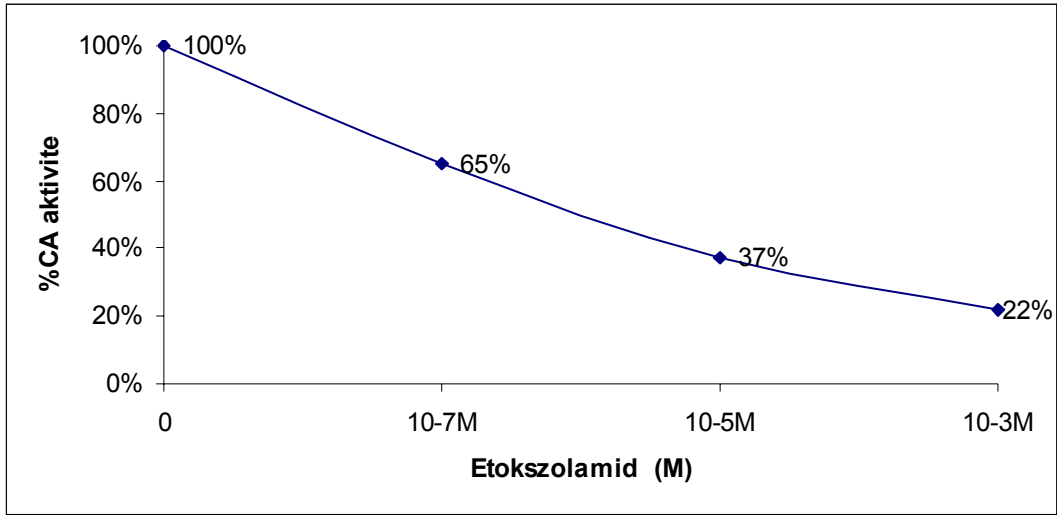
İnhibisyon çalışmalarında klinik amaçlı kullanılan sülfonamid bileşikleri kullanıldı. Bu inhibitörlerin IC_{50} değerlerinin belirlenmesi amacıyla substrat konsantrasyonu sabit tutulmak suretiyle farklı konsantrasyonlarda inhibitör çözeltileri kullanılarak enzimin hidrataz aktiviteleri belirlendi. %Aktivite-[I] grafiği çizilerek oluşturulan eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı.



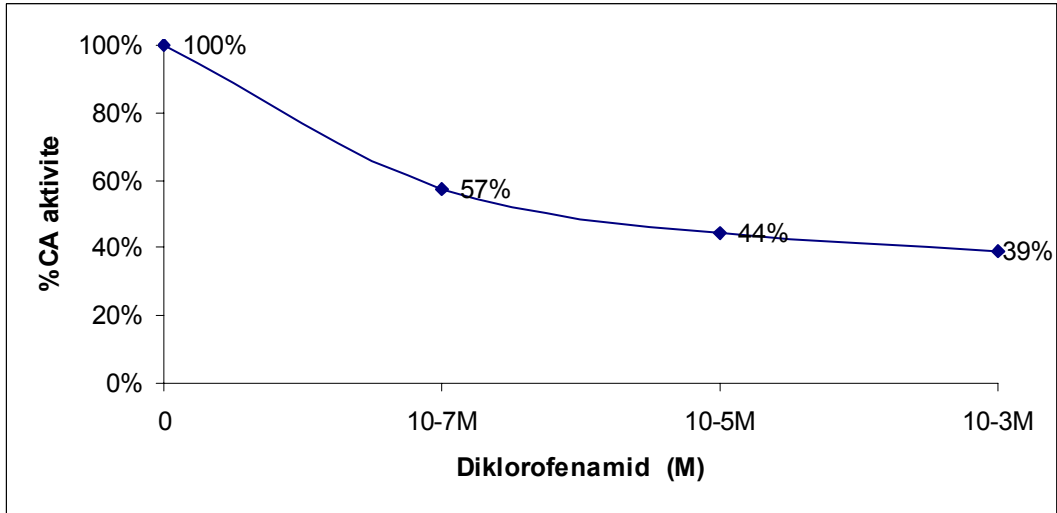
Şekil 3.16 Asetazolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



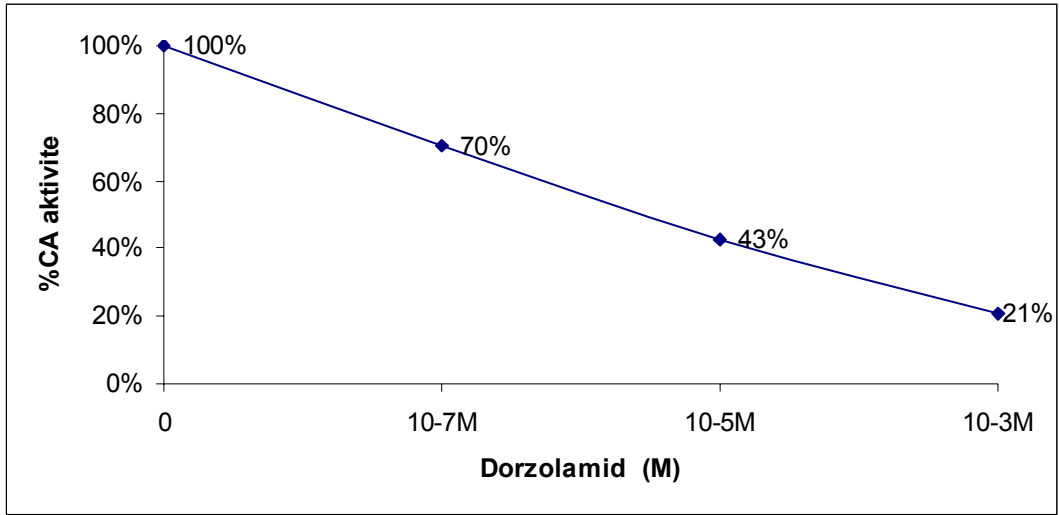
Şekil 3.17 Metazolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



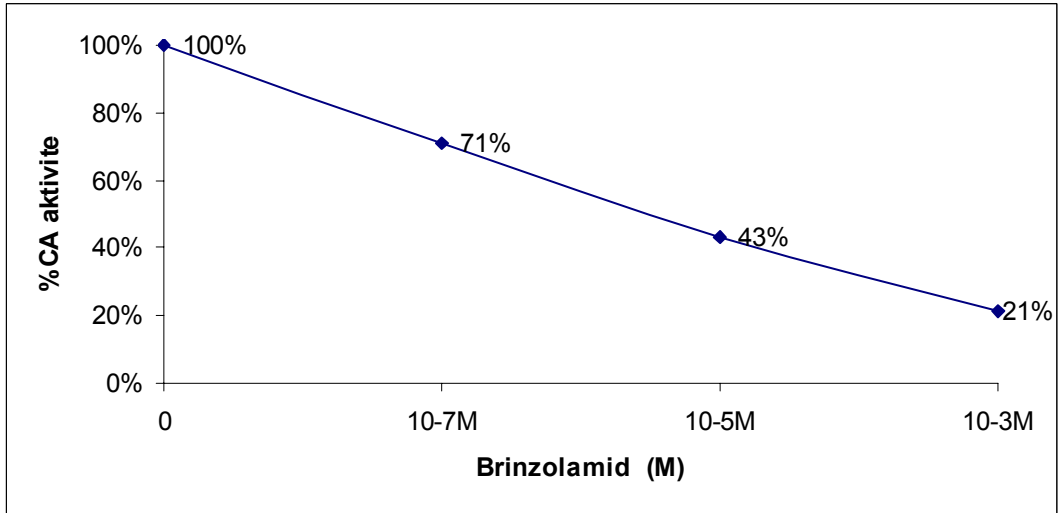
Şekil 3.18 Etokszolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



