

**FARKLI URASİL TÜREVLERİNİN BAZI METABOLİK ENZİMLER
ÜZERİNDE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Kübra ÇAVUŞOĞLU

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK
2019
Her hakkı saklıdır**

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI URASİL TÜREVLERİNİN BAZI METABOLİK ENZİMLER
ÜZERİNDE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Kübra ÇAVUŞOĞLU

KİMYA ANABİLİM DALI

AĞRI
2019

Her hakkı saklıdır



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



TEZ ONAY FORMU

FARKLI URASİL TÜREVLERİNİN BAZI METABOLİK ENZİMLER ÜZERİNDE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK danışmanlığında, Kübra ÇAVUŞOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, 14/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Murat GÜNEY

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İmdat AYGÜL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

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

Prof. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ağrı-BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.

ProjeNo: FEF.15.007

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

ÖZET

FARKLI URASİL TÜREVLERİNİN BAZI METABOLİK ENZİMLER ÜZERİNDE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Kübra ÇAVUŞOĞLU

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Urasil, ribonükleik asitlerin yapısına yeralan dört nükleobazdan bir tanesidir. Urasil türevlerinin, birçok biyolojik ve kemoterapotik kullanım sahasına sahip olduğu belirlenmiştir. Karbonik anhidraz (CA) (E.C. 4.2.1.1) enzimi, hemen hemen tüm canlılarda CO_2 'in hidratlanarak HCO_3^- ve H^+ 'ya dönüşümünü tersinir olarak katalizleyen çok önemli bir enzimdir. Glutasyon redüktaz (GR) enzimi okside glutasyonun (GSSG) indirgenmiş forma (GSH) dönüşümünü katalizleyen, flavoprotein oksidoredüktaz enzim ailesinin en bilinen üyesidir, ayrıca glutasyon metabolizmasında görev alan en önemli enzimdir. Bu çalışmada, insan eritrosit karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için afinite jeli kullanıldı. Glutasyon redüktaz enzimi ise saf olarak alındı.

Çalışmanın ikinci kısmında bazı urasil türevlerin bu enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Bu amaçla enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren bu maddeler için IC_{50} değerleri hesaplandı.

2019, 52 sayfa.

Anahtar Kelimeler: Glutasyon redüktaz, Karbonik anhidraz, Urasil.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DIFFERENTIAL URASIL DERIVATIVES ON SOME METABOLIC ENZYMES

Kübra ÇAVUŞOĞLU

Ağrı Ibrahim Cecen University

Science Institute

Chemistry Department

Administrator: Assoc. Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

Uracil is one of four nucleobases located in the structure of ribonucleic acids. Uracil derivatives have been identified as having many biological and chemotherapeutic sites. The carbonic anhydrase (CA) (E.C. 4.2.1.1) enzyme is a very important enzyme that reversibly catalyzes the conversion of HCO_3^- and H^+ to hydration of CO_2 in almost all living organisms. Glutathione reductase (GR) is the most known member of the family of flavoprotein oxidoreductase enzymes, which catalyzes the conversion of enzyme oxidized glutathione (GSH) to reduced form (GSH), and is also the most important enzyme involved in glutathione metabolism. In this study, affinity gel was used to purify human erythrocyte carbonic anhydrase enzyme. Glutathione reductase enzyme was purified.

In the second part of the study, the inhibitory effects of some uracil derivatives on these enzymes were examined. For this purpose, IC_{50} values were calculated for these substances which showed inhibitory effect on enzyme activities.

2019, 52 pages.

Key words: Carbonic anhydrase, Glutathione reductase, Uracil.

TEŞEKKÜR

Yükseklisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve uygulama Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle bu tez kapsamındaki docking verileri için Bahçeşehir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Serdar DURDAĞI'ya teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana rehber olan, sabrını, maddi ve manevi desteğini benden hiç esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK'e teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı Annem'e, Babam'a, çok değerli Ablama sonsuz teşekkürlerimi ve şükran duygularımı sunarım.

Kübra ÇAVUŞOĞLU

Ocak 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi.....	6
1.2. Karbonik Anhidrazların Katalitik ve İnhibisyon Mekanizması	8
1.3. Glutatyon redüktaz enzimi	14
1.4. Moleküler dinamik çalışmaları	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeleri	26
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	26
3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Protein Tayini	28
3.2.1.a. Kantitatif protein tayini	28
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini	28
3.2. 2. GR enziminin aktivitesinin ölçümü	28
3.2. 3. Karbonik anhidraz aktivite tayini	30
3.2.4. Afinite kromatografisi jelinin hazırlanması	30
3.2.4.a. Afinite kolonunun paketlenmesi	31
3.2.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	32
4.2. İnhibitörler İçin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları.....	32
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR	45

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

GR	Glutasyon redüktaz
CA I	Karbonik anhidraz I
CA II	Karbonik anhidraz II
5-FU	5-florourasil
5-ClU	5-Klorourasil
6-MU	6-Metilurasil
1,3-DMU	1,3-Dimetilurasil
5-HMU	5-Hidroksimetilurasil
CNBr	Siyanojen bromür
E	Enzim
EC	Enzim komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ES	Enzim-substrat kompleksi
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
P	Ürün
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklor asetik asit
Tris	Trihidroksimetil aminometan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Pürin ve pirimidin bazları.....	1
Şekil 1.2. Urasil ve bazı 5-süstitüe türevlerinin dipol moment vektörleri.....	2
Şekil 1.3. Karbonik anhidraz enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi.....	9
Şekil 1.4. Karbonik anhidraz enziminin eritrositler ve bazı dokulardaki rolü.....	14
Şekil 1.5.a. İndirgenmiş glutatyon yapısı ,GSH, (γ-L- glutamil-L-sisteinil-glisin).....	15
Şekil 1.5.b. Okside glutatyonun yapısı ,GSSG, 2(γ-L- glutamil-L-sisteinil-glisin).....	15
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik.....	30
Şekil 4.2. GR enzimi ile 5-FU (8) maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-FU] grafiği.....	32
Şekil 4.3. GR enzimi ile 5-ClU (9) maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-ClU] grafiği.....	32
Şekil 4.4. GR enzimi ile 6-MU (10) maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[6-MU] grafiği.....	33
Şekil 4.5. GR enzimi ile 1,3-DMU (11) maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[1,3-DMU] grafiği.....	33
Şekil 4.6. GR enzimi ile 5-HMU (12) maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-HMU] grafiği.....	34
Şekil 4.7. hCA I izoenzimi ile 5-FU (8) maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-FU] grafiği.....	34
Şekil 4.8. hCA II izoenzimi ile 5-FU (8) maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-FU] grafiği.....	35
Şekil 4.9. hCA I izoenzimi ile 5-ClU (9) maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-ClU] grafiği.....	35
Şekil 4.10. hCA II izoenzimi ile 5-ClU (9) maddesinin IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-ClU] grafiği.....	36

Şekil. 4.11. hCA I ile 3 nolu urasil türevi için elde edilen docking görüntüsü.....	37
Şekil. 4.12. hCA II ile 7 nolu urasil türevi için elde edilen docking görüntüsü.....	37
Şekil. 4.13. GR ile 2 nolu urasil türevi için elde edilen docking görüntüsü.....	38

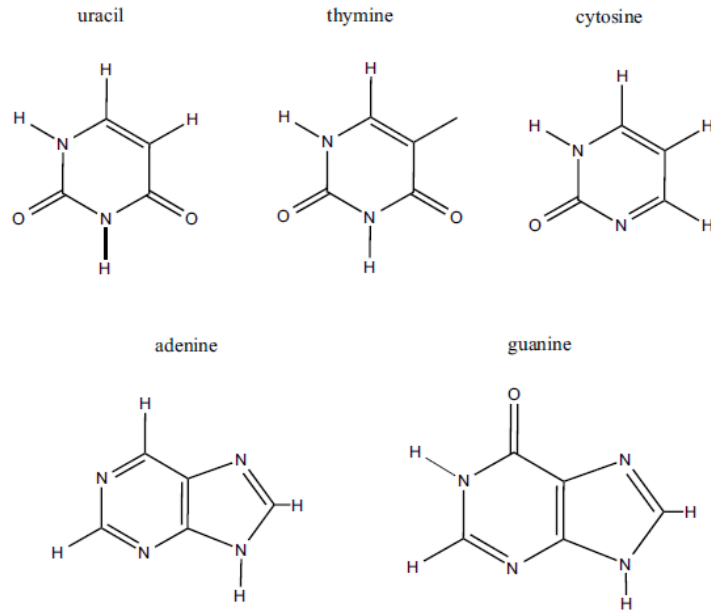


ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. GR enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği.....	26
Çizelge 3.2. İnsan eritrosit CA enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği.....	28
Çizelge 4.1. İnsan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 4B-tirozin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	31
Çizelge 4.2. Bileşik 1-12 ve GR için elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	31
Çizelge 4.3. Bazı urasil türevleri için hCA I, hCA II için elde edilen IC ₅₀ değerleri....	34
Çizelge 4.5. Bazı urasil türevlerinin hCA I, II ve GR enzimleri üzerindeki docking değerleri	36

1. GİRİŞ

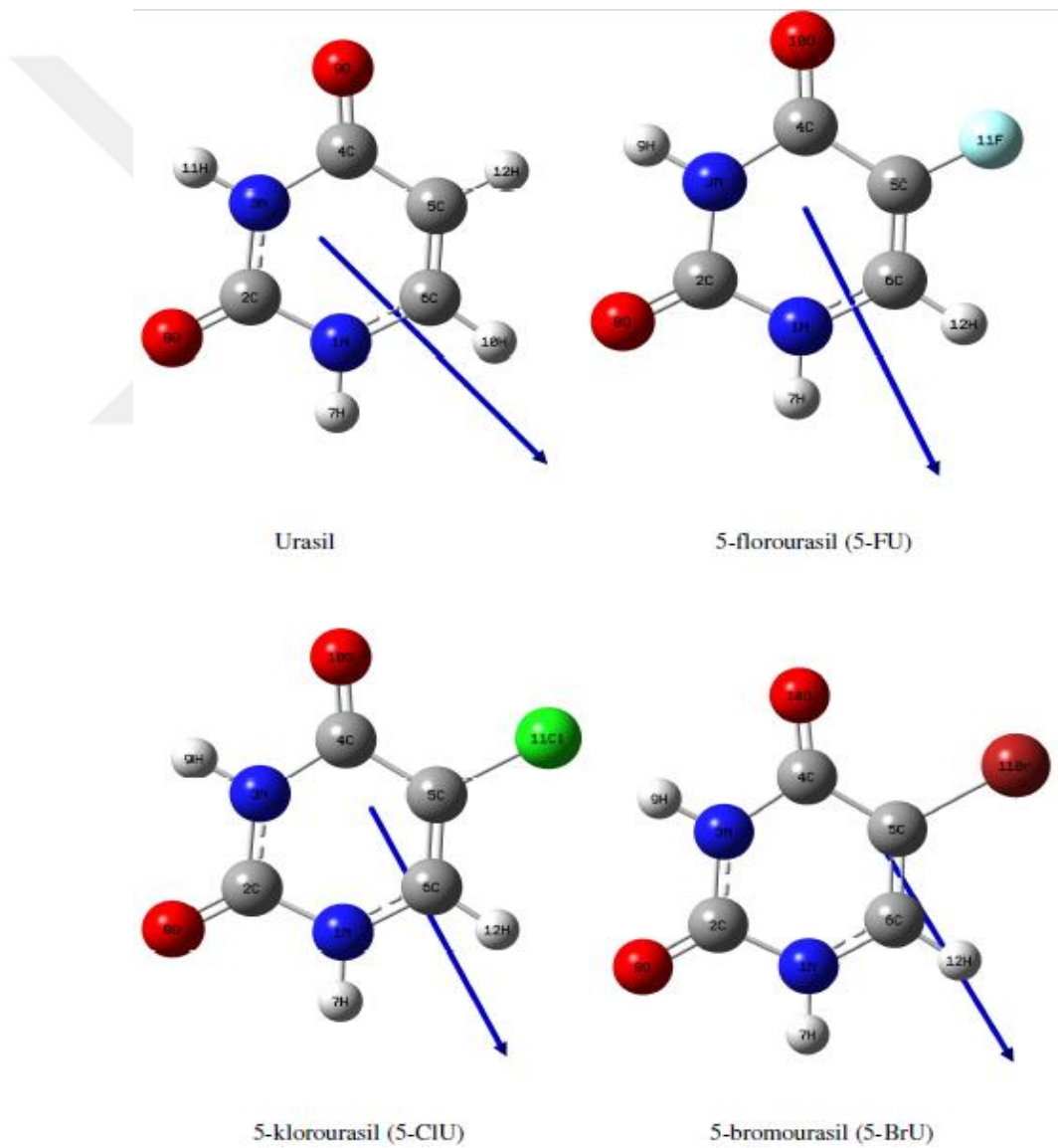
Nükleik asitler, genetik bilginin taşıyıcıları oldukları için kimyasal ve biyolojik süreçlerde çok önemli bir yere sahiptir. Bir hücrenin temel yapısını nükleik asitler ve proteinler oluşturur. Bugün yasayan organizmalarda en ilgi çekici moleküller, nükleik asitlerdir. Nükleik asit molekülleri, bütün organizmalarda temel yaşam süreçlerinin ilk basamağında yer alır. Nükleik asitlerin en önemli bileşenleri pürin ve pirimidin bazları olan adenin, guanin, sitozin, timin ve urasildir. DNA ve RNA' nın temel bileşenleri olmaları sebebiyle bu biyomoleküller ve türevleri biyolojik yaşamda büyük önem taşımaktadır. Bunlardan urasil ve bazı türevlerinin, ilgi çekici biyolojik ve kemoterapotik özellikler sergilediği tespit edilmiştir. Urasil, pirimidinlerin grubuna ait önemli bir nükleobaz olup, ilaç ve enzimlerin yapısında önemli bir yere sahiptir (Rastogi 2011).



Şekil 1.1. Pürin ve pirimidin bazları.

Pirimidin halkasının C5 ve C6 pozisyonlarından türevlendirilmeleri yolu ile oluşan bileşikler gibi sentetik pirimidinler üzerine yapılan araştırmalar ilginç biyolojik özelliklerin varlığını ortaya koymaktadır. Göcen (2012) yaptığı tez çalışmasında urasil

halkasına değişik fonksiyonel grupların yerleşmesi ile sistemin dipol momentinde değişimler oluştuğunu göstermiştir. Halojen atomlarının yüksek elektronegatifliği, sistemin dipol momentinde azalmaya neden olmuş. Bundan dolayı, bu çalışmada urasil ve 5-süstitüe türevleri olan 5-florourasil (5-FU), 5-bromourasil (5-BrU), 5-klorourasil (5-ClU), 5-iyodourasil (5-IU), 5-metilurasil (5-MeU), 5-nitrourasil (5-NU) ve 5-aminourasil (5-AU) moleküllerinin titreşimsel ve yapısal özelliklerini incelemiştir (Göcen 2012).



Şekil 1.2. Urasil ve bazı 5-süstitüe türevlerinin dipol moment vektörleri.

Göcen'in tez çalışmasında halojen atomun elektronegatifliğinin azalması sonucu dipol momentinin azalma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Dipol momentlerin sıralaması bu moleküller için $5\text{-FU} < 5\text{-BrU} < 5\text{-ClU} < 5\text{-IU} < \text{urasil}$ şeklinde olmuştur. Urasil ve 5-XU ($X=\text{F, Cl, Br, CH}_3$) türevlerinin dipol momentlerin sıralaması DFT metodu ile yapılan hesaplarda baz seti değişikliği ile değişmemiştir. Urasil ve 5-XU ($X=\text{F, Cl, Br}$) türevlerine ait dipol moment vektörleri Şekil 1.1' de verilmiştir (Göcen 2012).

Urasil ve türevleri DNA ve RNA'nın yapısında görev alabildikleri için temel biyolojik süreçlerde önemli rollere sahiptirler. Urasilin 5-süstitüe 5-XU ($X=\text{F, Cl, Br, I, CH}_3, \text{NO}_2, \text{NH}_2$) türevleri arasında, 5-halojen urasiller ($X=\text{F, Cl, Br, I}$) özellikle dikkat çekicidir (Soni *et al.* 1996). Urasilin 5-halojen urasile trasformasyonu, urasilin kimyasal ve spektroskopik özelliklerini önemli ölçüde değiştirir. Urasilin 5-XU ($X=\text{F, Cl, Br, I}$) türevleri HIV virüsüne karşı test edilmiştir (Katzung 2007). Urasilin bu türevleri, çeşitli biyolojik olayları etkileyerek nükleik asitlerin proteinlerle etkileşimini değiştirmektedir (Ogino *et al.* 2002). Ayrıca 5-XU ($X=\text{F, Cl, Br, I}$) molekülleri hasarlı DNA' yı onarıcı sistem molekülleri olarak görev yaparlar (Liu *et al.* 2002).

5- Fluorourasil, bir pirimidin analogudur ve kanser tedavisinde kullanılan antimetabolit bir ilaçtır. 5-XU ($X=\text{F, Cl, Br, I, CH}_3, \text{NO}_2, \text{NH}_2$) türevlerinin arasında 1957 yılında ilk defa tıpta kullanılan 5-FU, daha sonra baş, boyun ve meme tümörlerinin tedavisinde etkin bir yöntem olarak ve kanser kemoterapisinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Wang *et al.* 2003, Argiris *et al.* 2003). Ayrıca antibakteriyel aktivite sergiler ve antibiyotiklerin bakterisit etkisini güçlendirir. 5-FU, kanser hücrelerinin içinde bulunan timidilate sentetaz adı verilen enzime bağlanarak hücreler üzerinde etkisini gösterir. 5-FU bir antimetabolittir ve pirimidin antagonisti olarak, DNA sentezi ile etkileşerek hücre bölünmesini inhibe eder (Blicharska and Kupka 1983). 5-FU potent bir radyasyon duyarlaştırıcısıdır. Bu yüzden ilerlemiş lokal baş-boyun, akciğer ve rektum tümörlerinin tedavisi için radyoterapi ile eş zamanlı olarak kullanılabilir (Liu *et al.* 2002).

Klorlu pirimidinler, son derece etkili bir kardeş kromatid değişimleri indükleyicisi olduğu kadar, etkili mutajen, klastojen ve toksik maddelerdir. 5-ClU antitümör aktiviteye sahiptir ve bazı metal (II) kompleksleri ile şekillenir. İnsan fotogetleri

tarafından salgılanan peroksidazların, insan vücudundaki iltihaplı dokularda 5-CIU ve 5-BrU formasyonunu kolaylaştırdığı öne sürülmüştür (Henderson *et al.* 2003).