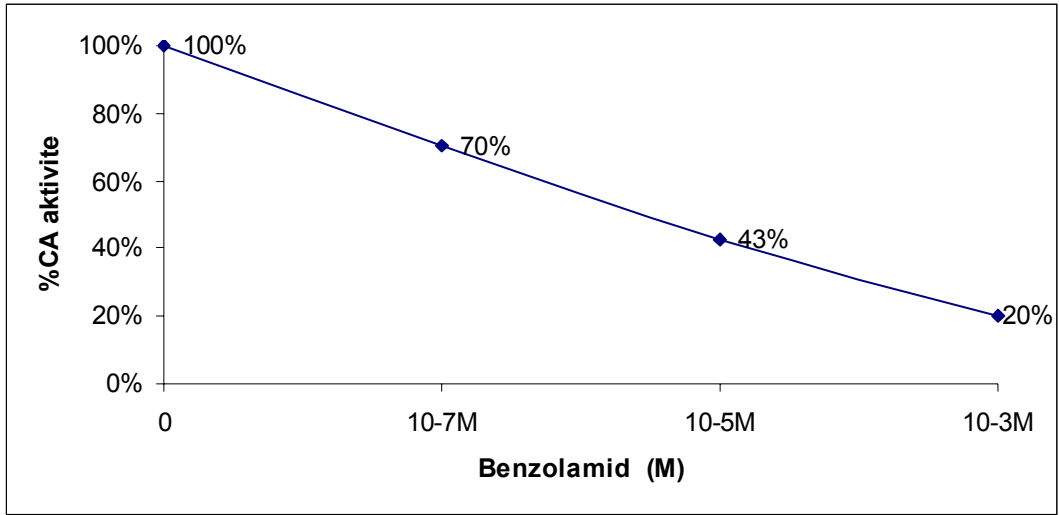
Şekil 3.19 Diklorfenamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



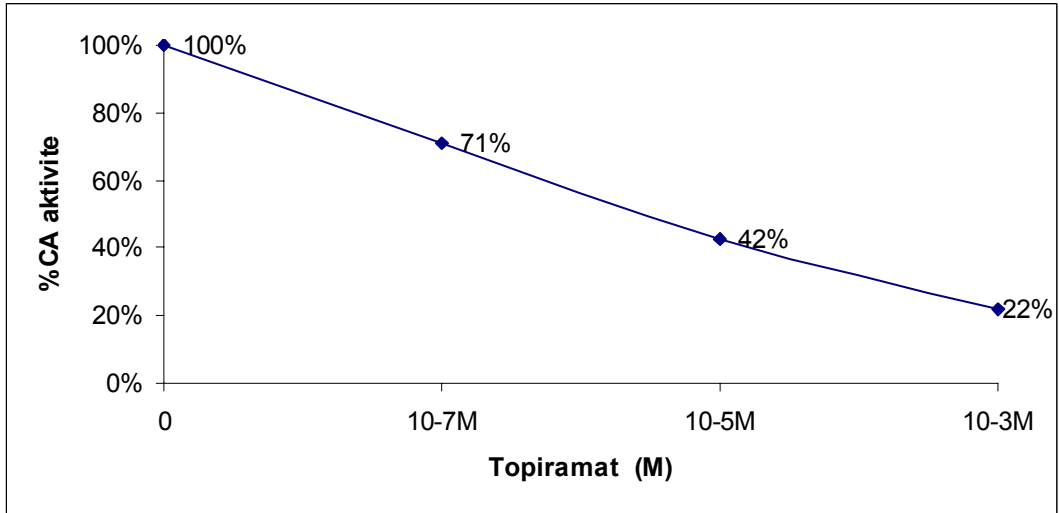
Şekil 3.20 Dorzolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



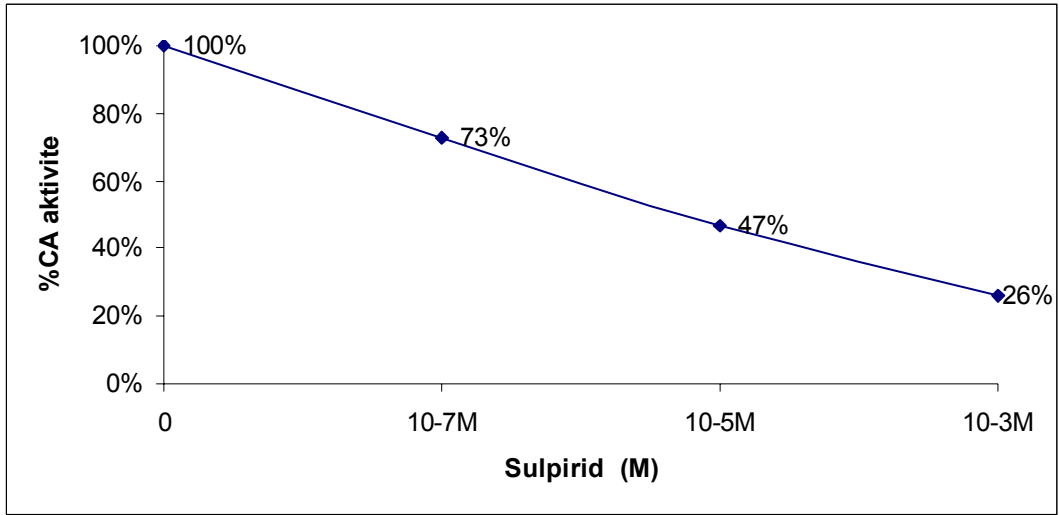
Şekil 3.21 Brinzolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



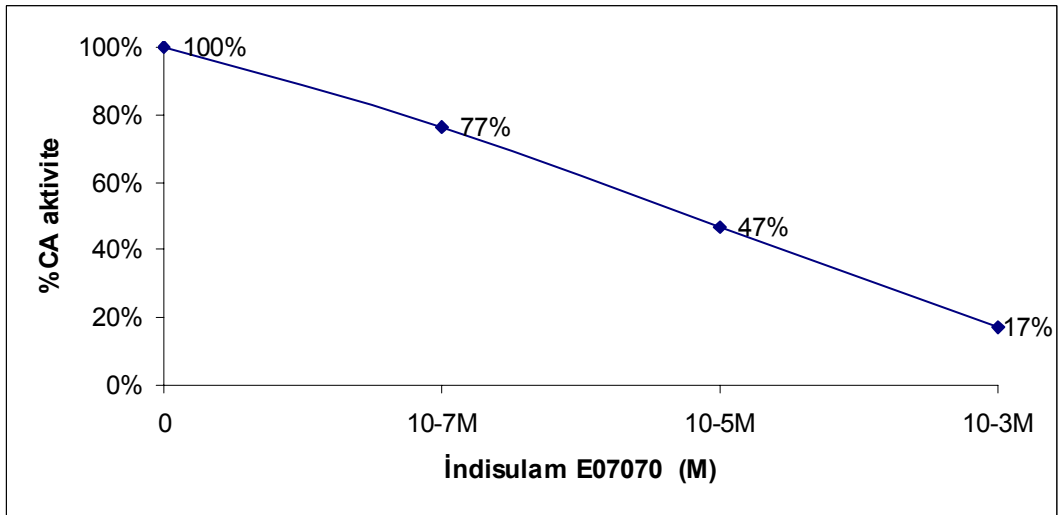
Şekil 3.22 Benzolamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



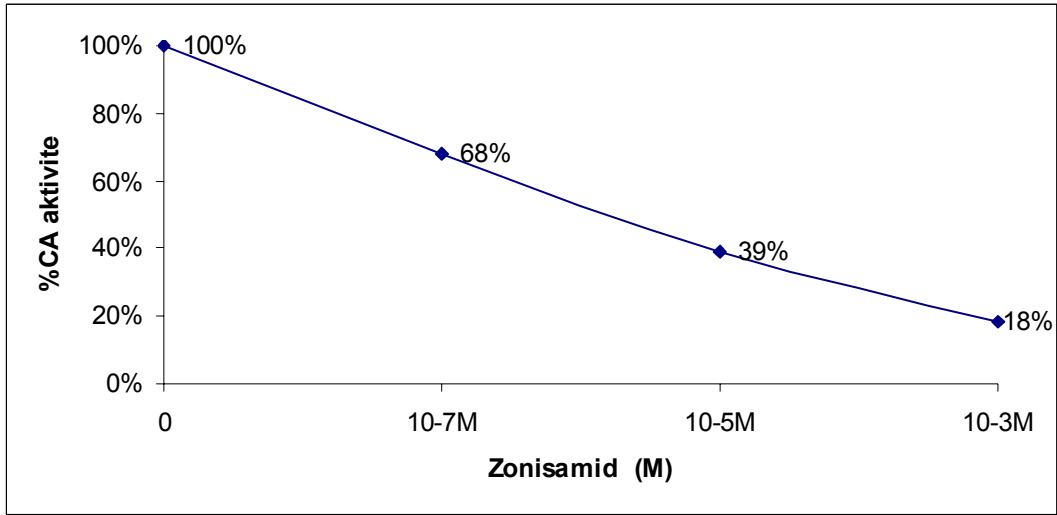
Şekil 3.23 Topiramat inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