Her canlının hayatını devam ettirmesi için dışarıdan aldığı besinleri kendi yapısına uygun biyolojik moleküllere seçici ve etkili bir şekilde dönüştürmesi gerekmektedir. Canlı organizmalarda, bu dönüşümün meydana geldiği kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmaksızın % 100 'lük verim sağlayan biyolojik katalizörlere enzim denir. Enzimler proteinlerin en büyük ve özelleşmiş şeklidir. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır (Nelson and Cox 2013).

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadırlar.
2. Enzimler aynı tür reaksiyonları defalarca gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim daima bir çeşit veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler.
4. Enzimler katalizledikleri tepkimelerin aktivasyon enerjilerini düşürür.
5. Oluşacak reaksiyonun hızlı bir şekilde dengeye ulaşmalarına vesile olurlar.
6. Enzimler hem canlı hem de cansız ortamda görev yaparlar.

Enzim alanında yapılan ilk çalışmalar sindirim enzimleri ile ilgili olup 1760 ile 1825 yılları arasında rastlanmaktadır. 1825 yılında Jön Jacob BERZELLİUS, nişastanın sülfirik asitten daha hızlı bir şekilde parçalanmasında, buğdaygillerden kazanılan bir enzim karışımının etki etmesinden son derece etkilenmiştir. İlk defa James B. SUMNER 1926 yıllarında Canavalia ensiformis adındaki bir fasulye türünden saf ve kristal halde üreaz enzimi elde etmeyi başardı. Bu şekilde enzimlerin protein yapısında olduğunu ileri sürdü. Bugün yaklaşık 2000 enzim tanınmaktadır. Bunların pek çoğu homojen halde ve saf olarak elde edilmiştir. Bunlardan en az 200 kadarı saflaştırıldıktan sonra kristalize hale getirilmiştir (Gözükara 1997).

Tüm enzimler enzim kataloğuna, dört basamaklı bir sayı olan EC numarası altında girerler. İlk basamak 6 temel sınıftan birine üyeliği belirtir. Sonraki ikisi alt sınıfları ve alt-alt sınıfları belirtir. Son basamak ise ilk üç numaraya sahip enzimler arasındaki sırasını gösterir. Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon spesifikliğine sahip enzimleri içerir (Keha ve Küfrevioğlu 2008).

1- **Oksidoredüktazlar;** İki substrat arasındaki elektron alışverişini katalizleyen enzimlerdir.

2- **Transferazlar;** Bir verici substrattan alıcı bir substrata hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.

3- **Hidrolazlar;** Bir su (H_2O) molekülünün katılmasıyla ester, peptit, eter, glikozit, C- halojenür, anhidrit veya P-N bağların parçalanmasını sağlayan enzimlerdir.

4- **Liyazlar;** Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlarda grupların uzaklaştırılıp çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

5- **İzomerazlar;** Optik, geometrik yada yapısal izomerlerin birbirine dönüşümü şeklinde tekrar düzenlenmesini gerçekleştiren enzimlerdir.

6- **Ligazlar;** ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir işlemdir. Enzimlerin büyük bir kısmı protein yapısında olduğundan şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar. Bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu

oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir (Nelson and Cox 2013).

Enzim aktivitesini yani enzimli reaksiyonların hızlarına etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz:

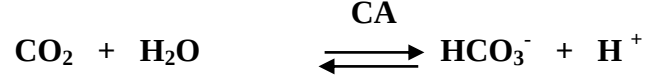
1. Substrat konsantrasyonu
2. Enzim konsantrasyonu
3. pH
4. İyonik şiddet
5. İnhibitör ve aktivatörlerin varlığı
6. Sıcaklık

Bazı proteinler afinite kromatografisiyle çoğu kez bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Adsorpsiyon kromatografilerinin bir çeşidi olan afinite kromatografisi, istenen molekülün saflaştırılmasında, matriks adındaki bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine yani liganda tersinir ve spesifik olarak bağlandığı bir yöntemdir. Farklı jeller matriks olarak kullanılabilir. Bunlardan birkaçı; Sephadex, Sepharose, Biogeldir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Nelson and Cox 2013; Senturk 2017).

1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz tüm organizmalarda genel olarak bulunan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir (karbonat hidroliyaz E.C.4.2.1.1). Sığır eritrositlerinden ilk defa keşfedilen karbonik anhidraz (CA), canlılarda CO_2 'nin

hidratasyonu ve HCO_3^- 'ın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (Supuran and Scozzafava 2000).



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

Çinko bağlı enzimin on altı izoenzimi farklı inhibitörlere göre hassasiyeti ve katalitik aktivitesi, hücre içinde bulunma yerindeki farklılığı göre tanımlanmışlardır. Bu izoenzimlerin bazıları sitozolik (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII), diğerleri membrana bağlı (CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV), iki tanesi mitokondriyel (CA VA ve CA VB) ve bir tanesi salgıda salgılanır (CA VI) (Hilvo *et al.* 2005). CA XV izoformu insanlarda ve diğer maymunlarda ekspresiyona uğramazken fare ve diğer yüksek omurgalılarda bol miktarda eksprese olur (Hilvo *et al.* 2005). CA bağlı proteinler olarak adlandırılan (CARPs): CARP VIII, CARP X ve CARP XI olmak üzere üç tane nonkatalitik formu bulunmaktadır (Supuran 2004; Ekinci *et al.* 2015).

Şu ana kadar alpha (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), zeta (ζ), eta (η) ve theta (θ) olarak adlandırılan ve değişik kaynaklardan gelen CA ların yedi sınıfı bulunmaktadır (De Simone *et al.* 2015). CA'lar alternatif metal kofaktörü olarak kadmiyumu kullanan ζ formu dışında, çinko içeren metalo enzimlerdir (Lane *et al.* 2005; Xu *et al.* 2008). Ek olarak γ - CA'lar en azından anaerobik Archaea *in vivo* ortamda demir içerirler (Tripp *et al.* 2004; Macauley *et al.* 2009). CA'lar tarafında katalizlenen reaksiyon organizmalardaki asit-baz düzenlemesinde çok önemlidir. CA'lar omurgalılarıdaki kemik erimesi, glukoneogenez, vücut sıvısının üretimi, CO_2 ve HCO_3^- ün taşınması gibi pek çok diğer fizyolojik süreçlere katılır (Sly and Hu 1995).

Bugüne kadar, CA'ların 7 farklı sınıfı belirlenmiştir: α , β , γ , δ , ζ , η ve θ (Zimmerman *et al.* 2007; De Simone *et al.* 2015). Önceden ϵ -CA olarak bilinen bir sınıf (So *et al.*

2004), archaeal Cab tipi ve bitki tipi β CA'larda olan kıvrıma benzer bir kıvrım gösteren kristalografik yapısına (Sawaya *et al.* 2006) dayanılarak yeni bir β CA tipi olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Kimber and Pai 2000). ζ CA'da aktif bölgenin geometrisi β CA'lardakinin hemen hemen aynısıdır ve aynı zamanda kıvrımda bazı benzerlikler vardır ki bu kıvrım ζ CA'ların β CA'lardakinin mesafe olarak ayrılmış alt tipini temsil edebileceği önermesine yol açmıştır (Xu *et al.* 2008).

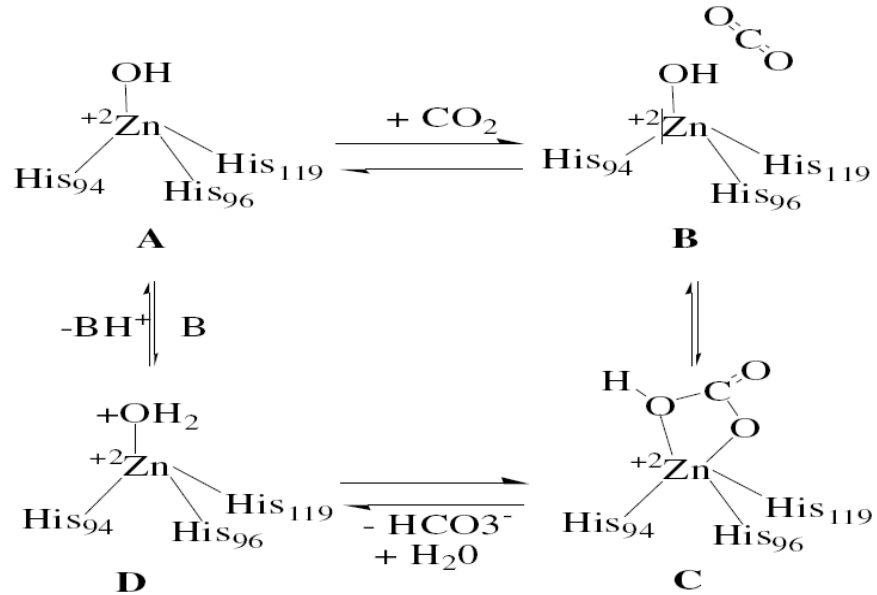
Üç ana sınıf CA (alfa, beta ve gama) lar her tarafa dağılmışken, δ CA'lar yalnızca tek hücreli deniz otlarında ve diğer deniz flantomlarında, ζ CA'lar yalnızca tek hücreli deniz otlarında bulunur. CA gama orthologları, archaea bakteri ve bitkilerde bulunur (Parisi *et al.* 2004; Zimmerman *et al.* 2007). Fakat hayvanlarda ve mantarlarda ikinci planda kalmaktadır. α sınıfı Archea'larda bulunmamaktadır. Fakat bakterilerde ve eukaryalarda yeterli derecede bulunmaktadır, mantarların sadece filamentous tipi mantarlar α CA'yı içermektedir (Elleuche and Poggeler 2009). Bitkilerde ve hayvanlarda α CA'lar birçok izoform halinde bulunmaktadır. Örneğin CA enziminin omurgalılarda 16 izoenzimi mevcuttur maymunlar dışındaki memelilerde 15 α CA izoenzimi (insanlarda dahil olmak üzere) tanımlanmıştır (Sly and Hu 1995; Fabre *et al.* 2007). β CA'lar archae ve bakterilerin etki alanlarına ait olan pek çok türü ve eukaryalarda dahil olmak üzere muhtemelen tüm bitki ve mantar türlerini kapsayan en yaygın dağılıma sahip sınıf olarak görülür (Hewett-Emmet 2000). β CA'lar aynı zamanda bir dizi insan patojenlerinde mantarlar/mayalar ve bakteriler olarak nitelendirilmiştir ve inhibisyon profilleri sülfanil amidler, anyonlar, karboksilatlar ve borik asitler gibi çeşitli etmenler vasıtasıyla keşfedilmiştir (Klengel *et al.* 2005; Innocenti *et al.* 2008; Innocenti *et al.* 2009a,b; Schlicker *et al.* 2009; Işık *et al.* 2015).

1.2. Karbonik Anhidrazların Katalitik ve İnhibisyon Mekanizması

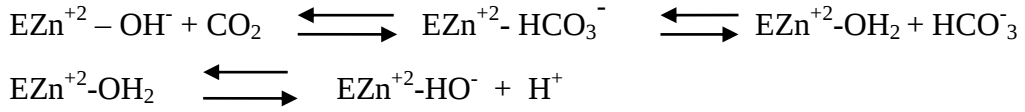
CA'larda Zn (II) iyonu kataliz için gereklidir (Kim *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000; Supuran and Scozzafava 2002). X-ışınları kristalografik çalışmaları metal iyonunun aktif bölgenin altında 3 histidin aminaasidi ve bir su molekülü/hidroksil iyonu ile koordine edildiğini göstermektedir (His 94, His 96 ve His 119) (Briganti *et al.* 1999;

Supuran and Scozzafava 2000; Kim *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2002). Ayrıca çinko ile bağlı tutulan su molekülü Glu 106'nın karboksilat bölgesine bağlı Thr 99'un hidroksil grubu ile de hidrojen bağı etkileşimleri yapmaktadır. Bu etkileşimler çinkoya bağlı su molekülünün nükleofilitesini ve substratın (karbondioksit) nükleofilik saldırıya yatkınlığını arttırmaktadır (Christianson and Fierke 1996; Briganti *et al.* 1999; Supuran and Scozzafava 2000; Kim *et al.* 2000; Lindskog and Silverman 2000).

İnsan CA II izoenziminde Val 121, Val 143 ve Leu 198 aminoasitleri çinko iyonuna bağlı bikarbonatın oluşumunda rol almaktadırlar. Daha sonra bikarbonat iyonu bir su molekülü ile yer değiştirip ve çözeltiliye geçerken, çinko iyonuna bağlı su molekülü yani katalitik olarak inaktif olan enzimin asidik formu oluşmaktadır (Briganti *et al.* 1999; Supuran and Scozzafava 2000; Kim *et al.* 2000). Enzimin tekrar katalitik olarak aktif hale (temel hali veya A formu) geçmesi için aktif bölgeden ortama proton transfer edilir, bu reaksiyon aktif bölgenin diğer rezidüleri (örneğin CA I ve CA II izoenzimlerinde His 64 amino asidi proton transferinde rol alır) veya ortamın tampon çözeltileri yardımıyla gerçekleşir. Bu işlem şematik olarak şu şekilde özetlenebilir (Christianson and Fierke 1996; Briganti *et al.* 1999).



Şekil 1.3. Karbonik anhidraz enziminin CO₂-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi.



CO₂ nin bikarbonata dönüşümlü hidrasyonu gibi fizyolojik reaksiyonun yanı sıra, CA'lar örneğin siyanatın karbonik asite veya siyanamidin üreye, aldehidin gem-diollere hidrasyonları: karboksilik veya sülfanamidlerin hidrolizi ve ayrıca hidrolitik prosesler gibi diğer birçok reaksiyonları katalizler (Supuran *et al.* 1997; Briganti *et al.* 1999; Guerri *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000; Tas *et al.* 2019). Ayrıca CA III'ün yapay fosfataz aktivitesi de görülmüştür (Kim *et al.* 2000). CA enzimlerinin fizyolojik öneme sahip CO₂ hidrasyonunun reaksiyonlarından başka reaksiyonları katalizleyip katalizlemediği belirsizdir. X-Ray kristal yapı belirleme çalışmaları şu an için 6 tane α (CA I-V ve CAXII izoenzimleri) (Stams and Christianson 2000) CA'ların varlığı ayrıca β ve γ CA ailelerinin varlığını da göstermiştir (Mitsuhashi *et al.* 2000).

Karbonik anhidraz hemen hemen tüm organizmalarda bulunur (Bottcher *et al.* 1994) ve CO₂ in HCO₃⁻ ve H⁺ ya hidrasyonunu tersinir olarak katalizler. 7 tane CA izoenzimi öncelikle memelilerden karakterize edildi (Tashian *et al.* 1991). CA izoenzimlerinin bilinen fizyolojik fonksiyonlarından biri CO₂ in ve HCO₃⁻'ün iç dönüşünü kolaylaştırmaktır, bu yüzden CA izoenzimleri fotosentez, kalsifikasyon, gaz dengesi, fizyolojik pH kontrolü gibi çeşitli süreçlerde anahtar rol oynarlar (Supuran 2008). CA'nın önemli görevlerinden biri gözde, merkezi sinir sisteminde, iç kulakta ve bazı diğer sistemlerde pH düzenlenmesi, su ve iyon transportudur (Parkila *et al.* 1994; Mori *et al.* 1998; Tas *et al.* 2019). İnsan eritrositlerindeki CA izoenzimlerinin aktiviteleri fizyolojik şartlar altında önemli değişiklikler göstermektedir. CA aktivitesindeki değişim diabetes mellitus ve hipertansiyon gibi metabolik hastalıklar ile bağlantılı olduğu görülmüştür (Parui *et al.* 1991; Tas *et al.* 2019).

α-CA'ların özellikleri: Genel olarak α-gen ailesi içinde üç farklı CA izoenzim grubu bulunur. Bu grupların bir tanesi memelilerde CA I, II, III, V, VII ve XIII içeren sitoplazmik CA'ları kapsamaktadır. Bu izoenzimlerden mitokondriye bağlı CA V dışındakiler çeşitli dokuların sitoplazmasında bulunurlar. Bir diğer izoenzim grubu ise

membrana bağılı CA'lar olarak adlandırılırlar; memelilerde CA IV, IX, XII ve XV izoenzimlerinden oluşmuşlardır. Bu izoenzimler çok farklı doku tipinde plazma membranına bağlıdır. Sonuncu grup CA bağılı proteinler olarak adlandırılan şaşırtıcı CA VIII, X ve XI izoenzimlerini içermektedirler (Tashian *et al.* 2000).

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

CA III ve V izoenzimleri için ise 64. rezidüdeki aminoasidin farklı olmasından dolayı proton transferi daha zayıf bir şekilde gerçekleşmekte ve dolayısıyla daha düşük bir katalitik aktivite gözlemlenmektedir. Ayrıca, her iki izoenzimde 65. rezidüde bir mutasyon (serin aminoasidi yerine daha dallanmış bir yan gruba sahip bir aminoasit) içermekte ve bu da proton transfer mekanizmasını inhibe etmektedir. CA III'te ise Phe-198 değişimi ile birlikte bu durum proton transfer mekanizmasının tamamen elimine olmasına yol açmakta ve bu durumda proton doğrudan sitoplazmaya aktarılmaktadır. Oysa CA I'de 64 ve 65. rezidülerin her ikisinde de bu durumun yüksek aktiviteli CA II'deki ile eşdeğer olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda temel değişim (modifikasyon) aktif bölgeye 67, 200 ve 204' teki histidin aminoasitlerinin ilavesi olarak görülmekte ve böylece aktif bölge çukuru küçülmektedir. Bu durumda proton transferinin His-200 ile gerçekleştiğine inanılmaktadır (Lindskog and Silverman 2000; Stams and Christianson 2000).

α -CA gen ailesinde filogenetik analizi sonucu sitoplazmik izoenzimlerin en eski olduğunu açığa çıkardılar. İlginç bir şekilde bu iki izoenzim omurgalılar içinde sınırlı rollere sahip olduğunu gördüler. CA V karaciğer ve kas mitokondrilerinde sınırlıdır, CA V buralarda çeşitli biyokimyasal yollar için bikarbonat iyonu sağlarken, CA VII nin rolü henüz belirlenmemiştir (Chegwidden and Carter 2000). Fakat ilginçtir ki, CA VII nin

oldukça korunumlu yapısı ve omurgalı canlıların soyundaki varlığı bu izoenzimin önemli bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir. Günümüze dek CA ile ilgili yapısal ve fonksiyonel evrimle ilgili çalışmaların çoğu daha geniş bir dağılıma sahip CA I ve II izoenzimleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Esbaugh and Tufts 2006).

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

Çoğu sitoplazmik CA izoenzimlerinde Pro-202 rezidüsünün mutasyonu Thr-199 kavisindeki dengesizlik katalitik etkinliğin artışına öncülük edecektir. İlginçtir ki, bu mutasyonlar memeli CA IV, XIV ve XV izoenzimlerinde gerçekleşmekte, fakat bu izoenzimlerde enerji bakımından olumsuzluk veren 202. rezidüdeki mutasyona rağmen Thr-199 un ilk konformasyonu korunmaktadır. Bu genellikle Cys-23 ve 203 arasındaki disülfid köprüsünün varlığı yüzündendir. Bu köprü tüm membrana bağlı CA

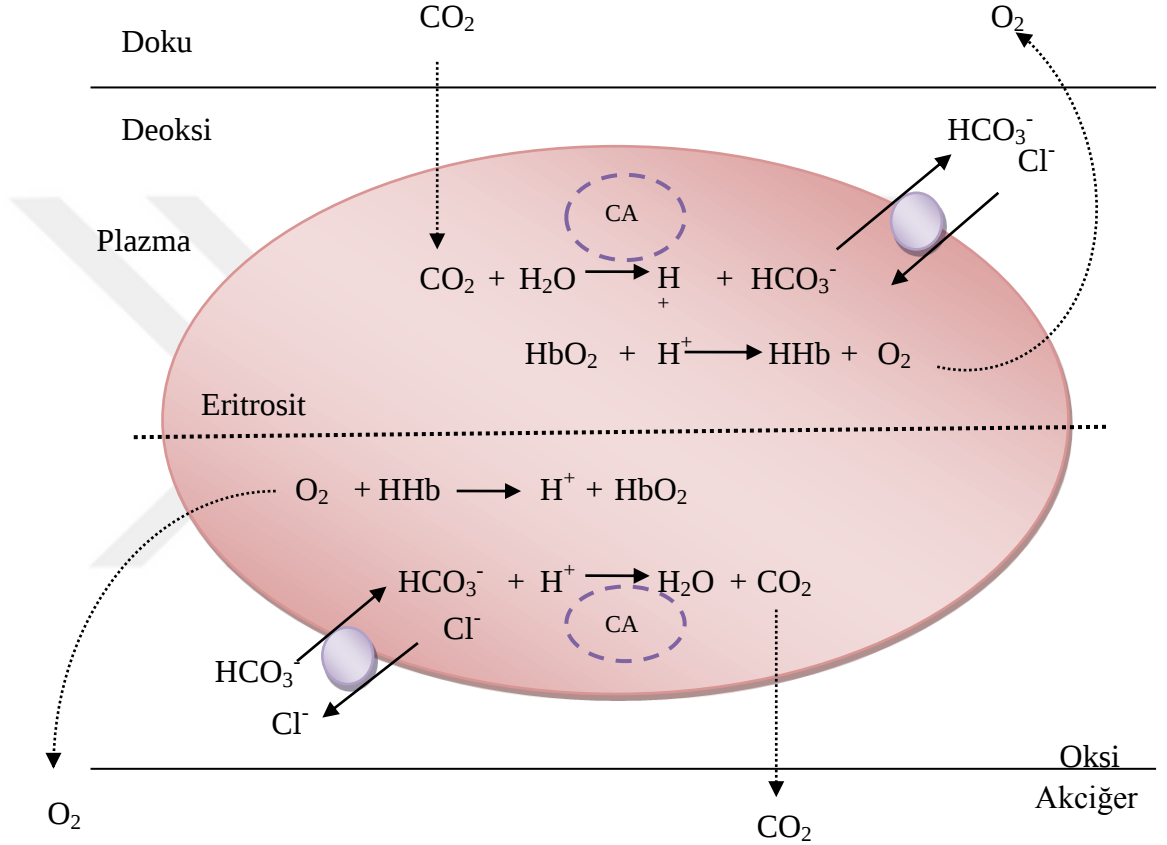
izoenzimlerini korumaktadır ve sert ekstraselüler bölge yüzeylerinde ekstra denge verdiğine inanıyorlar (Stams and Christianson 2000). Bu köprünün aynı zamanda SDS ile CA izoenzimlerinin denatürasyonunda membrana bağlı CA ların dayanıklılığını sağladığını düşünmüşlerdir (Whitney and Brigle 1982).

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

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

CA'nın eritrositlerdeki rolü: CA enziminin en önemli rollerinden biri de ilk bulunduğu yer olan eritrositlerdeki önemidir. Eritrositlerde CA tamamen sitoplazmikdir ve temelde CO₂'in taşınması ve salınmasında rol alır. İnsan eritrosit ghost membranlarının az miktarda membran bağlı CA IV enzimi içerdiği gösterilmiştir; fakat bu durumun hücreye spesifik bir ekspresyon olmadığı gösterilmiştir. CO₂ taşınması işlemi, moleküler CO₂'nin doku dışına difüze edilmesiyle başlar ve kan akışına ve oradan da eritrosit içerisine kısmi basınç gradienti yardımıyla alınmasıyla devam eder. Eritrositlerde CO₂, HCO₃⁻ ve H⁺ iyonlarına dönüştürülür. Bu işlem CA tarafından katalizlenir. HCO₃⁻ iyonu mekik yardımıyla hücre dışına gönderilir. Bu arada H⁺

hemoglobin veya non-karbonik asit tamponlarıyla, örneğin fosfat tamponları, tamponlanır. Bu işlem eritrositlerden CO₂'nin hidrasyonu sonucu oluşan son ürünlerin her ikisinin de uzaklaştırılmasını sağlar ve kandaki CO₂ miktarını maksimize eder. Solunum organlarında (solungaç, akciğer ve/veya deri) bu reaksiyonlar tersine dönüştürülür ve CO₂ basınç gradienti yardımıyla dışarı atılır (Şekil 1.4.) (Supuran 2004).



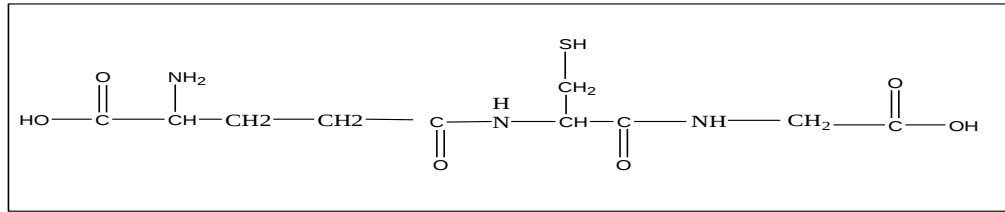
Şekil 1.4. Karbonik anhidraz enziminin eritrositler ve bazı dokulardaki rolü.

1.3. Glutasyon redüktaz enzimi: İnsan eritrositlerinde, pentoz fosfat yolunun fonksiyonu, eritrositlerin canlılığının temini açısından önemlidir. Normal bir eritrosit yaklaşık 120 ile 135 gün arasında bir yaşam süresine sahiptir. Olgunlaştığında eritrosit proteinleri sentezleyemez ve mitokondriden yoksundur. Eritrositler, glutasyon, koenzimler ve ATP gibi önemli bileşiklerin sentezi için enerjiye ihtiyaç duyarlar ve bu enerji glukozun metabolize edilmesiyle sağlanır. ATP, laktik asit oluşumuyla beraber anaerobik glikolizden sağlanır, ancak solunum zinciri yoluyla oksidatif fosforilasyon mümkün değildir. Pentoz fosfat yoluyla NADPH'ın oluşumu, methemoglobinin

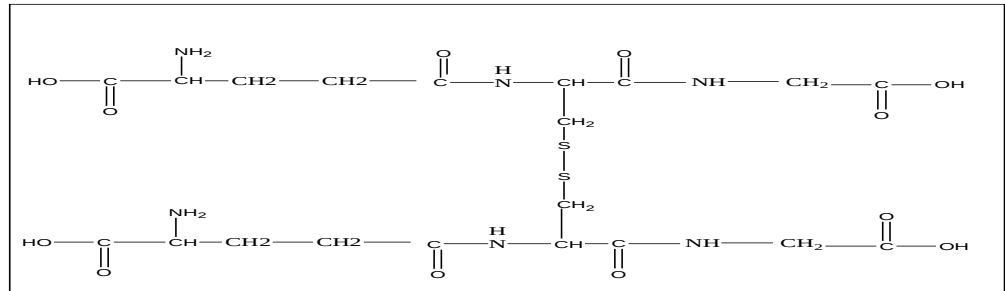
indirgenmesini (oksijene bağlanmayan hemoglobinin Fe^{+3} formu devamlı olarak oluşur) ve redükte formda glutatyon eldesini sağlar. Glutatyon, örneğin aktif yüzünde gerekli bir $-\text{SH}$ grubu içeren enzimler gibi moleküllerin redükte şekilde olmalarını temin etmek için bir indirgeyici bileşik gibi fonksiyon görür. Sonuç olarak glutatyon redükte formu GSH'nin NADPH tarafından rejenere edildiği GS-SG'ye okside edilir. GSSG'nin NADPH kullanılarak GSH'a dönüştüğü reaksiyon glutatyon redüktaz tarafından katalizlenir (Montgomery *et al.* 1996).

Glutatyon (γ -L-glutamil-L-sisteinil glisin) eritrositlerde ve diğer hücrelerde bulunan önemli bir tripeptiddir. Atipik bir tripeptiddir, çünkü sistein amino asitinin amino grubu ile peptid bağı oluşumunda L-glutamik asitin γ -karboksil grubu yer alır (Montgomery *et al.* 1996).

Glutatyon okside ve redükte olmak üzere iki formda bulunur (Şekil 1.5.a ve 1.5.b). İlk olarak 1888 yılında Ray-Pailhade tarafından maya hücresinde bulunarak “filothion” olarak adlandırılmıştır. 1921’de Hopkins tarafından saflaştırılarak kristallendirilmiş ve bugünkü ismi verilmiştir (Zubay 1988; Açan 1990).



Şekil 1.5.a. İndirgenmiş glutatyon yapısı, GSH, (γ -L- glutamil-L-sisteinil-glisin).



Şekil 1.5.b. Okside glutatyonun yapısı, GSSG, 2(γ -L- glutamil-L-sisteinil-glisin).

Glutasyon, hücrede ATP gerektiren iki ardışık reaksiyon ile sentezlenir. Bu reaksiyonları, γ -glutamil sistein sentetaz (γ -GSS) ve glutasyon sentetaz (GS) enzimleri katalizler (Toribio *et al.* 1996; Misra and Griffith 1998).



Normal şartlarda indirgenmiş glutasyon hücelere göre değışmekle beraber 0,5 ile 10 mM düzeyinde bulunur. Eritrositlerde glutasyonun çoğu indirgenmiş halde bulunur. Eritrositlerde GSH yaklaşık 2 mM gibi yüksek konsantrasyonda bulunur. GSSG konsantrasyonu ise 4 μ M civarındadır. İnsan eritrositlerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500/1 dir ve yarı ömrü 4 gündür (Shohet and Beutler 1986; Cooper 1997).

İndirgenmiş glutasyon enzimatik yada enzimatik olmayan yollarla okside glutatona (GSSG) dönüşür. Bu dönüşüm özellikle peroksitlerin parçalanmasında ve enzimatik transhidrojenasyon sonucu gerçekleşmektedir. Eritrositlerde glutasyonun yükseltgenmesi, ortamda oluşan H_2O_2 ve diğer organik peroksitlerin indirgenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu reaksiyonun enzimi, glutasyon peroksidazdır. Okside glutatyonu indirgenmiş forma ise glutasyon redüktaz dönüştürmekte ve yüksek GSH/GSSG oranı sağlamaktadır. Bu dönüşüm reaksiyonları glutasyon redoks çevrimi olarak adlandırılmaktadır (Fujiwara *et al.* 1989; Şentürk 2006).

Glutasyon, yapısında bulunan $-\text{SH}$ grupları ile oksitleyici ajanların bozucu etkilerine karşı hücreyi korumaktadır. Dolayısıyla glutasyonun düşük konsantrasyonunda bazı metabolik olumsuzluklar meydana gelebilir. Glutasyonun belirlenen görevlerinden bazıları şunlardır: Serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin inaktivasyonu,

hemoglobin, spektrin gibi membran proteinlerini ve çeşitli enzim proteinlerinin tiyol gruplarının korunması, ksenobiyotiklerin, bazı antineoplastik ilaçların ve bazı metabolik son ürünlerin konjugasyonla detoksifikasyonu, DNA ve protein sentezi, amino asit transportu, insülin gibi bazı proteinlerin disülfür bağlarının koparılması ve böylece proteinlerin konformasyonunun değişmesi, hücre içerisinde sistein deposu olarak bulunması ve bazı enzimlerin reaksiyonlarında rol oynamasıdır (Demir 1994; Knapen *et al.* 1999).

Enzimler, canlı organizmaların kimyasal oluşumunu sağlayan, reaksiyon hızını artıran ve yan ürün oluşmaksızın %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin çoğunluğu protein yapısındadır. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu da mevcuttur (Keha ve Küfrelioğlu 2008).

Biyokimyasal araştırmaların büyük çoğunluğunu enzim çalışmaları oluşturmaktadır. Bu alandaki en büyük gelişmelerden biri 1926 yılında J.B.Summer'in üreaz enzimini “Jack Bean” bitkisinden elde edip kristallendirmesi ve protein yapısında olmasını keşfetmesidir. Günümüzde 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir.

Bazı bileşikler tarafından enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktivitelerinin azaltılması yada tamamen yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. İnhibisyona sebep olan bileşiklere inhibitör denir. İnhibitörler genellikle küçük molekül yapısına sahip bileşikler yada iyonlardır. Enzim inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğu için önemlidir. Birçok kimyasal madde, ilaç ve zehirli bileşikler de fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler (Keha ve Küfrelioğlu 2008).

İnhibisyon, dönüşümlü yada dönüşümsüz olabilir. Dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşimleri bir denge reaksiyonudur. Bu inhibisyon türü yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olabilir. Yarışmalı inhibisyonda, inhibitör ile substrat enzimin aynı bölgesine bağlanmakta yarışır. Substrat konsantrasyonu artırıldıkça

inhibisyon etkisi azalmaktadır. Yarışmasız inhibisyonunda, inhibitör ile substrat enzimin farklı bölgelerine bağlandığından genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan etkilenmez. Yarı yarışmalı inhibisyonunda ise inhibitör sadece ES (enzim-substrat) kompleksine bağlanabilir. İnhibitörleri çok kez yarışmalı ve yarışmasız olarak kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Genellikle karışık inhibisyon gözlenir. Dönüşümsüz inhibisyonunda inhibitör enzime ya kovalent bağlanır yada zor ayrılabilen bir kompleks oluşturur. Çok sayıda polipeptid zincirinden meydana gelen allosterik enzimler olarak bilinen enzimlerde allosterik inhibisyon adı verilen başka bir inhibisyon olayı gözlenir. Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitörler enzimin aktif merkezinden başka bir yere bağlanırlar ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek enzim aktivitesini etkilerler (Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Glutatyon redüktaz (GR) enzimi (EC 1.8.1.7) ilk defa 1951’de tanımlanmıştır. Bu enzim düşük veya yüksek molekül ağırlıklı disülfid substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron transferini katalizler.



Glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği bu reaksiyonun en önemli hedeflerinden biri hücre ortamındaki GSH/GSSG oranını korumaktır. Bu oran kırmızı kan hücrelerinde yaklaşık olarak 500/1’dir. Eritrositlerde GSH eksikliği zorunlu metabolik işlemlerin ciddi bir şekilde bozulmasıyla sonuçlanır ve bu durum hemolize yol açar. Bu nedenle pentoz fosfat yolunun etkin olarak çalışabilmesi için 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimiyle beraber bu yolun enzim aktivitelerinin yeterli miktarda olması gerekir (Montgomery 1996; Keha ve Küfrevioğlu 2008).

1.4. Moleküler dinamik çalışmaları: Moleküler dinamik (MD) simülasyonları biyolojik moleküllerin teorik incelemesinde moleküllerin ve moleküler sistemlerin davranışını taklit etmek için kullanılır (Leach 2001). Bu simülasyonlarda, moleküller

hesaplamalı olarak üretilir ve daha sonra yapısal değişiklikler, moleküler etkileşimler ve dahil olan moleküllerin küme davranışı hakkında bilgi vererek sistem parametreleri içerisinde belirli bir süre hareket etmesine izin verilir. MD simülasyonları, deney koşullarına göre tasarlanan simülasyonlar olarak deneylere tamamlayıcı olarak kullanılmaktadır ve parametreler, bu sistemlerin bu özel durumda moleküler davranışını göstermektedir (Borhani and Shaw 2012). Ayrıca tamamen atomistik bir bakış açısı olan MD simülasyonları, moleküllerin dalgalanmaları ve konformasyonel değişimleri hakkında detaylı bilgi sağlar. MD simülasyonlarından elde edilen bilgiler, aynı zamanda deneysel yöntemlerle izlenemeyen değişikliklere ışık tutmaktadır (Leach 2001).

MD simülasyonları üç farklı aşama gerektirir; enerji azaltma, dengeleme ve dinamikler. Dinamik simülasyonlardan önce, enerji minimizasyonu adımıyla ulaşılan en düşük potansiyel enerji durumunda bir moleküler sisteme sahip olmak önemlidir. Atomların minimum enerji düzenlemeleri sistemin kararlı durumlarına karşılık gelir. Bir MD simülasyonunda, birden fazla enerji minimumundan, kararlı durumlar elde edilebilir. Bu noktalar yerel ve küresel enerji minimumları olarak sınıflandırılabilir. Minimum yerel enerji, minimumun sistemin mutlak minimum enerjisini temsil ettiği göreceli bir minimum enerjiye karşılık gelir. Enerji minimizasyonu başlangıçkonformasyonuna denk gelen minimum yerel enerji seviyesini arar. Bir sistemdeki global minimumun bulunması için genişletilmiş miktarda hesaplama gücü ve zaman gerekebilir. Ancak, en aza indirgenmiş enerji sistemleriyle, simülasyon yoluyla minimum bir küresel enerji bulmak daha kolaydır. Enerji azaltımı için kullanılan birkaç algoritma vardır. Eğer degradenin kök ortalama kare sapması yaklaşık sıfır ise bir küçültme birleşik olarak kabul edilir. Ek olarak, minimize etme yakınsamaya yakın olduğu zaman, enerji bir adımdan diğer adıma değişir. Enerji azaltma fiziksel olarak statik bir yapıdaki hiçbir atomun 0 K sıcaklığa karşılık gelen bir net kuvveti hissetmediği bir nokta anlamına gelir (Chantawansri *et al.* 2011).