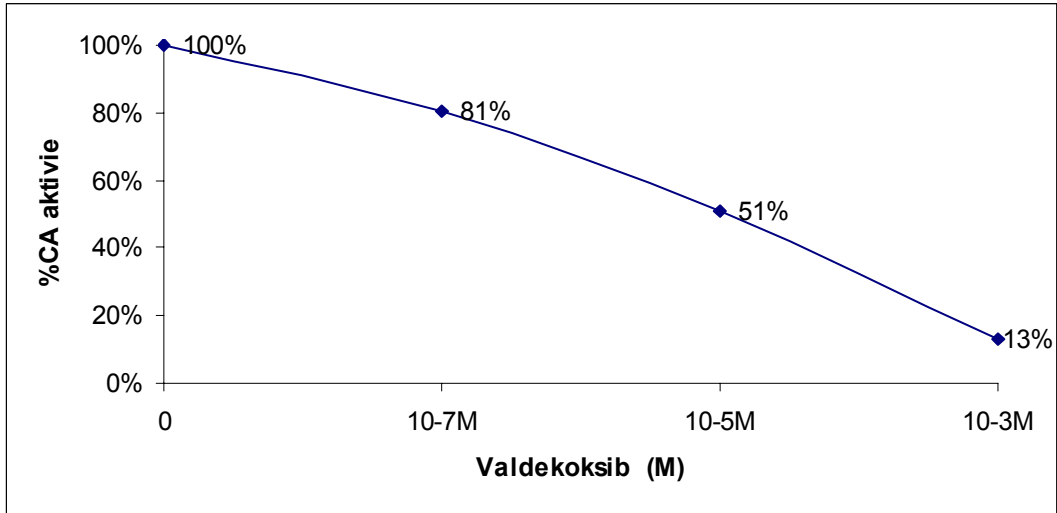
Şekil 3.24 Sulpirid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



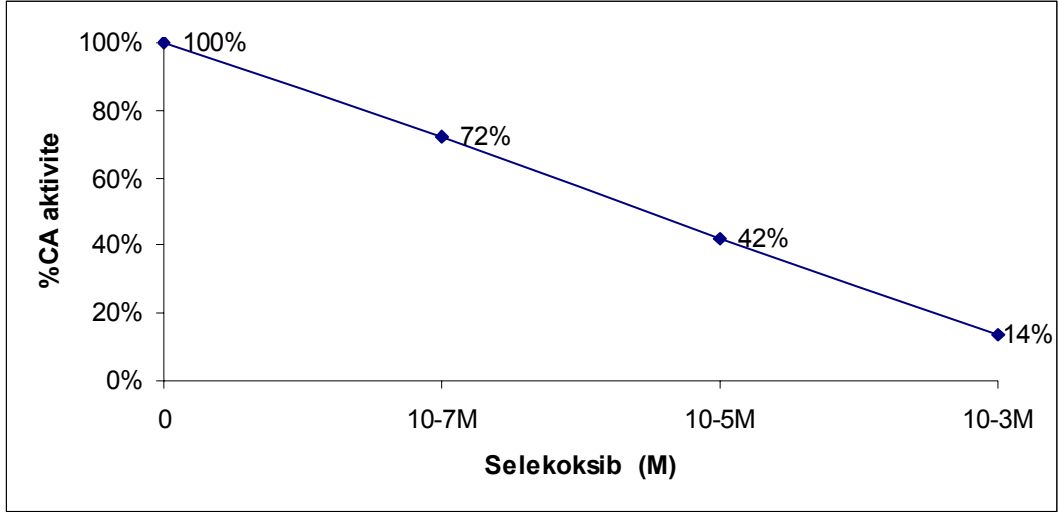
Şekil 3.25 Indisulam inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



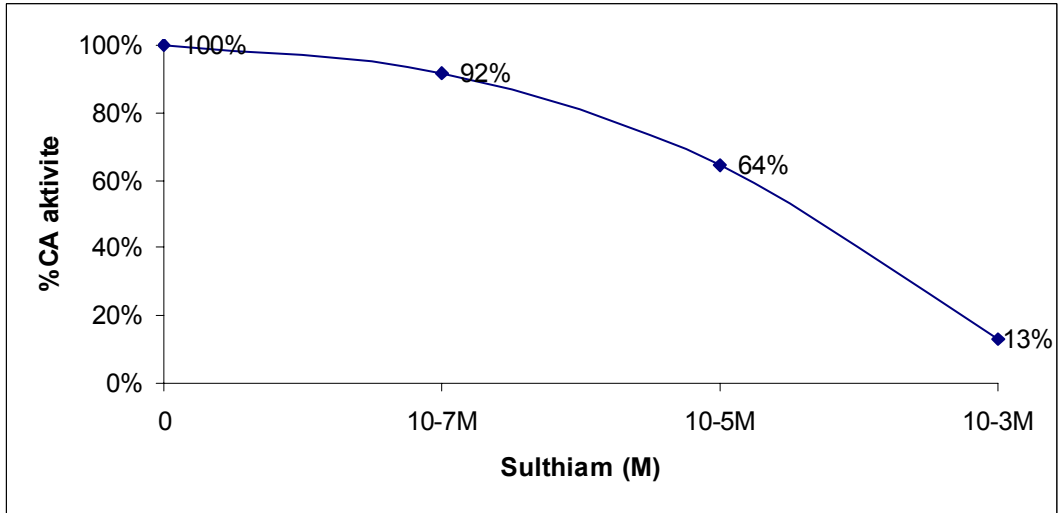
Şekil 3.26 Zonisamid inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



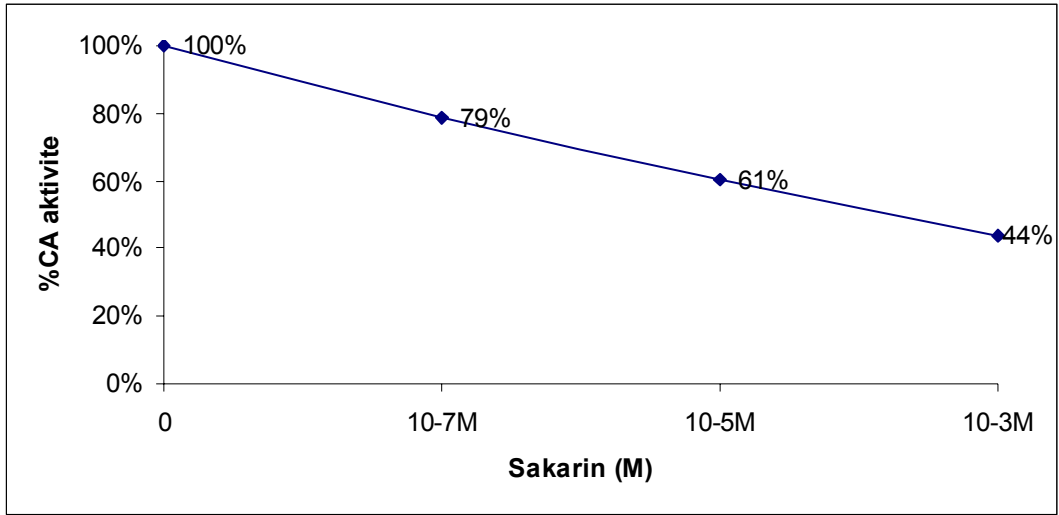
Şekil 3.27 Valdekoksib inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.28 Selekoksib inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.29 Sulthiam inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.30 Sakarin inhibitörünün Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.3 İnhibitörlerin Maya CA enzimi üzerindeki IC₅₀ değerleri