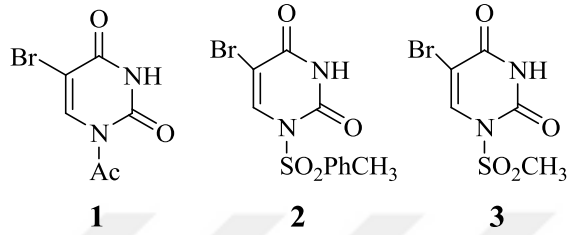
MD simülasyonlarının başlatılması için, minimize etme aşamasında sistemin 0 K olduğu kabul edilir, dengeleme veya başlatma aşamasında, her bir atomun hızlarını değiştirerek yeni bir sıcaklık elde edilir. Bu kinetik enerji değişimi sisteme dağılmış ve potansiyel enerjiye dönüştürülmüştür (Chantawansri *et al.* 2011).

Dinamik veya üretim aşaması termodinamik ortalamaları belirler ve yeni yapısal özellikleri ve dinamikleri örnekler. Moleküler bir sistemin zamana bağlı davranışı, hesaplama metoduyla hesaplanır ve N parçacıklarının bir sisteminin atomik yörüngeleri, belirli bir başlangıç koşulu ile belirli bir atomik potansiyel için Newton'un hareket denklemi, $F = ma$ sayısal entegrasyonu ve sınır koşulu ile üretilir. Her atom üzerindeki kuvvet hesaplanırken, sistemdeki her atomun ivmesini belirlemek mümkündür. Daha sonra, zamana göre atomların pozisyonlarını, hızlarını ve ivmelerini vermek için hareket denklemleri entegre edilmiştir. Yöntem deterministiktir; Her bir atomun pozisyonları ve hızları bilindiğinde, sistemin durumu gelecekte veya geçmişte herhangi bir zamanda tahmin edilebilir (Chantawansri *et al.* 2011).

Bir molekülün, tekli bağlar etrafında dönme nedeniyle benimseyebileceği farklı mekansal düzenlemelere konformasyon denir ve bu konformasyonlar daha önce belirtildiği gibi minimum potansiyel enerji seviyelerinde tanımlanabilir. Bir molekül birden fazla yerel enerji minimumuna sahip olabilir. Ancak, en istikrarlı konformasyonu bulmak için minimum küresel enerjiyi aramanız gerekir. İlk koordinatlar yüksek enerjilere ve kuvvetlere neden olan kötü temaslara sahiptir. Enerji minimizasyonu durumunda belirtildiği gibi, amaç en yakın enerjiye minimum seviyeye ulaşmaktır. Sıcaklık değişikliği nedeniyle düşük enerji bariyerli denge aşamasında, yerel minimum değeri aşılar. Atanan kuvvet kuvvetleri ile üretim aşamasında atomların hareket etmesine izin verilir. Bu aşama yeterince uzunsa, özellikle sıcaklıkla elde edilen enerji yüksekse, farklı konformasyonlar gözlemlenebilir (Özeral 2017).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enziminin çeşitli kaynaklardan saflaştırılarak birçok bileşik tarafından inhibe edildiği tespit edilmiştir (Senturk *et al.* 2012).



Güney ve arkadaşları (2015) 5-Brom urasil türevi olan bir dizi maddenin karbonik anhidraz izoenzimleri olan hCA I ve II üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. 5-Brom sübstitüe urasilin asetat (**1**), tosil (**2**) ve mezitil (**3**) türevlerini sentezlemiş ve bu türevlerin hem hCA I üzerinde hemde hCA II üzerinde oldukça güçlü inhibitörler olduklarını göstermişlerdir. Özellikle **2** numaralı türevin hem hCA I hemde II izoenzimi üzerinde kuvvetli inhibe edici özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir (Guney *et al.* 2015)

Yaseen ve arkadaşları (2016), yeni pridazinon sübstitüe benzensülfonamid türevlerinin insan karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Esteraz aktivitesi için yeni bileşiklerin bazılarının ortalama IC₅₀ değerleri hCA I için 1,13-8,5 nM iken, hCA II için 0,98-5,19 nM aralığında bulunmuştur. Elde edilen bu veriler ile sentezlenen bileşiklerin etkili inhibisyon özelliği gösterdiği ve glokom tedavisinde aday bir ilaç olarak görülebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Yaseen *et al.* 2016).

İnsan karbonik anhidraz izoenzimi II (hCA II) ve sığır karbonik anhidraz (bCA) üzerine; sentezlenen perfloroalkansülfonamidler 1 serisi, perfloroalkansülfonamidlerin sodyum tuzu ve polifluoroalkansülfonamid türevlerinin etkisi araştırılmıştır. Bütün bileşikler sığır karbonik anhidrazına karşı güçlü bir inhibisyon etkisi gösterirken, bileşiklerden yalnızca bir tanesinin (2b) insan karbonik anhidraz izoenzimi II üzerine ticari ilaç olan asetazolamidden daha iyi inhibisyon özelliği göstermiştir (Benfodda *et al.* 2010).

Işık ve arkadaşları (2015) bir dizi fenol ve piridin hidrazinkarbodiamid ile bazı memeli CA izoformlarının (CA I, II ve IX) bir inhibisyon çalışmasını gerçekleştirmişlerdir (Işık *et al.* 2015). Başka bir çalışmada ise Innocenti ve arkadaşları (2008) CA I-XIV izoformları üzerinde bazı fenolik made türevlerini denemiştir. P-hidroksibenzoik asit, p-kumarin asit, kafeik asit, ferulik asit, galik asit, sirinjik asit, kersetin ve elajik asit gibi çeşitli fenolik asitler ve fenol doğal ürünleri ile bu enzimler üzerindeki inhibe edici etkisi araştırılmıştır. Tüm memeli izozimleri hCA I, XII, XIII ve XIV düşük mikromolar veya submikromolar aralıkta bu (poli) fenoller ile inhibe edilmiştir. Burada araştırılan fenoller, klinik olarak kullanılan sülfonamidlerin / sülfamadların veya kumarinlerinkilerden farklı olan bir CA inhibisyon mekanizmasına sahiptir. Katalitik çinko iyonuna bağlanan sülfonamidlerin aksine, fenoller Zn (II) koordinatlı su molekülüne bağlanır ve aktif bölge boşluğunda daha dışa bağlanarak çeşitli amino asit kalıntılarıyla temas eder. Bu, memelilerde bulunan birçok CA izoenzimi arasında en değişkenliğe sahip bölge olduğundan bu bileşik sınıfı, tıbbi açıdan ilgili CA'ların yalnızca birisini veya birkaçını hedef alan izoform seçici inhibitörlere yol açabileceği belirtilmiştir (Innocenti *et al.* 2008; Innocenti *et al.* 2010).

Bir başka çalışmada kumarin türevlerinin CA inhibisyon potansiyellerinin keşfedilmesinin ardından CA inhibisyonu için kumarinlerin daha kapsamlı olarak araştırıldığı ilk çalışmadır. Kumarin farmakoforunu ihtiva eden 24 bitki kumarini ve 3 asidik kumarini içeren doğal ürünler toplanmıştır. Bu yapılar insan CA izozimlerinin (hCA I, II, VII, IX, XII ve XIII) inhibisyonu için değerlendirilmiş ve geniş bir inhibisyon ve izozim seçicilik profilleri aralığı belirginleşmiştir. Yeni kemoterapilerin önemli bir kaynağı olduğu kanıtlanan doğal ürünlerin yapılan araştırma sonucunda hastalıklarla ilgili CA enzimlerini inhibe eden yeni kemotiplerin keşfi ve doğal ürünlerin daha ileri değerlendirilmesini desteklemek için bir platform sağlamıştır (Davis *et al.* 2013; Davis *et al.* 2014).

Sethi (2013) küçük bir seri 4,5,6,7-tetrakloro-1, 3-dioksoizoindolin-2-il benzensülfonamid hazırlayarak fizyolojik açıdan ilişkili üç CA izoformunun (CA I, II ve VII) inhibisyonu için araştırma yapmışlardır. Bu bileşikler, genel olarak CA I'in daha az potansiyele sahip inhibitörleridir. Ancak bunların çoğu güçlü ve düşük nanomolar değerleri ile CA II ve CA VII için etkiliydi. Bu tür bileşikler yeni

antiglokom, antiepileptik, ödem veya yükseklik hastalığı ilaçlarının geliştirilmesi için dikkat çekici adaylar olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Sethi *et al.* 2013).

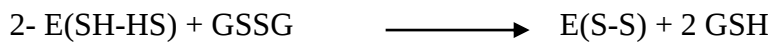
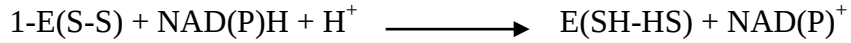
Özdemir (2014) yeni aromatik / heteroaromatik propansülfonilhidrazon bileşiklerinin sentezi, fiziksel özellikleri ve karbonik anhidraz II (CA II) enzimine karşı inhibisyon çalışmasında bu izoformun en iyi aromatik / heteroaromatik propansülfonilhidrazon inhibitörleri o-aminobenzaldehidpropansülfonilhidrazon ve aynı IC₅₀ (0,55 mM) değerine sahip olan tiofenkarboksialdehit propansülfonilhidrazon olduğu bildirilmiştir (Özdemir *et al.* 2014).

Alafeefy (2016) 2-merkapt-3H-kinazolin-4-1 kuyruk içeren bir dizi heterosiklik benzensülfonamid, süstitüe edilmiş anthranil asitlerin 4-izotiosiyanato-benzensülfonamid ile hazırlanan sülfonamidlerin hCA I ve II insan karbonik anhidraz izoformlarının yanı sıra hCA IX ve XII inhibitörleri olarak araştırmışlardır. hCA II, IX ve XII üzerinde oldukça etkili olan inhibitörler, hCA I üzerinde ise orta potansiyelde etkili inhibitörler olarak özellik göstermiştir. Dolayısıyla bu bileşikler, glokom (CA II ve XII) veya üç izoformun aktivitesinin (CA II, IX ve CA XII) engellendiği patolojilerde klinik öncesi adaylar olarak ilgi çekici olduğu bildirilmiştir (Alafeefy *et al.* 2016).

Yaseen (2016) süstitüe piridazinon parçalarını içeren bir dizi sülfonamid türevlerini, insan sitozolik iki karbonik anhidraz izoformunun, hCA I ve hCA II'nin inhibisyonu için araştırmışlardır. Bütün bu bileşikler, klinik olarak kullanılan sülfonamid asetazolamid ile birlikte fizyolojik olarak ilişkili izoenzim I ve II'nin inhibitörleri olarak araştırılmıştır. Tüm sülfonamidler bu izoformlara karşı çok güçlü bir inhibisyon göstermiştir ki bu moleküller, tıbbi kimya uygulamaları ile diğer izoformları hedef alan yeni etkili CA inhibitörlerinin keşfedilmesi için bu gibi moleküllerin potansiyel olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Yine bir başka çalışmada sentezlenen sülfonamidlerin glokom, retinitis pigmentosa gibi çeşitli hastalıklarda yer alan hCA I, II, IV ve IX izoformlarına karşı karbonik anhidraz inhibitörleri olarak değerlendirilmiştir (Yaseen *et al.* 2016; Abdel-Aziz *et al.* 2017).

Glutasyon redüktaz (Glutasyon; NADP^+ oksidoredüktaz, EC 1.8.1.7: GR) flavoenzimlerin piridin-nükleotid disülfid oksidoredüktaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzim glutasyon disülfidi (GSSG) indirgenmiş glutatyon (γ -L-glutamil-L-sisteinil glisin; GSH)'a NADPH yada NADH'ı bir indirgeyici ajan gibi kullanarak indirgenmesini katalizler (Müller 1992; Gül *et al.* 2000).

GR, GSSG'yi indirgenmiş hale dönüştürürken, NADPH'dan gelen elektronlar GSSG'nin disülfür bağına direkt olarak aktarılmaz. Önce FAD'ye aktarılır daha sonra alt birimdeki 2 sistein arasında bulunan disülfür köprüsüne transfer etmek suretiyle GSSG'ye aktarılmış olur. Her bir alt birim 3 tane yapısal alan içerir. Bunlar FAD bağlayıcı alan, NADPH bağlayıcı alan ve ara yüz alanıdır. FAD alanı, NADP^+ alanı birbirine benzer ve diğer dehidrogenazlardaki nükleotid bağlayıcı alanlara da benzer. FAD ve NADP^+ izoalloksazin ve nikotinamid halkaları birbirine geçecek şekilde aralarında bağlanırlar. GSSG için bağlayıcı alan, bir alt birimin FAD alanı ile diğer alt birimin ara yüz alanından meydana geldiği bilinmektedir. Reaksiyonun iki basamakta gerçekleştiği önerilmektedir (Siegel *et al.* 1998; Patel *et al.* 1998).

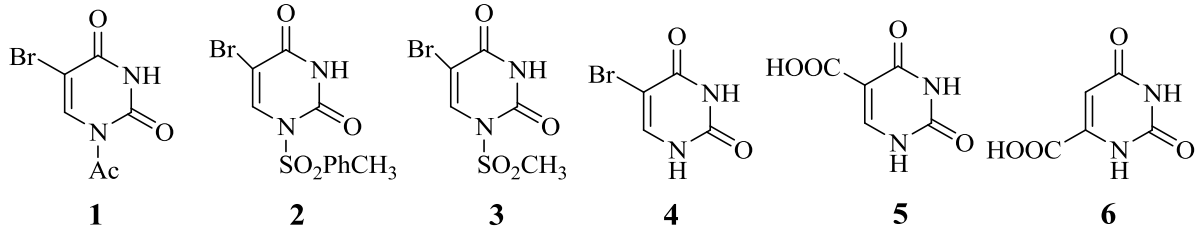


İlk yarı reaksiyonda, NADPH tarafından enzimin indirgenmesi sağlanır ve kararlı bir hal olan E(SH)_2 formu oluşur. İkinci yarı reaksiyonda ise okside glutasyon, E(SH)_2 tarafından indirgenerek iki mol indirgenmiş glutasyon oluşur (Siegel *et al.* 1998).

Enzimin katalitik mekanizmasında amino asit kalıntıları da görev yapar. GSSG'nin bağlandığı bölgede Tyr114 ve NADPH bağlama bölgelerinde ise Tyr197 amino asitleri bulunmaktadır. İnsan GR enzimindeki bu bölgeler, diğer türlerden elde edilen enzimlerle karşılaştırıldığında oldukça spesifik bölgelerdir. Tyr197 yüksek ökaryotlardan elde edilen bütün GR ve tiyoredoksin redüktazlarda bulunur.

GR enziminin aktivitesi ölçülürken GSSG, NADPH, uygun pH'daki uygun tampon ve genelde 1/20 oranında hemolizat veya homojenat kullanılmaktadır. NADH'nin K_M 'si NADPH'nin K_M 'sinden 17 kat daha büyük olduğundan NADPH'ı kullanmak tercih edilmektedir. Substrat olarak GSSG dışında CoASSG, CySSCy ve GSSO₃H molekülleride kullanılabilmektedir. Bazı yayınlarda ölçüm ortamına EDTA ve FAD'de katılmaktadır. Aktivite ölçüm ortamına son eklenen madde bazı yayınlarda NADPH, bazılarında ise enzim örneğidir. Enzim için aktivite birimi 1µmol NADPH'nin yükseltgenmesine sebep olan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Le Trang *et al.* 1983; Mc Callum and Barrett 1995; Lamotte *et al.* 2000).

İnsan eritrosit glutatyon redüktaz enzimini 2-(5'-nitrofurilvinil)-quinolin bileşiğinin 4 nolu karbonuna -COOH, -CONH₂, -CONHCH₃, -CONHCH₂CH₃ gibi moleküller takılarak türetilen moleküllerin inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada da nitrofurantion, 5-nitro-2-froik asit, 5-nitroindol ve 2,4,6-trinitrobenzen sülfonat gibi nitro grubu ihtiva eden bileşiklerin de inhibe ettiği belirlenmiştir (McCallum and Barrett 1995; Grellier *et al.* 2001).



Güney ve arkadaşlarının (2016) GR enzimi üzerinde yaptığı bir çalışmada **1-6** numaralı urasil türevlerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada urasil türevleri olan 1-6 numaralı moleküllerin GR enzimi üzerinde 2,68-166,6 nM arasındaki değerlerde son derece etkili inhibitörler olduğu tespit edilmiştir (Güney *et al.* 2016).

Yukarıda belirtilen araştırmalar incelendiğinde hCA I, hCA II ve GR enzimleri üzerine birçok farklı madde grubunun inhibisyon etkisi incelenmiş ve çeşitli hastalıkların tedavisi için önemli sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda ise insan eritrositlerinde saflaştırılan karbonik anhidraz I, II ve ticari olarak mevcut *Sacchromyces cerevisiae* GR enzimleri üzerinde literatürde yer almayan bazı urasil türevlerinin etkisi incelenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeleri

Tez çalışmasında kullanılan CNBr aktif sefaroze 4B, Sephadex G-200, diyaliz torbası, standart serum albümin, β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form) (NADPH), β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form) (NADP^+), okside glutatyon (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH), sodyum bikarbonat ve etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) Sigma-Aldrich Chemical Comp.'den; triklor asetik asit, trihidroksi- metilaminometan (Tris), amonyum sülfat, sodyum klorür, hidroklorik asit, sodyum asetat, fosforik asit, glisin, potasyum fosfat, gliserol, potasyum asetat, metanol, potasyum klorür, asetik asit, etanol, izopropanol, N,N'-metilen bisakrilamid, akrilamid, amonyum persülfat, coomassie brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), β -merkapto etanol, çalışmada kullanılan urasil türevleri ve gerekli diğer kimyasalları Merck AG'den satın alındı.

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Tez çalışması için aşağıdaki cihazlar kullanılmış.