İnhibitör	IC ₅₀ Değerleri M(mol/L)
Asetazolamid	8.27×10^{-8}
Metazolamid	8.61×10^{-6}
Etokszolamid	5.41×10^{-6}
Diklorfenamid	5.73×10^{-6}
Dorzolamid	7.35×10^{-6}
Brinzolamid	7.58×10^{-6}
Benzolamid	7.37×10^{-6}
Topiramet	7.35×10^{-6}
Sulpirid	8.74×10^{-6}
İndisulam	8.93×10^{-6}
Zonisamid	6.29×10^{-6}
Valdekoksib	1.04×10^{-5}
Selekoksib	7.41×10^{-6}
Sulthiam	1.51×10^{-5}
Sakarin	6.43×10^{-4}

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* mayasından genomik DNA izole edilerek, PCR ile karbonik anhidraz enzimini kodlayan NCE103 geni çoğaltılmıştır. Elde edilen gen vektör içerisine klonlanarak, *E.coli*'ye transforme edilmiştir. Bakteri içerisinde ekspre edilen maya karbonik anhidraz enzimi belirli ölçüde saflaştırılarak bu enzim üzerinde klinik amaçlı kullanılan 15 farklı sülfonamid bileşiği ile inhibisyon çalışmaları yapılmıştır.

Araştırmamızda, β -CA enzimi kaynağı olarak *Saccharomyces cerevisiae* mayası tercih edilmiştir. Mayaların orjinal habitatları meyveler ve meyve sularıdır. Ancak günümüzde kullanılan ticari mayalar, bu orijinal ırklardan çok farklı olup yıllar boyunca seleksiyona uğramış ve genetik olarak manupile edilmiş kültür ırklarıdır. Hamur ve alkollü içki sanayinde kullanılan mayalar bütün funguslar içerisinde biyolojik olarak en iyi bilinen organizmalardır. Tek hücreli olduklarından kolayca incelenirler. *Saccharomyces cerevisiae* de *E.coli* gibi biyolojide en çok çalışılmış model organizmalardan biridir. *S. cerevisiae* bu konuma endüstrideki yaygın kullanımından dolayı ulaşmıştır. İnsan biyolojisinde önemli olan pek çok protein önce mayada bulunan karşılıklarının araştırılması sonucunda keşfedilmiştir. Ökaryot biyolojisindeki problemler en kolay şekilde bu organizmalar üzerinde çalışılarak çözülebilmektedir [57,58].

Endüstride kullanılan bu maya için son derece önemli fizyolojik fonksiyonu bulunan CA enzimine yönelik araştırmalar yapılmıştır[35,49,61-63]. İlk başta NCE103 geninin delesyonu pH toleransını etkilemediği, fakat oksijene karşı duyarlılığa neden olduğu belirlenmiş ve maya CA'nın oksidatif strese karşı gerekli olduğu düşünülmüştür. Ancak enzimin CA aktivitesi gözlemlenememiştir [49]. Daha sonra yapılan bir çalışmada da NCE103 geni delesyonuna uğratılmış maya soyunun H₂O₂ veya peroksinitrite karşı bir duyarlılık göstermediği tespit edilmiştir. Dahası NCE103 geninin ürünü olan proteinin kayda değer CA aktivitesine sahip

olduğu bulunmuştur [62]. CA enziminin anaerobik kültürlerde mayanın büyümesi için zorunlu olduğu ve NCE103 geninin eksikliğinde mutantlar sadece atmosferik CO₂'in kısmi basıncında büyüebildikleri tespit edilmiştir [63]. Maya CA enziminin, CA aktivitesine sahip olduğu ve CA enzime çok spesifik olan inhibitörlere karşı duyarlı olduğu ve bu enzimin mayada fonksiyonel bir β -CA olduğu bulunmuştur [35].

Literatürdeki farklı çalışmalarda PCR ürünü olan genleri klonlamak için değişik vektörler kullanılmıştır; TOPO® Cloning pCR kiti kullanarak pCR®T7 vektörü içerisine *Mycobacterium tuberculosis* CA geni klonlanmış [80], pET-3a ekspresyon vektörüne *E.coli* CA geni [40], pET16(b) içerisine *Methanobacterium thermoautotrophicum* CA geni klonlanmıştır [82]. pET21a vektörü içerisine hCA I geni klonlanmış ve başarılı bir şekilde hCA I izoenzimi ekspre edilmiştir [83].

Bu çalışmada NCE103 geni intron bölge içermediği için doğrudan maya genomik DNA'sından PCR ile amplifikasyonu yapılmıştır. PCR ürünü gen restriksiyon enzimi ile kesime ihtiyaç duymadan doğrudan pGEM-T vektörüne, daha sonra da ekspresyon amacı ile pET21a vektörüne klonlanmıştır. NCE103 genini içeren pGEM-T vektörü DH5 α *E.coli* soyuna transforme edilmiştir. Plazmid otomatik dizi analizine gönderilmiş ve alınan sonucun biyoinformatiği yapılmıştır. Elde edilen dizi analizi sonuçları Bölüm 3, Şekil 3.6'da görülmektedir. Dizi analizi sonucundan herhangi bir mutasyon olmadığı tespit edildikten sonra ekspresyon basamağına geçilmiştir.

E.coli'nin BL-21 soyu rekombinant protein ekspresyonunda sahip olduğu özellikleri açısından yaygın olarak kullanılır. Bu hücreler, T7 RNA polimeraz genini içerirler. Ayrıca, IPTG ile de teşvik edilebilirler. Sentezlenen protein degrade edebilen bazı proteazlar açısından eksiktir. Bu çalışmada pET ekspresyon sistemi için uygun olan bu soy tercih edilmiştir. NCE103 genini içeren plazmid, BL-21(DE3) *E.coli* soyuna Bölüm 2.2.3.4'de anlatıldığı gibi transforme edilmiştir ve IPTG ile indüklemeye gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon sonrası bakteri hücreleri liziz edilerek ham ekstraktlar SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Sonuçta indüklenen ve

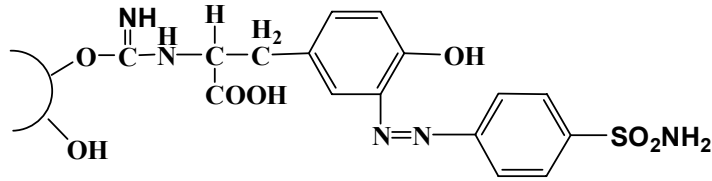
indüklenmeyen kültürlerdeki enzimin ekspresyonu gözlenmiştir. Sonuçlar Bölüm 3 Şekil 3.11’de gösterilmiştir.

Karbonik anhidraz aktivitesi, enzimin CO_2 ’i hidratasyonu, HCO_3^- ’ı dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi özelliklerinden yararlanılarak belirlenmektedir [1]. Hidrataz aktivitesi Wilbur-Anderson ve Maren metodlarıyla yapılmaktadır. Wilbur-Anderson yönteminde, CO_2 hidratasyonunda pH’nın 8.2’den 6.3’e düşüşü için geçen süre brom timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi, enzimless CO_2 hidratasyon süresi (t_0) ile enzimli reaksiyon süreleri (t_c) arasındaki farkın (t_c)’ye bölünmesiyle elde edilmektedir. Yani, $\text{EU} = [(t_0) - (t_c)] / (t_c)$ olur [84]. Maren metodunda ise CO_2 ’nin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H^+ nedeniyle pH değerinin 10.0’dan 7.4’e düşmesi süresinin ölçümü hesabına dayanır. Yöntemde indikatör olarak, pH:7.4 değerinde renk değiştiren fenol kırmızısı, tampon olarak da pH değeri 10.0 olan karbonat tamponu kullanılır [2]. Kinetik çalışmalarda, CA aktivitesi ölçümleri için esteraz aktivitesi ölçümü ile yapılmaktadır. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır [85]. Prensipte olarak, karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitro fenol ve p-nitro fenolata hidroliz etmekte ve bu da 348 nm dalga boyunda absorpsiyon vermektedir. Maya CA aktivitesinin çok düşük olduğu için bu yöntemlerle tespit edilememektedir. Bunun için Clark ve ark.’nın [62] maya karbonik anhidrazının aktivitesini tespit edebildikleri Stop-Flow spektrofotometresi kullanılmıştır. Bu cihaz, hızlı kimyasal, biyokimyasal ve biyolojik reaksiyonların stop-flow ile başlamalarına izin verir. Bu cihazın asıl prensibi adsorpsiyon metoduna dayanır.

Saflaştırma işleminde etkili yöntemlerden biri olan afinite kromatografisi uygulanmıştır. Afinite kromatografisinde kullanılan jel, ardışık üç basamakta sentezlenmiştir. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi ve buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış sülfonamid bileşiği katıldı. Sepharose-4B’nin matriks olarak seçilmesinin başlıca sebebi çok iyi akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmesidir. Bu amaçla literatürde karbodiimid bileşiklerinin de kullanıldığı bildirilmektedir [86]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanması ile amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ

kromatografi işlemlerinde dayanıklıdır. Fakat aktifleştirilme sırasında jel, pH 4.5’da 24 saat süre ile karıştırılmaktadır. Bu işlem kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [86]. Bir başka aktifleştirme işleminde epoksi bileşiklerinden yararlanılmıştır [87]. Kromatografi işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktifleştirme ve 16 saat ligand bağlama süresi olmak üzere toplam 32 saatte gerçekleşmektedir. Literatürde kromatografik matriks olarak kullanılan bir başka bileşik EUPERGIT C-250 L ticari ismi ile temin edilen ve oksiran grupları içeren jeller de kullanılmıştır. Söz konusu bileşik bağlamada spesifik olmamasına rağmen, üzerinde taşıdığı oksiran grupları ile çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında kromatografik matriks olarak seçilmiştir [88].

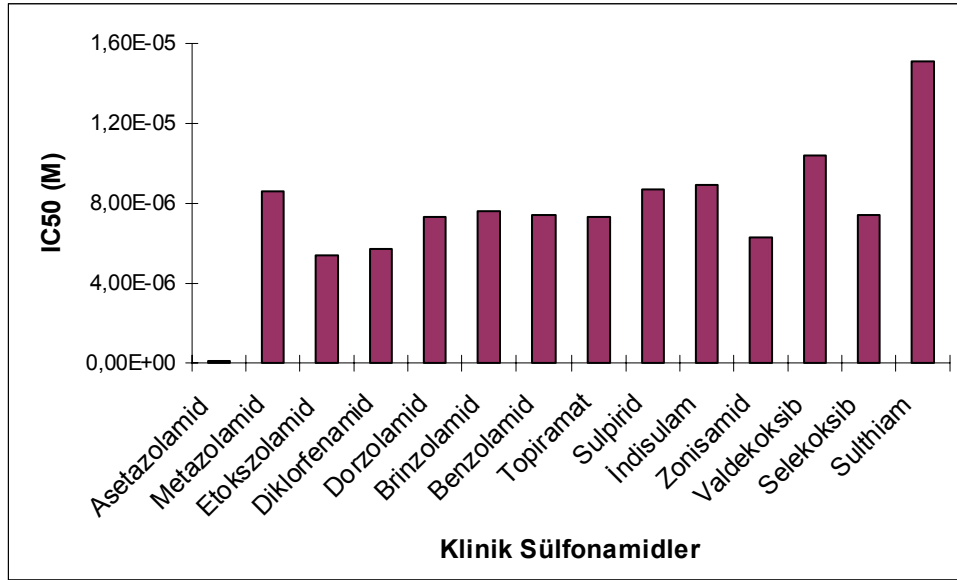
Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B’ye ligand (p-aminobenzen sulfonamid) L-tirozin bileşiği aracılığı ile immobilize edilmiştir.



Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Sentezlenen bu afinite jeli, hCA I, hCA II ve sığır CA izoenzimlerini yüksek pH’da bağlayarak saflaştırma çalışmalarında çok başarılı sonuçlar elde edilmiştir [89], fakat maya CA izoenzimini içeren hücre ekstraktı kolona uygulandığında aynı başarı elde edilememiştir. Kolona tutunan protein miktarı çok az olduğundan bu afinite jeli enzim saflaştırılmasında kullanılamamıştır. Bundan dolayı Afinite Kromatografisi yerine Jel Filtrasyon Kromatografisi kullanılmıştır ve Maya CA enzimi belirli ölçüde saflaştırılmıştır. Elde edilen elüatlarda protein tayini yapılmıştır ve SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. Sonuçlar Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve Şekil 3.14’te görülmektedir.

Sülfonamidlerin IC₅₀ değerlerini bulmak için Stop Flow kinetik cihazında [12,46] optimum şartlarda CO₂ substratının doymuş konsantrasyonunda çalışıldı. Bu amaçla

kullanılan Maren metodu CA aktivitesinde bilinen eski ve en çok tercih edilen metottur [2]. Ancak Maya CA aktivitesinin çok düşük olması kullanılan bu metotlarla gözlemlenemiyor. Bu yüzden çalışmamızda daha hassas olan Stop Flow cihazı ile aktivite ölçümü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.15-3.29 grafikleri ve Çizelge 3.3'te verilmektedir. Uygulanan sülfonamidler içinde, çok düşük konsantrasyonda aktiviteyi % 50 azaltması ile asetazolamid ($8.27 \times 10^{-8} \text{M}$) en kuvvetli inhibitör olarak tespit edilmiştir. Çizelge 3.3'te de görüldüğü üzere en zayıf inhibitör olarak sakarin ($6.43 \times 10^{-4} \text{M}$) bulunmuştur. Çalışılan sülfonamidlerin IC_{50} değerleri karşılaştırılması Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Sülfonamid bileşiklerinin Maya CA enzimi üzerindeki inhibisyon dağılımları

Literatürdeki farklı çalışmalarda kullanılan sülfonamid bileşiklerinin farklı CA izoenzimleri üzerinde inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Yabani tip hCA I ve mutant hCA I (Phe91Asn Mutantı) üzerinde asetazolamidin inhibisyon etkileri araştırılmış ve sırasıyla $1.376 \times 10^{-6} \text{M}$ ve $1.283 \times 10^{-6} \text{M}$ IC_{50} değerleri bulunmuştur [83]. hCA II izoenzimi ve iki ayrı mutantı ile yapılan başka bir çalışmada asetazolamid için IC_{50} değerleri hCA II için $0.2768 \times 10^{-9} \text{M}$, Asparajin67İzolösün Mutant hCAII için $0.0285 \times 10^{-9} \text{M}$ ve Lösün204Serin Mutant hCAII için $0.422 \times 10^{-9} \text{M}$

olarak tespit edilmiştir [74]. Başka bir çalışmada hCA II için K_I ve IC_{50} değerleri sırasıyla $6.32 \times 10^{-8} M$ ve $7.55 \times 10^{-8} M$ olarak bulunmuştur [89]. hCA I ve hCA II için yapılan başka bir çalışmada asetazolamid için K_I değerleri hesaplanmıştır, hCA I için $2.5 \times 10^{-7} M$ ve hCA II için $12 \times 10^{-9} M$ [90]. Maya CA ile yapılan çalışmada asetazolamid için bulduğumuz IC_{50} değeri $8.27 \times 10^{-8} M$ 'dır. Bu değerlerle karşılaştırdığımızda Maya CA'sı, hCA I'e göre daha duyarlı asetazolamide karşı ve hCA II'ye göre de biraz daha az etkileniyor.

Metazolamid inhibitörü ile Maya CA için bulunan IC_{50} değeri $8.61 \times 10^{-6} M$ 'dır. Metazolamid ile yapılan diğer çalışmalarda CA izoenzimleri için K_I değerleri tespit edilmiş. Bunlar hCA I için $5.0 \times 10^{-8} M$ ve hCA II için $1.4 \times 10^{-8} M$ [90]. Etokszolamid ile Maya CA için IC_{50} değeri $5.41 \times 10^{-6} M$ olarak tespit edilmiştir. hCA I ve hCA II ile yapılan çalışmada etokszolamid ile sırasıyla $2.5 \times 10^{-8} M$ ve $8 \times 10^{-9} M$ K_I değerleri bulunmuştur [90]. Diklorfenamid ile Maya CA için $5.73 \times 10^{-6} M$ IC_{50} değeri belirlenmiştir. Bu sülfonamid bileşiği ile yapılan çalışmada hCA I ve hCA II için K_I değerleri $1.2 \times 10^{-6} M$ ve $3.8 \times 10^{-8} M$ 'dır [90]. Dorzolamid için bulunan IC_{50} değeri $7.35 \times 10^{-6} M$ 'dır. hCA I ve hCA II için bulunan K_I değerler ise sırasıyla $5 \times 10^{-5} M$ ve $9 \times 10^{-9} M$ 'dır [90].