Hassas terazi	: Ohaus Pioneer
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Shimatzu (UV-1800)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Buzdolapları	: Arçelik
Peristaltik pompa	: Gilson minipuls 3
Derin dondurucu	: Beko (-20°C'ye kadar)

3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanmaları

1. 0,2 M NaHCO_3 çözeltisi, pH: 8,7 (Sefaroz 4B matriksinin hazırlanması için kullanılan tampon): 8,4 g NaHCO_3 , 450 ml destile su kullanılarak çözüldü, 1 N NaOH ile pH: 8,7'ye ayarlandıktan sonra, sonuç hacmi destile su ile 500 ml'ye tamamlandı.
2. 25 mM Tris-HCl / 0,1 M'lık Na_2SO_4 çözeltisi, pH: 8,7 (sentezlenene afinite jelini dengelenmek için kullanılan tampon): 1,514 g Tris, 7,1 g Na_2SO_4 tartıldı, 450 ml destile edilmiş suda çözülüp daha sonra da 1 N'lik HCl ile pH: 8,7'ye getirilerek sonuç hacim destile su ile 500 ml'ye tamamlandı.
3. 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na_2SO_4 çözeltisi, pH: 8,7 (hemolizat uygulamasından sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon) 1,514 g Tris, 1562 g Na_2SO_4 tartıldı, 450 ml destillenmiş su ile çözüldü 1 N'lik HCl ile pH: 8,7'ye ayarlandıktan sonra destile su ile toplam çözelti hacmi 500 ml'ye tamamlandı.
4. 0,1 M NaCH_3COO / 0,5 M NaClO_4 çözeltisi, pH: 5,6 (afinite kolonuna bağlanmış olan CA enzimlerinin elüe edilmesi için uygulanan çözelti): 0,347 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 3,062 g NaClO_4 40 ml destillenmiş suda çözüldü, 1 N HCl kullanılarak pH: 5,6'ya kadar ayarlandıktan sonra destillenmiş suyla toplam hacmi 50 ml'ye tamamlandı.
5. 0,1 M Tris- SO_4 çözeltisi, pH: 8,7 (Esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 450 ml destillenmiş su içerisinde çözüldü, 1 N H_2SO_4 kullanılarak pH'sı 8,7'a ayarladıktan sonra hacimi destillenmiş suyla 500 ml'ye tamamlandı.
6. 50 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA (pH=8.0) (GR aktivite ölçüm tamponu): 3,0285 g Tris ve 0,146 g EDTA tartıldı 450 ml destile su içerisinde çözüldü. 0,1 M'lık HCl çözelti kullanılarak pH 8,0'a olacak şekilde ayarlandı. Sonrasında hacim destile su eklenerek 500 ml'ye tamamlandı.
7. 20 mM okside glutatyon çözeltisi: 123,76 mg GSSG alınarak 10 ml destile suda çözülerek hazırlandı.
8. 2 mM indirgenmiş nikotinamidadenindinükleotid fosfat çözeltisi: 16,6 mg NADPH alındı ve 10 ml destile suda çözülerek hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein tayini

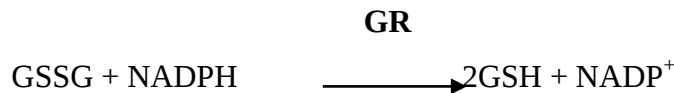
3.2.1.a. Kalitatif olarak protein tayini

Proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin amino asitlerinin 280 nm’de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metodla afinite kromatografisinde elde edilen bütün fraksiyonların kalitatif olarak protein tayinleri yapıldı.

3.2.1.b. Bradford yöntemine göre protein tayini

Hemolizat, afinite jelinden elde edilen elüsyonlar ve tüm diğer safhalardaki numunelerin protein miktarları bu yöntem kullanılarak tespitedildi. Bu yöntemin esası, protein yapısına coomassie brilliant blue G-250 boyasının bağlanma kompleksi oluşturmastır. Oluşan protein-boya kompleksi 595 nm’de en yüksek absorbans değerini verir. 15 dakika içerisinde protein-boya kompleksi oluşur. Oluşan bu kompleks çözeltilerde uzun süre kararlı şekilde kalır. Bradford yöntemi olarak bilinen bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg aralığındadır (Bradford 1976).

3.2.2. GR Enziminin Aktivitesinin Ölçümü



GR enzim aktivitesini belirlenmek için yukarıdaki gösterilen reaksiyona giren NADPH 340 nm’de en yüksek absorbans değerini gösterir. Bu tepkime ortamında GR enzimi ortamda bulunan NADPH’ı hidrolizleyerek NADP⁺’ya dönüşmesine sebep olur. Ortamda NADPH’ın azalması ise spektrofotometre cihazında 340 nm’de takip edilen

değerin düşmesine yol açmaktadır. Bu düşüş ölçülerek GR enziminin aktivitesi belirlenmektedir (Carlberg and Mannervik 1985).

Çizelge 3.1. GR enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği.

	Kontrol küveti		Numune küveti	
Stok aktivite çözeltileri	Hacim(μl)	Konsantrasyon	Hacim(μl)	Konsantrasyon
50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA	800	40 mM Tris, 0,8 mM EDTA	800	40 mM Tris, 0,8 mM EDTA
20 mM GSSG	50	1,0 mM	50	1,0 mM
2mM NADPH	50	0,1 mM	50	0,1 mM
Su	100	-	70	-
3 dakika inkübasyon				
Enzim numunesi	-	-	30	-

Aktivite ölçüm küvetleri Çizelge 3.1’de gösterildiği şekilde önce enzim numunesi katılmaksızın pipetlendi. Üç dakika inkübasyon yapıldıktan sonra numune küvete pipetlenerek spektrofotometreye yerleştirildi ve okuma başlatıldı. Deneyin başından itibaren birer dakikada ara ile toplam üç dakika boyunca gözlenen değerler kaydedildi (Calberg and Mannervik 1985).

GR enzim için enzim ünitesi hesabı aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

EÜ/ml: 1 ml çözeltideki enzim ünitesi değeri, ΔOD: 1 dk süre içerisindeki absorbans farkı, 6,22: 1 mM NADPH’in gösterdiği absorbans (Ekstinksiyon katsayısı),

V_T: Ölçümde kullanılan küvetin toplam ml değeri,

V_E: Ölçümde kullanılan küvete eklenen enzimin hacmi,

S_F: Eğer seyreltme yapılmışsa seyreltme faktörü.

3.2.3. Karbonik anhidraz aktivite tayini

Karbonik anhidraz enzimi üzerinde yapılan kinetik çalışmalar için aktivitesi ölçümleri esteraz yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem CA enziminin esteraz aktivitesi göstermesi esasına dayanır. Prensip olarak CA enziminin *p*-nitrofenil asetatı hidrolizleyerek *p*-nitrofenole dönüştürmesini esas alır. *P*-nitrofenol maddesi 348 nm’de dalgs boyunda maksimum absorbens göstermektedir. ($\epsilon_{348} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Verpoorte *et al.* 1967).

Çizelge 3.2. İnsan eritrosit CA enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği.

	Kontrol küveti		Numune küveti	
Stok aktivite çözeltileri	Hacim(μl)	Konsantrasyon	Hacim(μl)	Konsantrasyon
0,1 M Tris-SO ₄ pH: 8,7	200	0,02 M Tris-SO ₄	200	0,02 M Tris-SO ₄
3 mM <i>p</i> -nitrofenil asetat	330	1,0 mM <i>p</i> -nitrofenil asetat	330	1,0 mM <i>p</i> -nitrofenil asetat
Su	470	-	450	-
Enzim numunesi	-	-	20	-

Deneyde kullanılacak *p*-nitrofenil asetatın günlük taze olasına özen gösterildi. *P*-nitrofenil asetat çözeltisi; 13,5 mg katı *p*-nitrofenil asetat tartılarak 0,5 ml aseton içinde çözüldü ve 24 ml saf suya yavaş yavaş karıştırılarak hazırlandı.

3.2.4. Afinite kromatografisi jelinin hazırlanması

Ticari olarak alınan CNBr-Aktive Sepharose-4B önce saf su daha sonra da 0,05 M Tris-SO₄ pH: 8,0 tampon çözelti ile yıkandı. Sonrasında aynı tampon içine alınarak ve uzantı kolu olarak tirozin bağlandı. Daha sonra diazolanen sülfanilamid uzantı kolu eklenmiş matrikse kenetlendirildi. Sülfanilamid, karbonik anhidraz izoenzimlerinin spesifik ve dönüşümlü bir inhibitörüdür, afinite jelinin yapısına girerek CA enzimlerini yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Pocker and Sarkanen 1979).

Aktif Sepharose 4B matriksi 25 ml saf su içerisine alınıp üzerine 200 mg tirozin ilave edildi. Bu işlem sonrası tirozinin fazlasını uzaklaştırmak için 500 ml saf su ile jel yıkandı. Son olarak, 100 ml 0,2 M NaHCO₃ (pH: 8,7) tamponu içerisine alınarak tekrar yıkandı ve tirozin bağlanmış jel aynı tampondan 40 ml ilave edilerek behere alındı. Sonrasında 50 mg sülfanilamit, yaklaşık 0°C’lik 1 M 10 ml HCl zltisine eklenerek üzüldü ve içerisinde 150 mg NaNO₂ bulunan 0°C’deki 5 ml zlti, sülfanilamid zltisi içerisine yavaş yavaş ilave edildi. 10 dakika kadar süren reaksiyon aşamasından sonra diazolanmış olan sülfanilamid zltisi 40 ml Sepharose-4B-tirozin karışımına ilave edildi. Karışımın pH değeri, 1 M’lık NaOH ilave edilerek 9,5’a çıkarılarak sabit tutuldu ve oda sıcaklığında 3 saat süreyle yavaşça karışmaya bırakıldı. Daha sonra 1 litre saf su ve 200 ml 0.05 M Tris-SO₄ (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı. Yıkandıktan sonra üzerine 20 ml aynı tampondan konularak buzdolanında +4°C’de saklandı.

3.2.4.a. Afinite kolonunun paketlenmesi

100 ml’lik bir şilifli ve boyunluklu erlenin içerisine 50 ml Tris-HCl, pH: 7,8 tamponu konularak içine daha önce hazırlanan Sepharose-4B-tirozin-sülfanilamid afinite jeli dökülerek süspanse edildi ve su trompu yardımı ile vakumlanarak jelin havası alındı. Havası alınan afinite jeli, 1x20 cm’lik kapalı sistem soğutmalı cam kolona dikkatlice pakettendi. Afinite jeli kolona pakettendikten sonra peristaltik pompa kullanılarak sırası ile yıkama ve dengeleme zltileri geçirildi. Afinite kolonun dengelenip dengelenmediği aşağıdan alınan eluat ile yukarıdan verilen zltinin 280 nm’de absorbans ve pH değerlerinin eşit olması ile belirlendi.

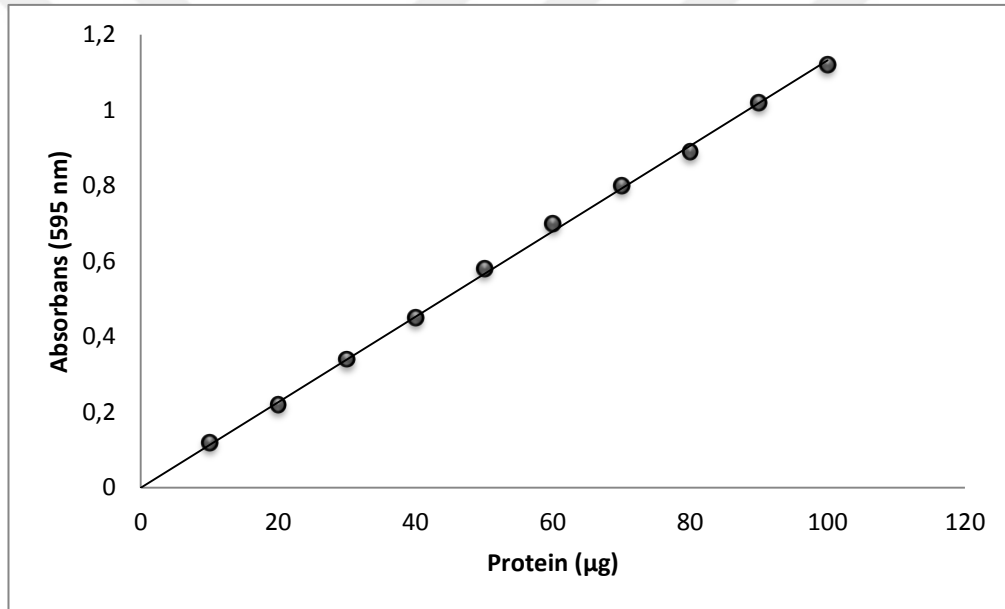
3.2.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Karbonik anhidraz I ve II enzimleri saflaştırıldıktan sonra % 5-10 kesikli SDS-PAGE (SDS-poliakrilamid jel elektroforezi) Laemmli’nin geliştirdiği metod modifiye edilerek enzim numunelerimizin saflığı belirlendi (Laemmli 1970).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

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



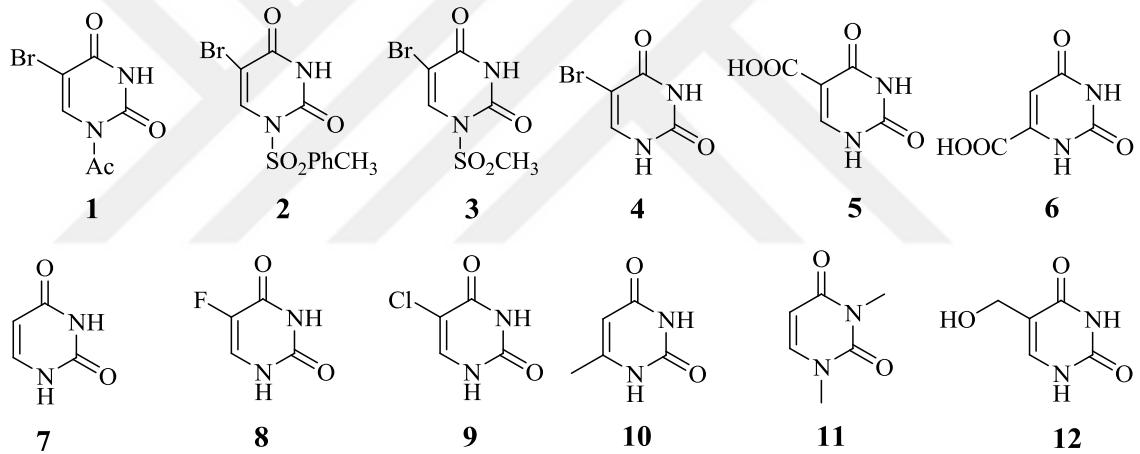
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik.

4.2. İnhibitörler İçin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

İnsan karbonik anhidraz I, II enzim aktiviteleri üzerine **8-9** nolu urasil türevlerinin ve GR enzim aktiviteleri üzerine ise **8-12** urasil türevlerinin inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla bu maddelerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak insan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Konsantrasyona karşı % aktivite (% Aktivite-[I]) olarak oluşturulan grafikler Şekil 4.2-4.10'da gösterildi. Eğrilerin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).

Çizelge 4.1. İnsan eritrosit hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Sepharose 4B-tirozin-sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.

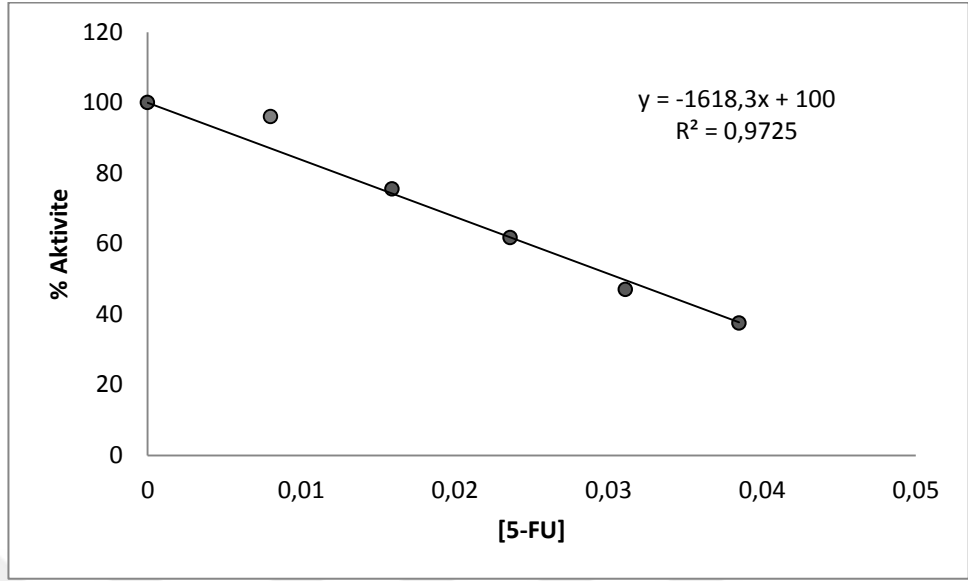
Numune türü	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	150	40	18,7	748	6000	8,02	100,0	1,0
Afinite sonrası hCA-I	430	8	0,52	4,16	3440	826,92	57,33	103,1
Afinite sonrası hCA-II	706	5	0,16	0,80	3530	4412,5	58,83	550,2



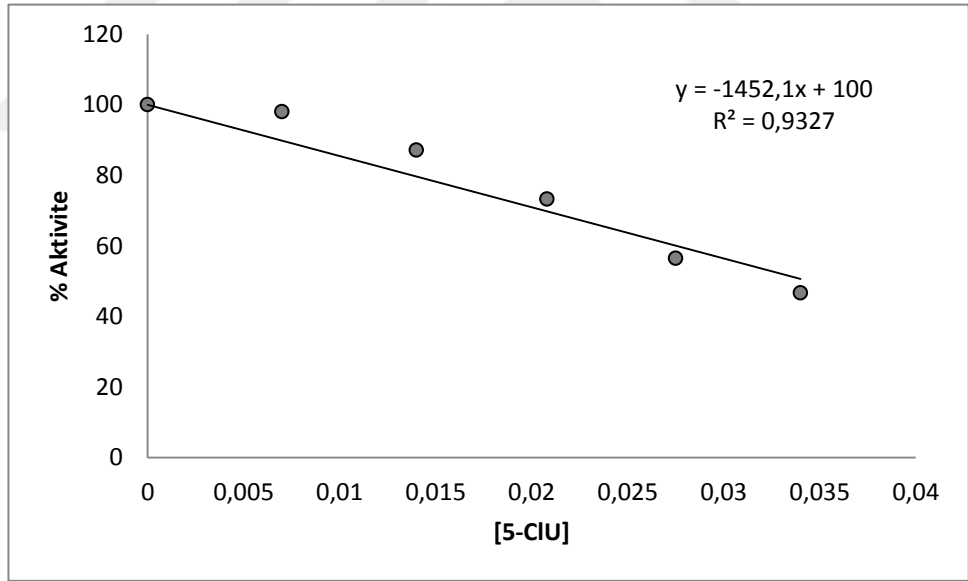
Çizelge 4.2. Bileşik 1-12 ve GR için elde edilen IC₅₀ değerleri.