Maya CA'da Brinzolamid için bulunan IC_{50} değeri $7.58 \times 10^{-6} M$ 'dır. hCA I ve hCA II için bulunan K_I değerler ise sırasıyla $4.5 \times 10^{-5} M$ ve $3 \times 10^{-9} M$ 'dır [91]. Benzolamid için bulunan IC_{50} değeri $7.37 \times 10^{-6} M$ 'dır. Diğer izoenzimler için bulunan K_I değerler ise hCA I için $1.5 \times 10^{-8} M$, hCA II için $9 \times 10^{-9} M$, hCA VA için $3.7 \times 10^{-8} M$, hCA VB için $3.4 \times 10^{-8} M$ ve hCA XII için $3.5 \times 10^{-9} M$ 'dır [92,93]. Maya CA'da Topiramet için IC_{50} değeri $7.35 \times 10^{-6} M$ 'dır. hCA I ve hCA II için bulunan K_I değerler ise sırasıyla $2.5 \times 10^{-7} M$ ve $1 \times 10^{-8} M$ 'dır [91]. Sulpirid için bulunan IC_{50} değeri $8.74 \times 10^{-6} M$. hCA I ve hCA II için bulunan K_I değerler ise sırasıyla $1.2 \times 10^{-5} M$ ve $4 \times 10^{-8} M$. İndisulam için IC_{50} değeri $8.93 \times 10^{-6} M$, hCA I ve hCA II için bulunan K_I değerler ise $3.1 \times 10^{-8} M$ ve $1.5 \times 10^{-8} M$ [91]. Zonisamid için tespit edilen IC_{50} değeri $6.29 \times 10^{-6} M$. Bu inhibitörün hCA I ve hCA II üzerindeki K_I değerleri ise sırasıyla $5.6 \times 10^{-8} M$ ve $3.5 \times 10^{-8} M$ [91].

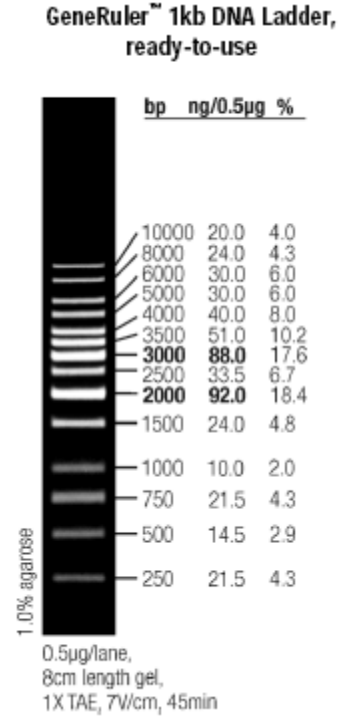
Maya CA'da Valdekoksib ve Selekoksib için bulunan IC_{50} değerleri sırasıyla 1.04×10^{-5} M ve 7.41×10^{-6} M. Bu inhibitörler ile hCA I ve hCA II üzerindeki çalışmalar sonucunda bulunan K_I değerleri ise sırasıyla Valdekoksib için 5.4×10^{-5} M ve 4.3×10^{-8} M, Selekoksib için de 5×10^{-5} M ve 2.1×10^{-8} M [91]. Sulthiam için IC_{50} değeri 1.51×10^{-5} M. Sakarin için bulunan değer ise 6.43×10^{-4} M olarak tespit edilmiştir. Sakarin ile hCA I ve hCA II üzerindeki çalışmalar sonucunda bulunan K_I değerleri ise sırasıyla 18.5×10^{-6} M ve 5.95×10^{-6} M [91].

Elde edilen sonuçlar özellikle asetazolamid, etoksolanid, metazolamid, diklorfenamid gibi bileşiklerin β -CA üzerindeki inhibisyon etkisi α -CA'lara oldukça benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, üzerinde çalıştığımız β -CA'ların aktif bölgelerinin α -CA'lara belirli ölçüde benzediğini göstermektedir. Söz konusu bileşiklerin inhibisyon mekanizmalarının da kompetitif olduğu açıkça görülmektedir. Çizelge 3.2'de de görüldüğü gibi maya CA'nın aminoasit dizilişinin diğer proteinlerle karşılaştırılması sonucunda β -CA'lara benzediği ve aktif bölgedeki aminoasitlerin korunduğu görülmektedir [80].

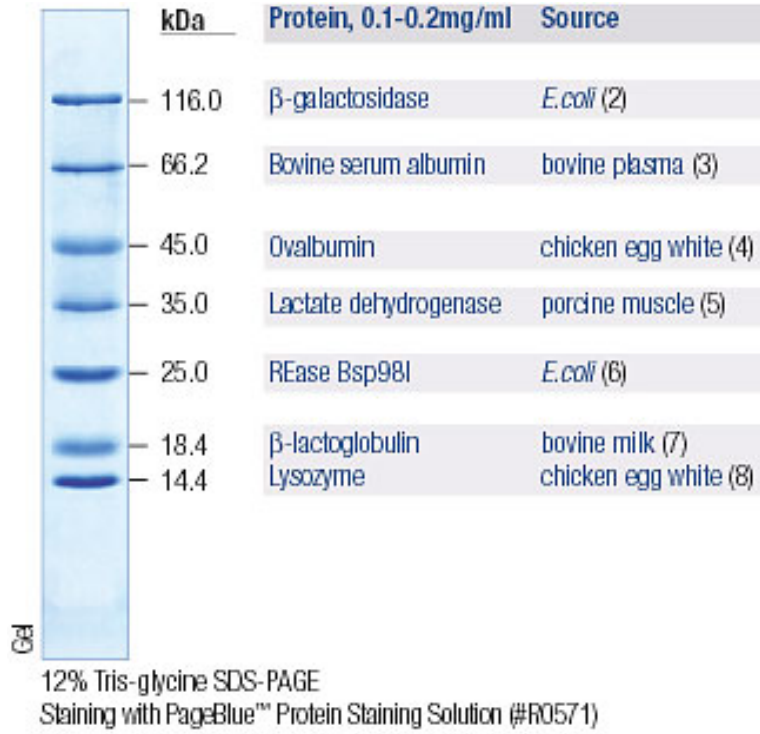
5. EKLER

AarI, AatII, AclI, AcyI, AflII, AgeI, AhoI, AlwNI, ApaI, ApaLI, AscI, AsuII, AvaI, AvaII, AvrII, BaeI, **BamHI**, BbvCI, BccI, BcgI, BciVI, BclI, BfiI, BglII, BpII, Bpu10I, BsaAI, BsaBI, BsaXI, BsePI, BseRI, BseSI, BseYI, BsgI, BsmI, BsmAI, BspHI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BstEII, BstXI, BtrI, BtsI, Cfr10I, ClaI, DraII, DraIII, DrdI, Eam1105I, EciI, Eco31I, Eco57I, Eco57MI, EcoNI, EcoRI, EcoRII, Esp3I, Fall, FauI, FokI, FseI, FspAI, GsuI, HgaI, Hin4I, HindIII, HphI, Hpy99I, KpnI, MfeI, MluI, MmeI, MslI, NaeI, NarI, NcoI, NheI, NotI, NruI, OliI, PI-PspI, PI-SceI, PacI, PflMI, PfoI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PsiI, PsrI, PstI, PvuI, PvuII, RsrII, **SacI**, SacII, SalI, SanDI, SapI, SduI, SexAI, SfaNI, SfiI, SgfI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, StyI, SwaI, TaqII, TspGWI, Tth111I, VspI, XbaI, XhoI, XhoII, XmnI

Şekil A.1 Maya CA genini kesmeyen enzimler [94]