Urasil türevi	IC ₅₀ (nM)
1 ^a	3,120
2 ^a	2,680
3 ^a	3,460
4 ^a	166,6
5 ^a	122,0
6 ^a	88,76
8 (5-Florourasil)	30,89
9 (5-Klorourasil)	34,43
10 (6-Metilurasil)	83,30
11 (1,3-Dimetilurasil)	64,30
12 (5-Hidroksimetilurasil)	21,71

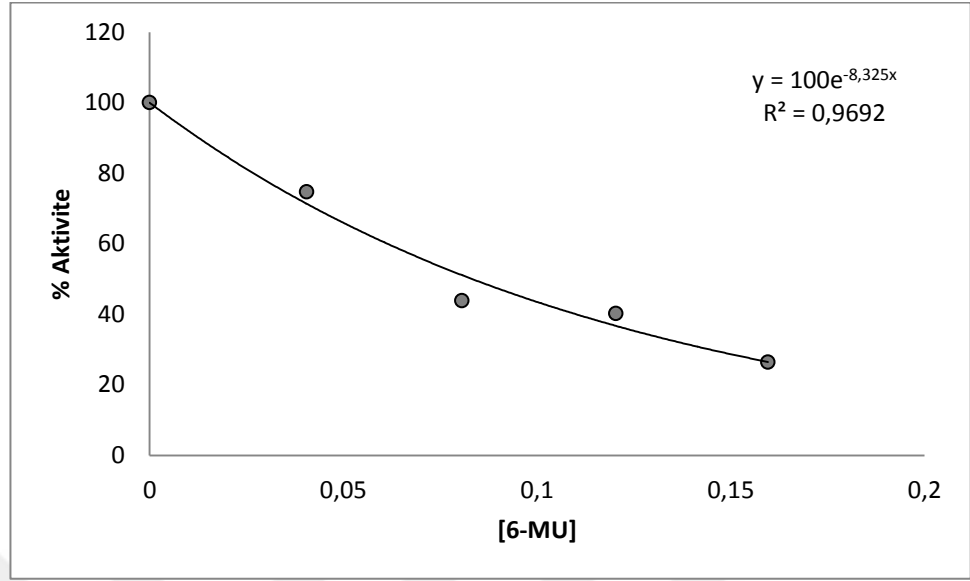
^a(Guney *et al.* 2016).



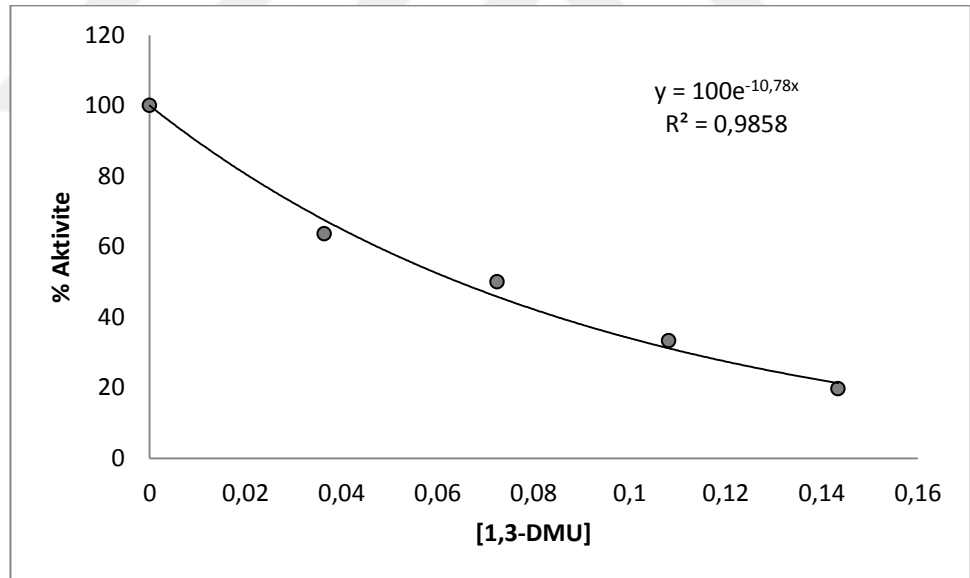
Şekil 4.2. GR enzimi ile 5-FU (8) maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-FU] grafiği.



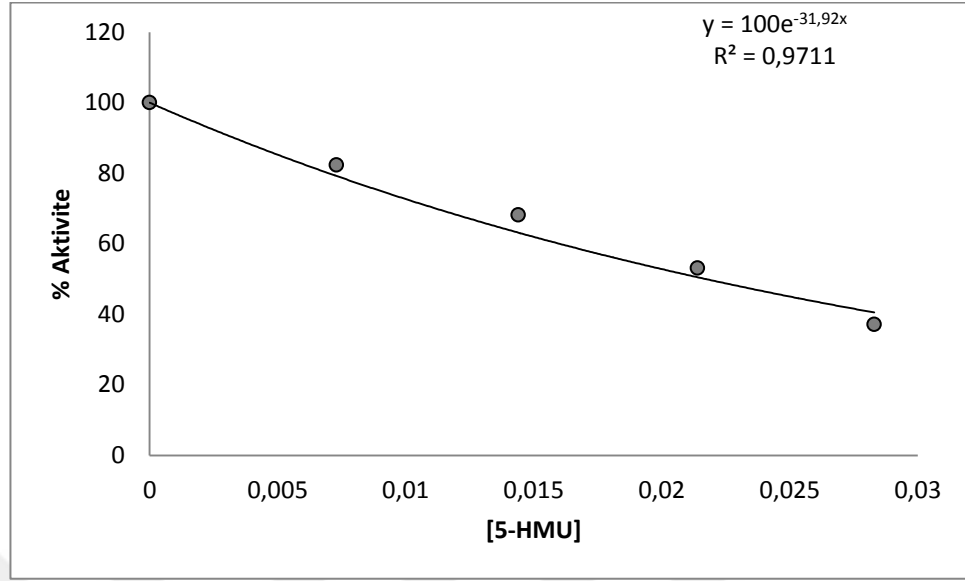
Şekil 4.3. GR enzimi ile 5-CIU (9) maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-CIU] grafiği.



Şekil 4.4. GR enzimi ile 6-MU (10) maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[6-MU] grafiği.



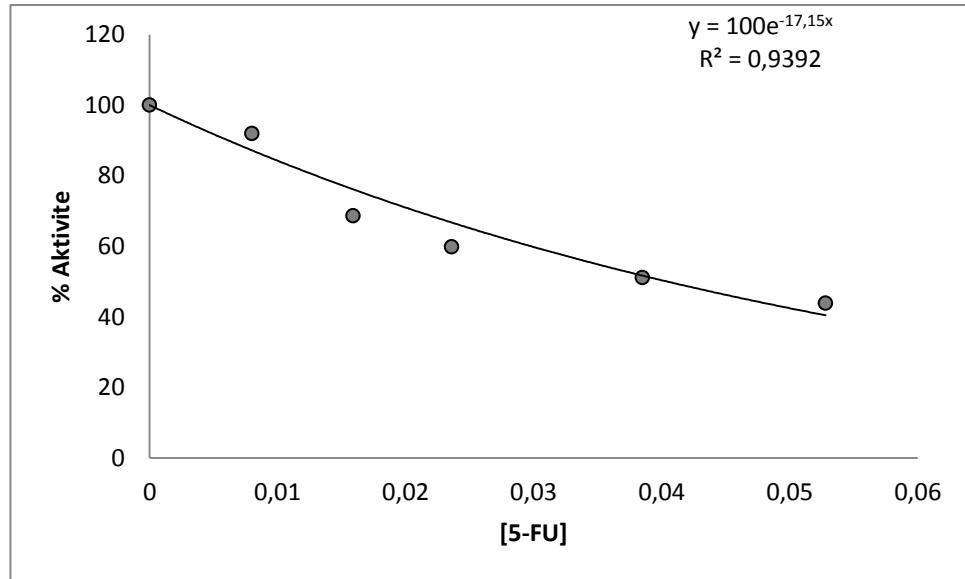
Şekil 4.5. GR enzimi ile 1,3-DMU (11) maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[1,3-DMU] grafiği.



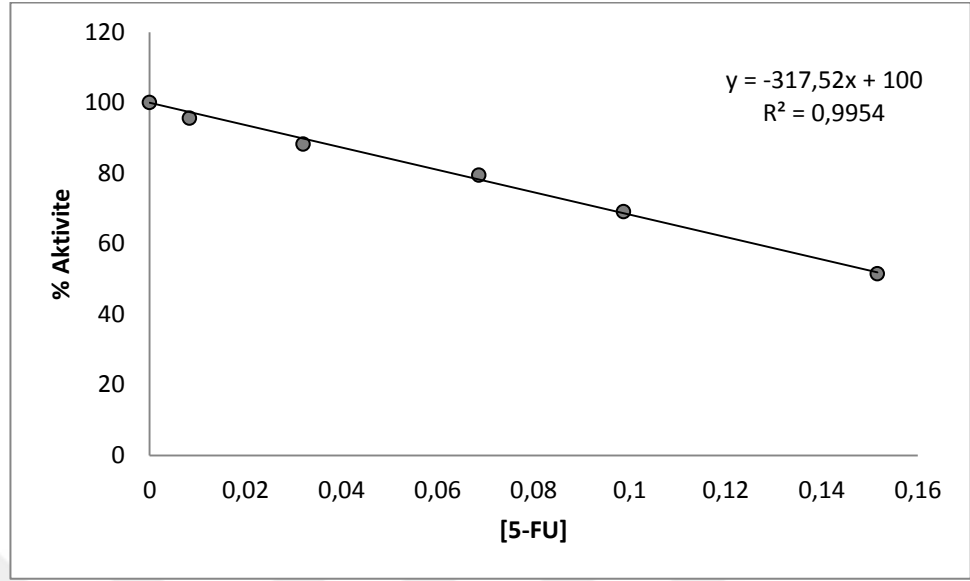
Şekil 4.6. GR enzimi ile 5-HMU (12) maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-HMU] grafiği.

Çizelge 4.3. Bazı urasil türevleri için hCA I, hCA II için elde edilen IC_{50} değerleri.

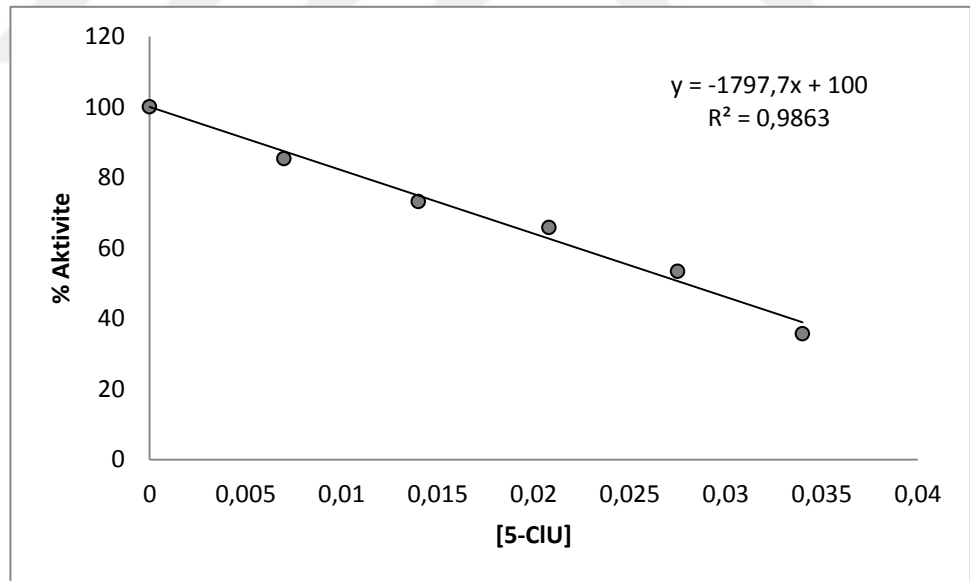
Urasil türevi	hCA I (μM)	hCA II (μM)
8 (5-FU)	40,41	157,47
9 (5-CIU)	27,81	66,47



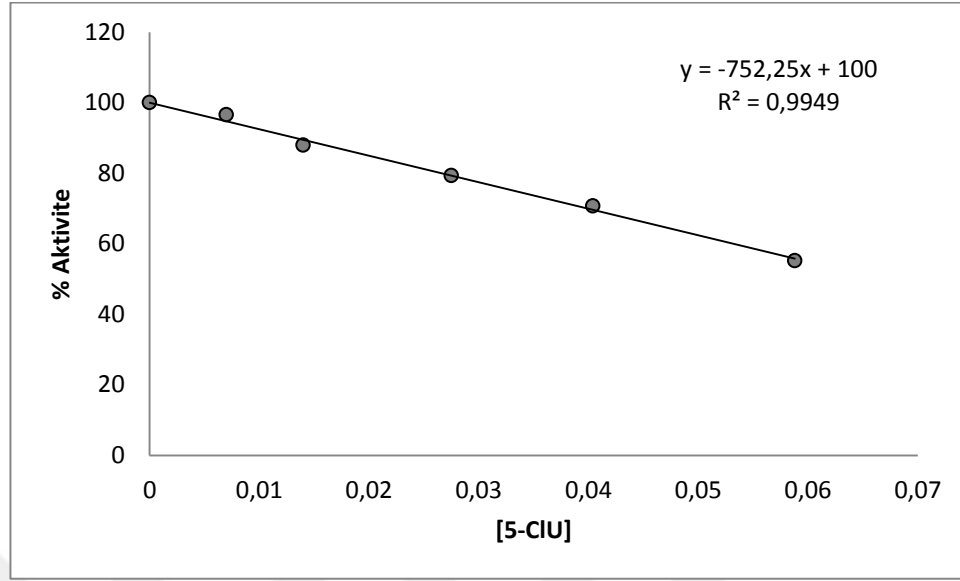
Şekil 4.7. hCA I izoenzimi ile 5-FU (8) maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-FU] grafiği.



Şekil 4.8. hCA II izoenzimi ile 5-FU (8) maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-FU] grafiği.



Şekil 4.9. hCA I izoenzimi ile 5-ClU (9) maddesinin IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-ClU] grafiği.



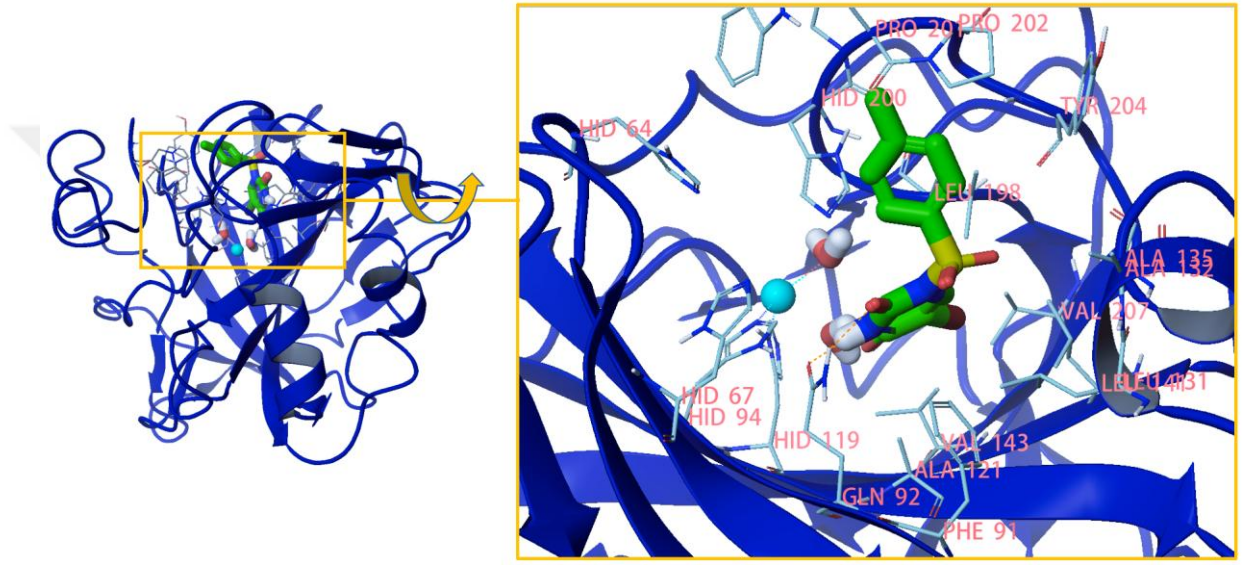
Şekil 4.10. hCA II izoenzimi ile 5-ClU (9) maddesinin IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5-ClU] grafiği.

Çizelge 4.4. Bazı urasil türevleri için hCA I, hCA II ve GR enzimlerinin docking değerleri (kcal/mol).