Şekil A.2 1kb DNA Marker [95]



Şekil A.3 Protein Marker [96]

6. KAYNAKLAR

- [1] Supuran, C. T., and Scozzafava, A., (2001) "Carbonic Anhydrase Inhibitors", Curr. Med.Chem., 1: 61-97.
- [2] Maren, T. H., (1967) "Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition", Physiol. Rev., 47: 595.
- [3] Hewett-Emmett, D. and Tashian, R.E. (1996) Functional diversity, conservation and convergence in the evolution of α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families. Mol. Phylogen. Evol. 5: 50–77.
- [4] Lindskog, S., (1997), Structure and mechanism of carbonic anhydrase. Pharmacol Ther 74: 1–20.
- [5] Smith, K.S., and Ferry, J.G. (2000) Prokaryotic carbonic anhydrases. FEMS Microbiological Reviews 24: 335-366.
- [6] Tripp, B.C., Smith, K., and Ferry, J.G., (2001) Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. J Biol Chem 276: 48615-48618.
- [7] So, A.K.-C., Espie, G.S., Williams, E.B., Shively, J.M., Heinhorst, S., and Cannon, G.C. (2004) A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (e Class) is a component of the carboxysome shell. J Bacteriol 186: 623–630.
- [8] Roberts, S., Lane, T.W., and Morel, M.M. (1997) Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). J Phycol 33: 845–850.
- [9] Cox, E.H., McLendon, G.L., Morel, F.M.M., Lane, T.W., Prince, R.C., Pickering, I.J., and George, G.N. (2000) The active site of *Thalassiosira weissflogii* carbonic anhydrase 1. Biochemistry 39: 12128–12130.
- [10] Lane, T.W., and Morel, F.M.M. (2000) Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt, and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. Plant Physio 123: 345–352.
- [11] Lindskog, S. (1997) Structure and mechanism of carbonic anhydrase. Pharmacol Ther 74: 1–20.
- [12] Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., and Supram, C.T., (2006) Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. Expert Opin. Ther. Patents 16(12): 1627-1664.

- [13] Leppilampi, M., (2006) Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX, Ph.D Thesis, Oulu, U., Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, Finland
- [14] Tashian R.E., Hewett-Emmett D., Carter N.D., & Bergenheim N.C.H., (2000) Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs), and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains. In: Chegwiddden WR, Carter ND & Edwards YH (eds) The Carbonic Anhydrases: New Horizons. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, 105-120.
- [15] Carter, M.J., (1972) Carbonic anhydrase; isoenzymes, properties, distribution and functional significance. Biol.Rev.47: 465-513.
- [16] Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ. (1993) Biyokimya. Derya Kitabevi. Trabzon, s.34.
- [17] Nafi, B.M., Miles, R.J., Butler, L.O., Carter, N.D., Kelly, C., and Jeffery, S. (1990) Expression of carbonic anyhdrase in neisseriae and other heterotrophic bacteria. J Med Microbiol 32: 1–7.
- [18] Chirica, L.C., Elleby, B., Jonsson, B.H., and Lindskog, S.(1997) The complete sequence, expression in Escherechia coli, purification and some properties of carbonic anhydrase from Neisseria gonorrhoeae. European Journal of Biochemistry 244: 755-760.
- [19] Chirica, L.C., Elleby, B., and Lindskog, S. (2001) Cloning, expression and some properties of alpha-carbonic anhydrase from Helicobacter pylori. Biochimica and Biophysica Acta 1544: 55-63.
- [20] Elleby, B., Chirica, L.C., Tu, C., Zeppezauer, M., and Lindskog, S. (2001) Characterization of carbonic anhydrase from Neisseria gonorrhoeae. European Journal of Biochemistry 268: 1613-1619.
- [21] 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.
- [22] Heinhorst, S., Williams, E.B., Cai F., Murin, C.D., Shively, J.M., Cannon G.C., (2006) Characterization of the carboxysomal carbonic anhydrase CsoSCA from Halothiobacillus neapolitanus. Journal of Bacteriology 188: 23: 8087-8094.
- [23] Moroney, J.V., Bartlett, S.G., and Samuelsson, G. (2001) Carbonic anhydrases in plants and algae. Plant Cell Environ 24: 141–153.
- [24] Park, Y., Karlsson, J., Rojdenstvenski, I., Pronina,N., Klimov, V., Oquist, G., and Samuelsson, G. (1999) Role of a novel photosystem II-associated carbonic anhydrase in photosynthetic carbon assimilation in Chlamydomonas reinhardtii. FEBS Letters 444: 102-105.

- [25] Badger, M.R., and Price, G.D. (1994) The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 369-392.
- [26] Alber, B. E., and Ferry, J. G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 91, 6909-6913.
- [27] Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Ueki, T., Miyachi, S., and Tsukihara, T., (2000). X-ray structure of γ -carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration. *J. Biol. Chem.* 275: 5521– 5526.
- [28] Kimber, M. S., and Pai, E. F. (2000) The active site architecture of *Pisum sativum* β -carbonic anhydrase is a mirror image of that of α -carbonic anhydrases. *The EMBO J.* 19(7): 1407-1418.
- [29] Sugrue, M.F., Gautheron, P., Grove, J., (1988) MK-927: A topically effective ocular hypotensive carbonic anhydrase inhibitor in rabbits. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 29: 81.
- [30] McIntosh, J.E.A., (1969) Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and dorsolateral prostate of the rat. *Biochem. J.*, 114: 463.
- [31] Özensoy, Ö., Işık, S., Arslan, O., Arslan, M., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of red blood cell ostrich (*Struthio camelus*) carbonic anhydrase with a series of aromatic and heterocyclic sulfonamides. *J. of Enz. Inhib. and Med. Chem.*, 20: 383 – 387.
- [32] Wang, R.F., Serle, J.B., Podos, S.M., Sugrue, M.F., (1988) The ocular hypotensive effect of topical carbonic anhydrase inhibitor MK-927 in glaucoma monkeys. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 29: 16.
- [34] Kivela, A., (2003) Carbonic anhydrase in normal and neoplastic gastrointestinal tissues With special emphasis on isoenzymes I, II, IX, XII, and XIV, Ph.D Thesis, Oulu, U., Faculty of Medicine, Department of Anatomy and Cell Biology, Finland.
- [35] Amoroso, G., Morel-Avrahov, L., Müller, D., Klug, K., Sültemeyer, D., (2005) The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Molecular Microbiology* 56(2): 549-558.
- [36] Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., (2004) “Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators (Taylor & Francis Medicinal Chemistry Series)”, CRC Press LLC Florida, USA, s. 2-20.
- [37] Soltes-Rak, E., Mulligan, M.E., Coleman, J.R., (1997) Identification and characterization of a gene encoding a vertebrate-type carbonic anhydrase in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 179: 769-972.

- [38] Karlson, J., Clarke, A.K., Chen, Z.Y., Hugghins, S.Y., Park, Y.I., Husic, H.D., Moroney, J.V., Samuelsson, G., (1998) A novel α -type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamidomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO₂. *EMBO Journal* 17: 1208-1216.
- [39] Voet, D., Voet, J.G., (1995) *Biochemistry*, Second Edition, John Wiley & Sonss, Inc. Toronto, Canada, s.377.
- [40] Cronk, J. D., Endrizzi, J.A., Cronk, M.R., O'Neill, J.W., and Zhang, K.Y.J., (2001) Crystal structure of *E. coli* β -carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity *Protein Sci.* 10: 911–922.
- [41] Strop, P., Smith, K.S., Iverson, T.M., Ferry, J.G., and Rees, D.C., (2001) Crystal structure of the “cab”-type beta class carbonic anhydrase from the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 10299-10305.
- [42] Covarrubias, A.S., Bergfors, T., Jones, T.A., Högbom, M., (2006) Structural mechanics of the pH-dependent activity of β -carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* 281 (8): 4993-4999.
- [43] Iverson, T.M., Alber, B.E., Kisker, C., Ferry, J.G., and Rees, D.C., (2000) A Closer Look at the Active Site of γ -Class Carbonic Anhydrases: High-Resolution Crystallographic Studies of the Carbonic Anhydrase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry* 39, 9222-9231.
- [44] Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B.E., Ferry, J.G., and Rees, D.C., (1996). A left-handed beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *EMBO J.* 15: 2323–2330.
- [45] Meltzer, D.E., *Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells.* Elsevier Academic Press, New York, USA 2003, s.678.
- [46] Supuran, C.T., Scozzafava, A., and Casini, A., (2003) Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews* 23: 146-189.
- [47] Parkkila, S., (2000) An overview of the distribution and function of carbonic anhydrase in mammals. In *The Carbonic Anhydrases – New Horizons*, Chegwiddden W.R., Edwards, Y., and Carter, N., Eds., Birkhauser Verlag, Basel s.79-93.
- [48] Chegwiddden W.R., and Carter, N., (2000) Introduction to the carbonic anhydrases. In *The Carbonic Anhydrases – New Horizons*, Chegwiddden W.R., Edwards, Y., and Carter, N., Eds., Birkhauser Verlag, Basel, s. 14-28.
- [49] Götz, R., Gnann, A., and Zimmerman, F.K. 1999. Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast* 15: 855–864.