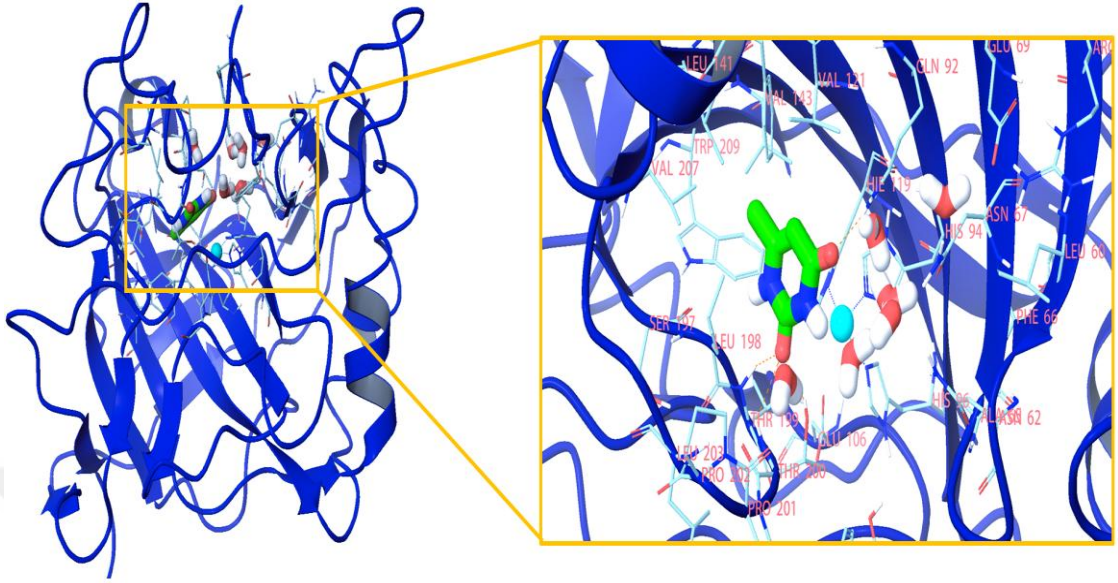
Urasil türevi	hCA I (2FW4)	hCA II (5AML)	GR (1BWC)
1	-5,467	-5,260	-5,409
2	-7,153	-6,834	-6,171
3	-4,729	-5,977	-5,477
4	-5,847	-5,161	-4,485
7	-6,202	-8,253	-4,565
8	-5,377	-7,558	-5,848
9	-5,942	-5,292	-4,917
10	-6,446	-8,593	-4,841
11	-4,232	-4,509	-4,785
12	-6,200	-6,707	-5,709

Bu tez kapsamında, hem enzim rezidüleri hem de kenetlenmiş ligandlar için tamamen esnek yerleştirme metodolojisi, Schrodinger moleküler modelleme paketi altındaki Prime modül ile uygulanan Glide XP (ekstra hassas) -İndüklenmiş Fit Docking (IFD) algoritması kullanılmıştır. Bu program kullanılarak denen urasil türevlerinin (1-12) hedef enzimler üzerinde etkinliği hakkında aşağıdaki gibi 3D ligant etkileşme diagramları için top-docking sonuçları elde edilmiştir (Çizelge 4.4.). Bu deneyler sonunda elde edilen sonuçlar kullanılarak hCA I, hCA II ve GR enzimleri üzerinde en

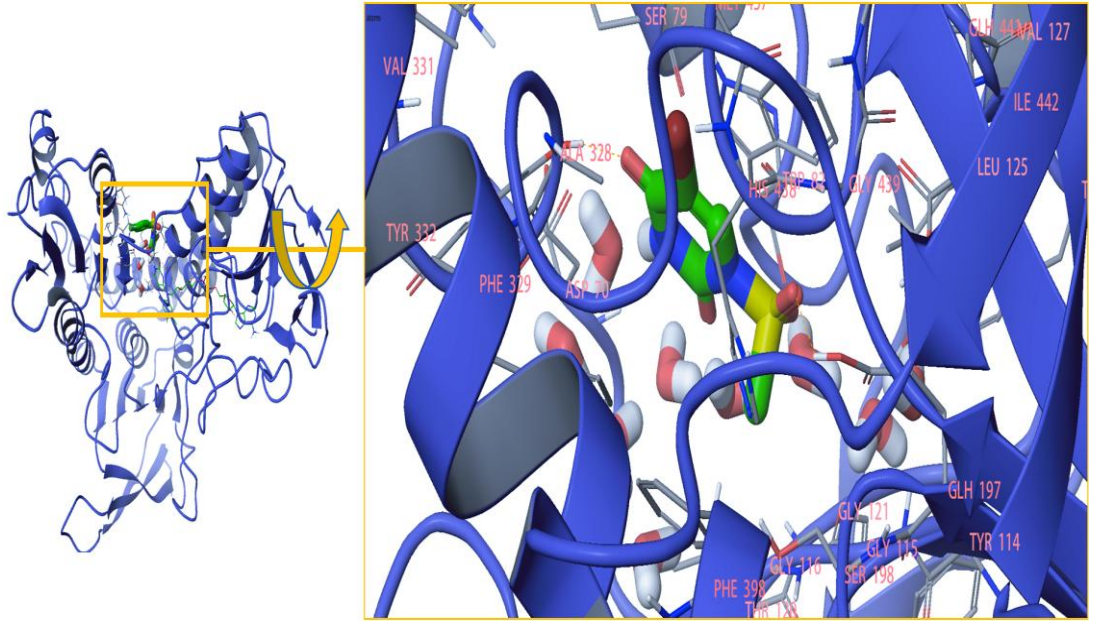
etkili olabilecek urasil türevlerinin tesbit edilmesi sağlanmıştır. Docking programı aracılığı ile hCA I, hCA II ve GR enzimleri için elde edilen değerler (Çizelge 4.4.)’de verilmiş en iyi etkileştiği urasil analogu için ise 3D ligand bağlanma modelleri verilmiştir (Şekil 4.11-Şekil 4.13.).



Şekil. 4.11. hCA I ile 3 nolu urasil türevi için elde edilen docking görüntüsü.



Şekil. 4.12. hCA II ile 7 nolu urasil türevi için elde edilen docking görüntüsü.



Şekil. 4.13. GR ile 2 nolu urasil türevi için elde edilen docking görüntüsü.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

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

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

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

Asitlerin, bazların, metallerin ve diğer toksik bileşenler formunda ki binlerce kirletici madde nehirlerle, denizlere ve atmosfere bırakılmaktadır ve bu durum doğal dengenin tahribatıyla sonuçlanmaktadır (Celik *et al.* 1996).

İnsanlarda çoğu hastalıkta CA izoenzimlerinin inhibisyonu kullanılmaktadır. Bundan dolayı; bu enzim çoğu ilaç için hedeftir. Örneğin, CA nın güçlü inhibitörü olarak asetazolamide, dorzolamide ve brinzolamide olarak bazı sülfonamidler vardır (Arena 2002; Supuran 2008). Bu CA inhibitörleri göz içi basıncı düşürmektedir, çoğunlukla glukomanın tedavisi için farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır (Casini *et al.* 2002a,b; Supuran 2008).

Urasil türevleri üzerinde son yapılan çalışmalardan yola çıkarak hCA I, hCA II ve GR enziminin üzerinde daha önce hiç çalışılma yapılmamış türevleri tespit ettik. Daha sonra da insan eritrositlerinden Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile hCA I ve hCA II izoenzimlerini saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Deney aşamasındaki bütün işlemler soğuk ortamda gerçekleştirildi. Saflığı kontrol edildikten sonra 5-FU ve 5-CIU üzerinde inhibisyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Güney vd. 2015 yılında insan eritrosit izoenzimlerinden CA I ve CA II üzerine farklı urasil türevlerinin etkisini ilk olarak incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda hCA I izoenzimi üzerine denenen **1-3** ve **10-12** numaralı urasil türevleri için K_i değerleri 10,83-464 mikromolar aralığında olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada hCA II izoenzimi için K_i değerlerinin ise 28,88-778,5 mikromolar aralığında olduğunu bulmuşlardır (Guney *et al.* 2015).

Türkoğlu ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise ticari olarak alınan bazı urasil türevlerinin (izoorotik asit (**5**), orotik asit (**6**), 6-amino 1,3-dimetilurasil ve 5,6-diamino 1,3-dimetilurasil) hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada hCA I izoenzimi üzerine denenen urasil türevleri için K_i değerleri 0,085-0,7325 mikromolar aralığında olduğu bulunmuş. hCA II

izoenzimi için ise K_i değerleri 0,1715-1,682 mikromolar aralığında olduğu tespit edilmiştir (Turkogu et al. 2017).

Antioksidant bir enzim olan GR, çoğu organizmanın hücrel redoks metabolizmasında GSH indirgenmesinin düzenlenmesini katalizleyerek hayati bir rol oynar. GSH redoks homeostasisinde, deoksiribonükleotidlerin şekillendirilmesinde ayrıca peroksitlerin, 2-oksoaldehitlerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alır. Oksidatif strese karşı dayanıksız hücreler ve ek olarak hızlı poliferasyon hücrelerinin canlılığı nisbeten GSH'ın rejenerasyonuna bağımlıdır. Bu sebepten, potansiyel GR inhibitörleri antitümör ve antiparaziter ilaçların geliştirilmesinde önemli rol oynar (Karplus et al. 1988; Nordhoff et al. 1993; Irmiler et al. 2002; Becker et al. 2003).

Farklı kaynaklardan elde edilen GR enzimini 2-(5'-nitrofurilvinil)-quinolin bileşiği türevlerinin, arilizoalloksazin bileşiklerinin, arsenik grubu ve nitro grubu ihtiva eden bileşiklerin de inhibe ettiği belirlenmiştir (McCallum and Barrett 1995; Grellier et al. 2001).

İnsan eritrosit GR enzimi üzerine yapılan ilaç çalışmaların da antikanserojen ve antisıtma ilacı olarak kullanılan quinolan halkası içeren nitro aromatik bileşiklerin az veya çok enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir (Grellier et al. 2001).

Erat (2002) tez çalışmasında insan ve sığır eritrosit GR enzimleri üzerine bazı ilaç ve kimyasalların inhibisyon etkisi gösterdiğini belirlemiştir. Gentamisin, netromisin, dobutamin, streptomisin, sefoperazon, teikoplanin, ampisilin ve penisilin G ilaçlarının ise aktive ettiğini belirlemiştir (Erat 2002).

Şentürk et al. 2008 ve 2009'da yaptığı çalışmalarda insan eritrositlerinden GR enzimini saflaştırılarak üzerinde bazı ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkileri çalışılmış. Bu amaçla sülfanilasetamid, sülfanilamid, linkomisin, klaridromisin, seftriakson sodyum, klindamisin, rifamisin SV sülfat, amoksisilin, vankomisin HCl, amikasin sülfat,

kloramfenikol sodyumsüksinat, sefuroksim sodyum, imipenem, seftazidim, ornidazol, asetilsalisilik asit, metamizol sodyum, lornoksikam, ketoprofen, diklofenak sodyum ve tenoksikam ilaçlarını çalışmıştır (Senturk *et al.* 2008; Senturk *et al.* 2009).

Güney ve arkadaşlarının (2016) yaptıkları bir çalışmada **1-6** numaralı urasil türevleri ile GR enziminin inhibisyonu incelenmiş ve IC₅₀ değerleri 2,68-166,6 nM aralığında olduğu belirlenmiştir (Guney *et al.* 2016).

Yaptığımız bu tez çalışmasında:

1. İnsan eritrositlerinden afinite kromatografisi kullanılarak hCA I izoenzimi 103,1 kat ve % 57,33 verimle, hCA II izoenzimi ise 550,2 kat ve % 58,83 verimle izole edildi.
2. hCA I, hCA II enzimleri üzerinde denenen **8** ve **9** numaralı urasil türevleri için IC₅₀ değerleri sırası ile hCA I için 40,41 ve 27,81 µM, hCA II için 157,47 ve 66, 47 µM olarak belirlendi.
3. GR enzimi için **8-12** numaralı urasil türevlerinin IC₅₀ değerleri 21,71-83,3 nM olarak belirlendi.
4. hCA I, hCA II ve GR enzimleri için **1-12** numaralı urasil analoglarının docking değerleri ve görüntüleri elde edildi.
5. Yaptığımız çalışma sonunda denenen urasil türevlerinin bu enzimler üzerinde etkili inhibitörler olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz, A. A. M., Angeli, A., El-Azab, A. S., El-Enin, M. A. A., Supuran, C. T., 2017. Synthesis and biological evaluation of cyclic imides incorporating benzenesulfonamide moieties as carbonic anhydrase I, II, IV and IX inhibitors. *Bioorg Med Chem* 25(5), 1666-1671.
- Açan, L., 1990. Koyun beyni glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara.
- Alafeefy, A. M., Carta, F., Ceruso, M., Al-Tamimi, A. M. S., Al-Kahtani, A. A., Supuran, C. T., 2016. Development of 3-(4-aminosulphonyl)-phenyl-2-mercapto-3Hquinazolin-4-ones as inhibitors of carbonic anhydrase isoforms involved in tumorigenesis and glaucoma. *Bioorg Med Chem.* 24, 1402-1407.
- Arena (Applied Research Ethics National Association) (2002) Institutional animal care and use committee guidebook, 2nd ed. Boston, 121-125.
- Argiris, A., Haraf, D. J., Kies, M., Vokes, E. E. 2003. Intensive concurrent chemoradiotherapy for head and neck cancer with 5-fluorouracil and hydroxyureabased regimens: Reversing a pattern of failure. *Oncologist*, 8 (4): 350-360.
- Becker K., Rahlfs S., Nickel C., Schirmer R. H., 2003. Glutathione-function and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol. Chem.* 384, 551-566.
- Benfodda, Z., Guillen, F., Romestand, B., Dahmani, A., Blancou, H. 2010. Synthesis and investigation of inhibition effect of fluorinated sulfonamide derivatives on carbonic anhydrase. *Eur J Med Chem.* 45(3), 1225-1229.
- Blicharska B and Kupka T (1983) Theoretical DFT and experimental NMR studies on uracil and 5-fluorouracil. *J. Mol. Struct.*, 613: 153-166.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Briganti, F., Mangani, S., Scozzafava, A., Vernaglione, G., Supuran, C.T., 1999. Carbonic anhydrase catalyzes cyanamide hydration to urea: Is it mimicking the physiological reaction. *J Biol Inorg Chem.*, 4,528-536.
- Bottcher, K., Waheed, A., Sly, W. S., 1994. Membrane-associated carbonic anhydrase from the crab gill: Purification, characterization, and comparison with mammalian CAs. *Arch. Biochem. Biophys*, 312, 429.
- Borhani, D. W., Shaw, D. E. 2012. The Future of Molecular Dynamics Simulations In Drug Discovery. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26:15-26.
- Carlberg, C., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase assays. *Methods in Enzymology*, 113, 484-495. Academic Pres, Orlando, FL.
- Casini, A., Mincione, F., Vullo, D., Menabuoni, L., Scozzafava, A., Supuran, C. T., 2002a. *J Enzym Inhib Med Chem.* 17, 9.
- Casini, A., Scozzafava, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Supuran, C. T., 2002b. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis of Water Soluble Sulfonamides Incorporating a 4-sulfamoylphenylmethylthiourea Scaffold, with Potent Intraocular Pressure Lowering Properties *J Enzyme Inhib Med Chem.* 17, 333.

- Celik, I., Camas, H., Arslan, O., Küfrevioğlu, O.I., 1996. The effects of some pesticides on human and bovine erythrocyte carbonic anhydrase enzyme activities *in vitro*. J Environ Sci Heal A , 31:2651-2657.
- Chantawansri, T. L., Byrd, E. F. C., Rice, B. M., Andzelm, J. W. 2011. Molecular Dynamics Simulations of Hugoniot Relations for Poly[methyl methacrylate]. Weapons and Materials Research Directorate, ARL, USA.
- Chegwidden, W. R., Carter, N. D., 2000. Introduction to the carbonic anhydrases. In: Chegwidden, W. R., Carter, N. D., Edwards, Y. H., Introduction to the carbonic anhydrases. The Carbonic Anhydrases: New Horizons. Birkhauser Verlag Basel, Boston pp. 13-28.
- Christianson, D. W., Fierke, C. A., 1996. Carbonic anhydrase: Evolution of the zinc binding site by nature and by design. Acc Chem Res., 29:331-339.
- Cooper, A. J. L., 1997. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R. N., Prusiner, S. B., Dimauro, S., Barchi, R. L., Kunk, L. M. (Eds), The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease. Burtterworth-Heinemann, Boston, pp.1195-1230.
- Davis, R. A., Vullo, D., Maresca, A., Supuran, C. T., Poulsen, S. A., 2013. Natural product coumarins that inhibit human carbonic anhydrases. Bioorg Med Chem. 21(6), 1539-1543.
- Davis, R. A., Vullo, D., Supuran, C. T., Poulsen, S. A. 2014. Natural Product Polyamines That Inhibit Human Carbonic Anhydrases. Biomed Res Int. 2014: 374079.
- De Simone, G., Di Fiore, A., Capasso, C., Supuran, C. T. 2015. The zinc coordination pattern in the eta-carbonic anhydrase from *Plasmodium falciparum* is different from all other carbonic anhydrase genetic families. Bioorgan. Med. Chem. Lett., 25:1385-1389.
- Demir, E., 1994. Diabetlerde eritrosit glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz aktivitelerinin glikolize hemoglobin ve lipid peroksidasyonu ile değişimlerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Erzurum.
- Ekinci, D., Senturk, M., Senturk, E. 2015. Purification and Characterization of Carbonic Anhydrase Enzyme from Bovine Heart Tissue and Investigation of Inhibition Effects of Some Sulphonamide Derivative Drugs. Acta Physiologica, 215,99.
- Elleuche, S., Poggeler, S., 2009. Evolution of carbonic anhydrases in fungi. Curr Genet 55(2):211-222.
- Erat, M., 2002. İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Erzurum.
- Esbaugh, A. J., Tufts, B. L., 2006. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. Respiratory Physiology & Neurobiology, 154,185-198.
- Fabre, N., Reiter, I. M., Becuwe-Linka, N., Genty, B., Rumeau, D., 2007. Characterization and expression analysis of genes encoding alpha and beta carbonic anhydrases in Arabidopsis. Plant Cell Environ, 30(5):617-629.
- Fujiwara, Y., Kondo, T., Murakami K., Kavakami, Y., 1989. Decrease of the inhibition of lipid peroxidation by glutathion-dependent system in erythrocytes of non insulin dependent diabetes. Clin. Wochenschr., 67, 336-341.