- [50] Winum, J.Y., Scozzafava, A., Montero, J.L., Supuran, C.T. (2004) "Sulfamates and Their Therapeutic Potential", Medicinal Research Reviews, Wiley Periodicals, Inc. 25 (2): 186-228.
- [51] Franchi, M., Vullo, D., Lallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Supuran, C.T. (2003) "Carbonic Anhydrase Inhibitors, Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane Cancer-associated Isozyme IX with Lipophilic Sulfonamides", J Enzyme Inhib. And Med. Chem., 184, 333-338.
- [52] Vademecum 2006 Modern İlaç Rehberi 29.basım
- [53] <http://en.wikipedia.org> (15.08.08)
- [54] <http://www.cancer.gov/Templates/drugdictionary.aspx?CdrID=484587> (15.08.08)
- [55] <http://www.wrongdiagnosis.com/medical/benzolamide.htm> (15.08.08)
- [56] Supuran, C.T., (2003) Indisulam: an anticancer sulfonamide in clinical development. Expert Opinion on Investigational Drugs, 12 (2): 283-287.
- [57] Hasenekeoğlu, İ., Yeşilyurt, S., (2002) Mikrobiyoloji. Erzurum s.317.
- [58] http://tr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae (15.08.08)
- [59] Goffeau A. et al. (1996) "Life with 6000 genes", Science 274(5287):546, 563-7.
- [60] www.genedb.org (15.08.2008)
- [61] Cleves, A.E., Cooper, D.N.W., Barondes, S.H., Kelly, R.B., (1996) A new pathway for export in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Cell Biology 133(5): 1017-1026.
- [62] Clark, D., Rowlett, R.S., Coleman, J.R., and Klessig, D.F., (2004) Complementation of the yeast deletion mutant Δ NCE103 by members of the β class of carbonic anhydrases is dependent on carbonic anhydrase activity rather than on antioxidant activity. Biochem.J. 379: 609-615.
- [63] Aguilera, J., van Dijken, J.P., de Winde, J.H., and Pronk, J.T., (2005) Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. Biochem. J. 391: 311-316.
- [64] <http://www.stratagene.com/manuals/200133.pdf> (15.08.2008)
- [65] www.promega.com Promega Technical Manual "pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems" 12/05 (15.08.2008)

- [66] <http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB063.pdf> (15.08.2008)
- [67] Johnston, J.R., “Molecular Genetics of Yeast”, Oxford University Pres, New York, 1994
- [68] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning 3, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 1989.
- [69] Temizkan, G., Arda, N., “Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler”, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (B/YOGEM), Yayın no: 2, Nobel Tıp Kitapevleri, 2004.
- [70] <http://bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/primer.cgi> (15.08.2008)
- [71] <http://www.restrictionmapper.org/cgi-bin/sitefind3.pl> (15.08.2008)
- [72] <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx> (15.08.2008)
- [73] Tura Kockar F., ‘Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene’, PH. D. Thesis, Cardiff School of Biosciences, Cardiff University (1999)
- [74] Aydoğan S., “Yönlendirilmiş Mutagenез ile Mutant hCAII Geninin Eldesi ve Mutant Proteinlerin İnhibitörlere Karşı İlginin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi (2006)
- [75] Taoka, Chen, X., Tarnuzzer R.W., Heeke G.V., Tu, C., Silverman, D.N., (1992) “Catalysis by mutants of human carbonic anhydrase II: effects of replacing hydrophobic residues 198 and 204” *Biochimica et Biophysica Acta*, 1159: 274-278.
- [76] Molecular techniques: Protein Chemistry and Molecular Cloning, Laboratory Manual, August 20-October 2, 2002, Interdisciplinary Center for Biotechnology Research University of Florida.
- [77] Arslan, O., (2003) *Biomoleküller Teori ve Uygulamalarıyla*, Balıkesir, s.244-251.
- [78] http://www.colorado.edu/Chemistry/chem4581_91/KFR.pdf (01.11.2008)
- [79] Laemmli, D. K., (1970), “Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄”, *Nature*, London, 227-680.
- [80] Covarrubias, A.S., Larsson, A.M., Högbom, M., Lindberg, J., Bergfors, T., Björkelid, C., Mowbray, S.L., Unge, T., and Jones, T.A., (2005), Structure and function of carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*, *The Journal of Biological Chemistry*, 280(19): 18782-18789.

- [81] Taoka, Chen, X., Tarnuzzer R.W., Heeke G.V., Tu, C., Silverman, D.N., (1992) "Catalysis by mutants of human carbonic anhydrase II: effects of replacing hydrophobic residues 198 and 204" *Biochimica et Biophysica Acta*, 1159: 274-278
- [82] Smith, K.S., Ferry, J.G., (1999) A plant type (β -Class) carbonic anhydrase in the Thermophilic Methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Journal of Bacteriology*, 181(20): 6247-6253.
- [83] Aydın, M., (2007) İnsan Karbonik Anhidraz I (hCA I) Geninin Klonlanması, *E.Coli*'de Ekspresyonu ve Phe91Asn Yönlendirilmiş Mutageneziyle Elde Edilen Mutant Enzimin İnhibitörlere Karşı İlgisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı,
- [84] Wilbur, K.M., and Anderson, N.G., (1948), Electrometric and colorometric determination of Carbonic anhydrase, *J. Biol. Chem.*, 176: 147.
- [85] Mc Intosh, J.E.A., (1970), Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and uterus of the rabbit, *J. Biochem.*, 120: 299.
- [86] Keha, E. E., (1981), Karbonik anhidraz enziminin saflastırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum.
- [87] Kaul, K., and Mattiasson Bo., (1987), Affinity Elution of almond Oxynitrilase from an Affinity Support Based on EUPERGIT C, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9, 294-302.
- [88] Ozensoy, O., Arslan, O., Oznur, S. (2004), A new method for purification carbonic anhydrase by affinity chromatography, *Biochemistry (Moscow)*, 69 (2), 216-219.
- [89] Arslan, O., (1994), Glaucoma Hastalığı Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- [90] Garaj, V., Puccetti, L., Fasolis, G., Winum, J.Y., Montero, J.L., Scozzafava, A., Vullo, D., Innocenti, A., Supuran, C.T., (2004), Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I,II and IX with silfonamides incorporating 1,2,4-triazine moieties, *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 14: 5427-5433.
- [91] Supuran, C.T., (2008), Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, *Nature Reviews*, 7: 1-15.
- [92] Nishimori, I., Vullo, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., (2005), Carbonic anhydrase inhibitors. The mitochondrial isozyme VB as a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors, *J.Med.Chem.* 48: 7860-7866.

- [93] Vullo, D., Innocenti, A., Nishimori, I., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Supuran, C.T., (2005), Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the transmembrane isozyme XII with sulfonamides-a new target for the design of antitumor and antiglaucoma drugs?, *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 15: 963-969.
- [94] <http://www.restrictionmapper.org/cgi-bin/sitefind3.pl> (15.08.2008)
- [95] <http://www.fermentas.com/profiles/electrophoresis/pdf/generuler1kb031>
(15.08.2008)
- [96] <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/marksm0441.htm>
(15.08.2008).