- Göcen, T. 2012. Urasil ve 5-Sübstitüye Türevlerinin Yapılarının Kuantum Kimyasal Yöntemlerle İncelenmesi ve Bazı Termodinamik Niceliklerinin Hesaplanması. Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Gözükara, E. M. 1997. Biyokimya Cilt:1. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Grellier, P., Sarlauskas, J., Anusevicius, Z., Marozienne, A., Houee-Levin, C., Schrevel, J. and Cenas N., 2001. Antiplasmodial Activity of Nitroaromatic and Quinoidal Compounds: Redox Potential vs Inhibition of Erythrocyte Glutathione Reductase. *Arch Biochem Biophys.* 393, 199-206.
- Guerri, A., Briganti, F., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Mangani, S., 2000. Mechanism of cyanamide hydration catalyzed by carbonic anhydrase II suggested by cryogenic X-ray diffraction. *Biochemistry*, 39:12391-12397.
- Gül M., Kutay F. Z., Temocin S., Hanninen O., 2000. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J. Exp. Biol.* 38, 625-634.
- Guney, M., Cavdar, H., Senturk, M., Ekinci, D. 2015. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel uracil derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 25 (16) 3261-3263.
- Guney, M., Ekinci, D., Cavdar, H., Senturk, M., Zilbeyaz, K. 2016. Biological Evaluation of Some Uracil Derivatives as Potent Glutathione Reductase Inhibitors. *AIP Conference Proceedings* 1726, 020104; doi: 10.1063/1.4945930.
- Henderson, J. P., Byun, J., Takeshita, J., Heinecke, J. W. 2003. Phagocytes produce 5-chlorouracil and 5-bromouracil, two mutagenic products of myeloperoxidase, in human inflammatory tissue. *J. Biol. Chem.*, 278 (26): 23522-23528.
- Hewett-Emmett D., 2000. Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. In: Chegwidde, W. R., Edwards, Y., Carter, N., editors. *The carbonic anhydrases-New horizons*. Basel: Birkhauser, Verlag, pp 16-94.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPIanchored form of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, 392, 83-92.
- Innocenti, A., Muhlschlegel, F.A., Hall, R.A., Steegborn, C., Scozzafava, A., Supuran C.T., 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the beta-class enzymes from the fungal pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with simple anions. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(18):5066-5070.
- Innocenti, A., Hall, R.A., Schlicker, C., Muhlschlegel, F.A., Supuran, C.T., 2009a. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the beta-class enzymes from the fungal pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with aliphatic and aromatic carboxylates. *Bioorg Med Chem* 17(7):2654-2657.
- Innocenti, A., Hall, R.A., Schlicker, C., Scozzafava, A., Steegborn, C., 2009b. Muhlschlegel F.A, Supuran C.T: Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition and homology modeling studies of the fungal beta-carbonic anhydrase from *Candida albicans* with sulfonamides. *Bioorg Med Chem*, 17(13):4503-4509.
- Innocenti, A., Sarıkaya, S. B. Ö., Gülçin, İ., Supuran, C. T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors, Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. *Bioorg Med Chem.* 18(6), 2159-2164.
- Irlor, A., Bechthold, E., Davioud-Charvet, E., Hofman, V., Reau, R., Gromer, S., Schirmer, R. H., Becker, K. 2002. in *Flavins and Flavoproteins* (Chapman, S.,

- Perham, R., and Scrutton, N., eds) pp. 803-815, Agency for Scientific Publications, Berlin.
- Isık, S., Vullo, D., Durdagi, S., Ekinici, D., Senturk, M., Cetin, A., Senturk, E., Supuran, C. T., 2015. Interaction of carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with some pyridine and phenol hydrazinecarbothioamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 25 (23) 5636-5641.
- Karplus, P. A., Krauth-Siegel, R. L., Schirmer, R. H., Schulz, G. E., 1988. Inhibition of human glutathione reductase by the nitrosourea drugs 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea. A crystallographic analysis. *Eur. J. Biochem*. 171, 193-198.
- Katzung, B. A. 2007. Basic and Clinical Pharmacology, Mc-Graw Hill Medical, UK, 1179.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2008. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, İstanbul*.
- Kim, G., Selengut, J., Levine, R. L., 2000. Carbonic anhydrase III: The phosphatase activity is extrinsic. *Arch Biochem Biophys*, 377:334-340.
- Kimber, M. S, Pai, E. F., 2000. The active site architecture of *Pisum sativum* betacarbonic anhydrase is a mirror image of that of alpha-carbonic anhydrases. *EMBO J*, 19(7):1407-1418.
- Klengel, T., Liang, W. J, Chaloupka, J., Ruoff, C., Schroppel, K., Naglik, J. R., Eckert, S. E., Mogensen, E. G., Haynes, K., Tuite, M. F., Levin, L. R., Buck, J., Muhlschlegel, F. A., 2005. Fungal adenyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol*, 15(22):2021-2026.
- Knapen, M. F. C. M., Zusterzeel, P. L. M., Peters, W. H. M., Steegers, E. A. P., 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *Eur J Obstetrics Gynecol Reproduct Biol*. 82, 171-184.
- Laemmli, D. K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lamotte, F., Vianey-Liuaud, N., Duviau, M. P., Kobrehel, K., 2000. Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem*. 48, 4978-4983.
- Lane, T. W., Saito, M. A., George, G. N., Pickering, I. J., Prince, R. C., Morel, F. M., 2005. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, 435(7038):42.
- Le Trang, N., Bhargava, K. K., Cerami, A., 1983. Purification of glutathione reductase from gerbil liver in two steps. *Analitical Biochemistry*. 133, 94-99.
- Leach, A. R. 2001. *Molecular Modeling Principles and Applications*, 2nd Edition, Pearson Education Lmt., Great Britain.
- Lehninger *Biyokimyanın İlkeleri*. Nelson, D. L., Cox, M. M., (Çeviri editörü: Y. Murat Elçin) Palme yayıncılık 2013.
- Lindskog, S., Silverman, D. W., 2000. The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. In: Chegwiddden WR, Edwards Y, Carter N, editors. *The carbonic anhydrases-New horizons*; Basel: Birkhauser, Verlag, pp 175-196.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc*. 57, 685.
- Liu, P., Burdzy, A., Sowers, L. C. 2002. Substrate recognition by a family of uracil-DNA glycosylases: UNG, MUG and TDG. *Chem. Res. Toxicol.*, 15: 1001-1009.

- Macauley, S. R., Zimmerman, S. A., Apolinario, E. E., Evilia, C., Hou, Y. M., Ferry, J. G., Sowers, K. R., 2009. The archetype gamma-class carbonic anhydrase (Cam) contains iron when synthesized in vivo. *Biochemistry*, 48(5):817-819.
- Maren, T. H., Wynns, G. C., Wistrand, P. J., 1993. Chemical properties of carbonic anhydrase IV, the membrane-bound enzyme. *Mol. Pharmacol.* 44, 901-905.
- Mc Callum, M. J., Barrett, J., 1995. Purification and properties of glutathione reductase from the cestode *Moniezia expansa*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27,393-401.
- Misra, I., Griffith, O. W., 1998. Expression and purification of human γ -glutamylcysteine synthetase. *Prot. Expr. Purific.* 13, 268-276.
- Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Ueki, T., Miyachi, S., Tsukihara, T., 2000. X-ray structure of beta-carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration. *J Biol Chem.*, 275:5521-5526.
- Montgomery, R., Conway, T. W., Spector, A. A., Chappell, D., 1996. *Biochemistry A Case-oriented Approach*, Sixth edition. Mosby-Year Book, Inc.
- Mori, N., Uozumi, N., Furuta, H., Hoshikawa, H., 1998. Effect of acetazolamide on cation concentration in the endolymph of the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol*, 533, 12-15.
- Müller F. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*; Williams C. H., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 1992; 121-211.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Sixth Edition (W.H. Freeman Publishers), New York.
- Nordhoff A., Bücherler U. S., Werner D., Schirmer R. H., 1993. Folding of the four domains and dimerization are impaired by the Gly446--Glu exchange in human glutathione reductase. Implications for the design of antiparasitic drugs. *Biochemistry*. 32, 4060-4066.
- Ogino, H., Fuji, M., Satou, W., Suzuki, T., Michishita, E., Ayusawa, D. 2002. Binding of 5-bromouracil containing S/MAR DNA to the nuclear matrix. *Dna. Res.*, 9 (1): 25-29.
- Özdemir, Ü. Ö., Altuntaş, A., Gündüzalp, A. B., Arslan, F., Hamurcu, F., 2014. New aromatic/heteroaromatic propanesulfonylhydrazones: Synthesis, physical properties and inhibition studies against carbonic anhydrase II (CAII) enzyme. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 128, 452-460.
- Özeral, G. C. 2017. *In Silico Conformational Analysis of Vancomycin and Its Complexes*. Yeditepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.
- Parisi, G., Perales, M., Fornasari, M. S., Colaneri, A., Gonzalez-Schain, N., Gomez-Casati, D., Zimmermann, S., Brennicke, A., Araya, A., Ferry, J. G., Echave, J., Zabaleta, E., 2004. Gamma carbonic anhydrases in plant mitochondria. *Plant Mol Biol*, 55(2):193-207.
- Parkkila, A. K., Parkkila, S., Serlo, W., Reunanen, M., Vierjoki, T., 1994. Rajaniemi H., A competitive dual-label time-resolved immunofluorometric assay for simultaneous detection of carbonic anhydrase I and II in cerebrospinal fluid *Clinica Chimica Acta*, 230, 81-89.
- Parui, R., Gambir, K. K., Mehrotra, P. P., 1991. Changes in carbonic anhydrase may be the initial step of altered metabolism in hypertension. *Biochem. Int*, 23, 779-789.

- Patel, M. P., Marcinkeviciene, J., Blanchard, J. S., 1998. Enterococcus faecalis glutathione reductase: Purification, characterization and expression under normal and hyperbaric O₂ conditions. FEMS Microbiology Letters, 166, 155-163.
- Pocker, Y., Sarkanen, S., 1979. Carbonic anhydrase: structure, catalytic versatility and inhibition. Advances in Enzymology, New York, p. 149-273.
- Rastogi, V. K. 2011. Vibrational Spectroscopy: An excellent tool for characterisation of biomolecules. 98. Indian Science Congress, Chennai, pp. 4-34.
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X. L., Sly, W. S., 1995. Carbonic anhydrase IV: role of removal of C-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme activity. Arch. Biochem. Biophys, 320, 315-322.
- Rastogi, V. K. 2011. Vibrational Spectroscopy: An excellent tool for characterisation of biomolecules. 98. Indian Science Congress, Chennai, pp. 4-34.
- Sawaya, M. R., Cannon, G. C., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E. B., Yeates T. O., Kerfeld, C. A., 2006. The structure of beta-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. J Biol Chem, 281(11):7546-7555.
- Schlicker, C., Hall, R.A., Vullo D., Middelhaufe, S., Gertz M., Supuran, C. T., Muhlschlegel, F. A., Steegborn, C., 2009. Structure and inhibition of the CO₂-sensing carbonic anhydrase Can2 from the pathogenic fungus Cryptococcus neoformans. J Mol Biol, 385(4):1207-1220.
- Segel, I. H., 1968. Biochemmical calculations. Inc., New York,403.
- Senturk, M., Kufrevioglu, O. I., Ciftci, M., 2008. Effects of some antibiotics on human erythrocyte glutathione reductase: An in vitro study, J Enzym Inhib Med Chem. 23; 1, 144-148.
- Senturk, M., Kufrevioglu, O. I., Ciftci, M., 2009. Effects of some analgesic and anesthetic drugs on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. J Enzym Inhib Med Chem. 24; 2, 420-424.
- Senturk, M., Cavdar, H., Talaz, O., Supuran C.T. 2012. Carbonic anhydrase inhibitors or activators: small organic molecules as drugs and prodrugs. In: Medicinal Chemistry and Drug Design, Edited by Deniz Ekinci. Publisher: IN-TECH. ISBN 979-953-307-678-1. pp 315-328.
- Senturk, M., 2017. Enzyme Inhibitors and Activators. Edited by Murat Senturk. Publisher: IN-TECH. ISBN 978-953-51-3058-1.
- Sethi, K. K., Verma, S. M., Tanç, M., Supuran, C. T., 2013. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II and VII with benzene sulfonamides incorporating 4,5,6,7-tetrachlorophthalimide moiety. Bioorg Med Chem 21(17), 5168-5174.
- Shohet, S. B., Beutler, E., 1986. Glutathione metabolism of the erythrocyte. Williams Hematologie. The Erythrocyte, Part Four.
- Siegel, R. L. K., Arscott, L. D., Janas, A. S., Schirmer, R. H., Williams, C. H., 1998. Role of active site tyrsine residues in catalysis by human glutathione reductase. Biochemistry. 37, 13968-13977.
- Sly W.S., Hu P.Y., 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. Annu Rev Biochem 64:375-401

- Sly, W. S., 2000. The membrane carbonic anhydrases: from CO₂ transport to tumor markers. In: Chegwidan, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H. (Eds.), The membrane carbonic anhydrases: from CO₂ transport to tumor markers. The Carbonic Anhydrases. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp. 96-103.
- So, A. K, Espie, G. S, Williams, E. B, Shively, J. M, Heinhorst, S, Cannon, G. C., 2004. A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell. *J Bacteriol*, 186(3):623-630.
- Soni, S. D., Srikrishnan, T., Alderfer, J. L. 1996. Halogenated nucleic acids structure and conformational studies of 5-fluorocytidine by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Nucleosides and Nucleotides*, 15: 1945-1957.
- Supuran, C. T, Conroy, C. W, Maren, T. H., 1997. Is cyanate a carbonic anhydrase substrate. *Proteins Struct Funct Genet* 27:272-278.
- Supuran C.T, Scozzafava A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Exp Opin Ther Patents* 10:575-600.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., 2002. Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Exp Opin Ther Patents* 12:217-242.
- Supuran CT., 2004. Carbonic anhydrases: Catalytic and inhibition mechanisms, distribution and physiological roles carbonic anhydrase. In: Supuran CT, Scozzafava Conway J, editors. Carbonic anhydrase. Its inhibitors and activators. London: CRC Press; p 1-23.
- Supuran, C. T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Disc.*, 7, 168.
- Stams, T., Christianson, D. W., 2000. X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. In: Chegwidan, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H. (Eds.), X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. The Carbonic Anhydrases: New Horizons. Birkhauser Verlag, Boston. pp. 159-174.
- Şentürk, M., 2006. Glutasyon Redüktaz Enziminin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Tas, M., Senturk, E., Ekinci, D., Demirdag, R., Comakli, V., Bayram, M., Akyuz, M., Senturk, M., Supuran, C. T., 2019. Comparison of blood carbonic anhydrase activity of athletes performing interval and continuous running exercise at high altitude. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 34 (1) 219-225.
- Tashian R. E., Hewett-Emmet D., Venta P. J., 1991. "Diversity and Evolution in the Carbonic Anhydrase Gene Family," ed. by Botrè F., Gros G., Storey B. T., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim., pp. 151-161.
- Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., Carter, N. D., Bergenhem, N. C. H., 2000. Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs) and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains.
- Toribio, F., Martinet-Lara, E., Pascual, P. and Lopez-Barea, J., 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, *J Chromatography B*. 684, 77-97.
- Tripp, B. C, Bell, C. B, Cruz, F, Krebs C, Ferry, J. G., 2004. A role for iron in an ancient carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 279(8):6683-6687.

- Turkoglu, E. A., Senturk, M., Supuran, C. T., Ekinici, D. 2017. Carbonic anhydrase inhibitory properties of some uracil derivatives. *J Enzym Inhib Med Chem.* 32 (1) 74-77.
- Verpoorte, J. A., Mehta, S., Edsall, J. T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 242, 4221.
- Waheed, A., Okuyama, T., Heyduk, T., Sly, W. S., 1996. Carbonic anhydrase IV: purification of a secretory form of the recombinant human enzyme and identification of the positions and importance of its disulfide bonds. *Arch Biochem. Biophys.* 333, 432-438.
- Wang, X. Y., Lin, J., Zhang, X. M., Liu, Q., Xu, Q., Tan, R. X., Guo, Z. J. 2003. 5-Fluorouracilcisplatin adducts with potential antitumor activity. *J. Inorg. Biochem.*, 94: 186-192.
- Whitney, P. L., Briggler, T. V., 1982. Membrane-associated carbonic anhydrase purified from bovine lung. *J. Biol. Chem.*, 257, 12056-12059.
- Whittington, D. A., Grubb, J. H., Waheed, A., Shah, G. N., Sly, W. S., 2004. Christianson, D.W., Expression, assay, and structure of the extracellular domain of murine carbonic anhydrase XIV: implications for selective inhibition of membrane-associated isozymes. *J. Biol. Chem.*, 279, 7223-7228.
- Xu Y., Feng L., Jeffrey P.D., Shi Y., Morel F.M., 2008. Structure and metal Exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature.*, 452(7183):56-61.
- Yaseen, R., Ekinici, D., Senturk, M., Hameed, A. Dh., Ovais, S., Rathore, P., Samim, M., Javed, K., Supuran, C. T., 2016. Pyridazinone substituted benzenesulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 26, 1337-1341.
- Zimmerman, S. A., Ferry, J. G., Supuran C. T., 2007. Inhibition of the archaeal β -Class (Cab) and γ -Class (Cam) carbonic anhydrases. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 901-908.
- Zubay, G., 1988. *Biochemistry*, Second Edition, Macmillan Publishing Company.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Kübra ÇAVUŞOĞLU
Doğum Yeri / Tarihi	Erzurum / 1990
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2015).
Yüksek Lisans Öğrenimi	Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı / Biyokimya Bilim Dalı (2019). Atatürk Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı (2015-Devam ediyor).
Bilimsel Faaliyetler	A. Uluslararası Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler 1. Cavusoglu, K., Celik, H., Senturk, M., Ekinici, D. Investigation of Inhibitory Effects of Some Sulfonamides on Acetylcholinesterase Enzyme. 42st National Physiology Congress. ACTA PHYSIOLOGICA, 2016, Volume: 218, Special Issue: SI Supplement: PC084, Pages: 57. (SCI). 2. Cavusoglu, K., Celebi, F., Celik, M., Senturk, M., Sengul, E., Gelen, V., Cinar, A. Investigation of the Effect of Shiga-toxin on Rat Serum Carbonic Anhydrase Enzyme. 43rd National Physiology Congress. ACTA PHYSIOLOGICA, 2017, Volume: 221, Special Issue: SI Supplement: PC159, Pages: 125. (SCI). 3. Cavusoglu, K., Senturk, M. Investigation of Some Uracil Derivatives on Glutathione Reductase, Carbonic Anhydrase I and II Enzymes. 43rd National Physiology Congress. ACTA PHYSIOLOGICA, 2017, Volume: 221, Special Issue: SI Supplement: PC160, Pages: 125. (SCI). 4. Senturk, M., Cavusoglu, K. Inhibitory Effects of Bemiparin on Glutathione Reductase. 3rd International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences (ICANAS 2018), 09-12 May 2018, Antalya, Turkey. 5. Senturk, M., Cavdar, H., Cavusoglu, K. Determination of Inhibitory Effects of Some Halogenated Uracil Derivatives on Glutathione Peroxidase Enzyme. 3rd International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences (ICANAS 2018), 09-12 May 2018, Antalya, Turkey.