



BAZI PROTON TRANSFER TUZLARI
VE BAKIR KOMPLEKSLERİNİN
ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN
KARBONİK ANHİDRAZ IX VE XII
İZOENZİMLERİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ

Ekrem TUNCA

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Ocak – 2018

BAZI PROTON TRANSFER TUZLARI VE BAKIR KOMPLEKSLERİNİN ANTİTÜMÖR
ETKİLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ IX VE XII İZOENZİMLERİ ÜZERİNDE
İNCELENMESİ

Ekrem TUNCA

Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Ocak – 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ekrem TUNCA tarafından hazırlanan "BAZI PROTON TRANSFER TUZLARI VE BAKIR KOMPLEKSLERİNİN ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ IX VE XII İZOENZİMLERİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ" adlı tez çalışması, aşağıda belirtilen jüri tarafından Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek OY BİRLİĞİ ile Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

19/01/2018

Prof. Dr. Önder UYSAL
Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Cengiz YENİKAYA
Anabilim Dalı Başkanı, Kimya Bölümü

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL
Danışman, Biyokimya Bölümü

Sınav Komitesi Üyeleri

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR
Eczacılık Fakültesi, Anadolu Üniversitesi

Prof. Dr. Tamer AKAR
Kimya Bölümü, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

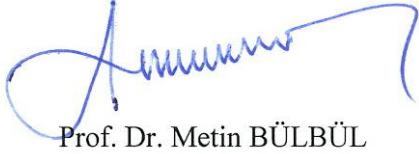
Prof. Dr. Metin BÜLBÜL
Biyokimya Bölümü, Dumlupınar Üniversitesi

Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA
Tıp Fakültesi, Dumlupınar Üniversitesi

Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK
Biyokimya Bölümü, Dumlupınar Üniversitesi

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan intihal programı ile tarandığını ve benzerlik oranının %5 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.



Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Danışman



Ekrem TUNCA

Öğrenci

BAZI PROTON TRANSFER TUZLARI VE BAKIR KOMPLEKSLERİNİN ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ IX VE XII İZOENZİMLERİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ

Ekrem TUNCA

Kimya, Doktora Tezi, 2018

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

Karbonik anhidrazlar (CA) (EC 4.2.1.1) karbon dioksitin (CO₂), bikarbonat ve protona dönüşümlü hidrasyon reaksiyonunu katalizleyen, aktif bölgesinde Zn²⁺ iyonu bulunduran ve pek çok organizmada bulunan metaloenzimlerdir. Memelilerde bulunan karbonik anhidraz enzimleri α gen ailesine aittir. Günümüzde, omurgalılarda, on altı farklı karbonik anhidraz izoenzimi tanımlanmıştır. Hücre membranına gömülü karbonik anhidrazlar olan CA IX ve CA XII, kanser ile ilişkisi olan CA izoenzimleridir. CA IX ve CA XII' nin inhibe edilmesi ile tümör ilerleyişinin durdurulduğu *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir. Buradan hareketle, bu çalışmada, 5-sülfosalisilik asit ile 2-aminopiridin türevlerinin proton transfer tuzlarının ve Cu(II) komplekslerinin CA IX ve CA XII izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak incelendi. Ayrıca bileşiklerin insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri de incelenerek CA IX ve CA XII ile kıyaslandı.

hCA I ve hCA II izoenzimleri insan eritrositlerinden Sepharose®4B-L-tirozin-*p*-aminobenzensülfonamit afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı, CA IX ve CA XII izoenzimleri de rekombinant olarak temin edildi. hCA I izoenzimi %45,02 verimle saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 1565,12 EU/mg protein olarak bulundu. hCA II izoenziminin ise spesifik aktivitesi 3706,30 EU/mg protein olup, %62,72 verimle saflaştırıldı. Enzimlerin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. İnhibisyon çalışmaları sonucunda bileşiklerin CA XII izoenzimine karşı daha seçici oldukları belirlendi. Bileşiklerin hidrataz IC₅₀ değerlerinin hCA I için 15,068 μ M – 99,020 μ M arasında, hCA II için 22,360 μ M – 77,025 μ M arasında, CA IX için 23,902 μ M – 138,629 μ M arasında ve CA XII için 9,495 μ M – 693,147 μ M arasında olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Bakır kompleksleri, inhibisyon, kanser, karbonik anhidraz, proton transfer tuzu, sülfosalisilik asit.

INVESTIGATION OF ANTITUMOR EFFECTS OF SOME PROTON TRANSFER SALTS AND COPPER COMPLEXES IN TERMS OF CARBONIC ANHYDRASE IX AND XII ISOENZYMES

Ekrem TUNCA

Chemistry, PhD Thesis, 2018

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

Carbonic anhydrases (CAs) (EC 4.2.1.1) are ubiquitous metalloenzymes containing Zn^{2+} in its active side, catalyze the reversible hydration of carbon dioxide (CO_2) to bicarbonate and proton. Mammalian carbonic anhydrases belong to α gene family. Sixteen different carbonic anhydrase isoenzymes were identified in vertebrates up to now. CA IX and CA XII, which are transmembrane carbonic anhydrases, are cancer related CA isoenzymes. It was proved that *in vitro* and *in vivo* progression of tumors were decreased by inhibition of CA IX and CA XII. Therefore the inhibition effects of the proton transfer salts and Cu(II) complexes of 5-sulfosalicylic acid and 2-aminopyridine derivatives on CA IX and CA XII isoenzymes were investigated as *in vitro*. Also the inhibition effects of the compounds were investigated on hCA I and hCA II, purified from human erythrocytes, and were compared with CA IX and CA XII.

hCA I and hCA II isoenzymes were purified from human erythrocytes by using Sepharose[®]4B-L-tyrosine-*p*-aminobenzenesulfonamide affinity chromatography. CA IX and CA XII isoenzymes were used as recombinant. The purification yield and specific activity of hCA I are %45,02 and 1565,12 EU/mg protein, respectively. hCA II was purified with a yield of %62,72 and its specific activity was determined as 3706,30 EU/mg protein. Purity of the enzymes were checked with SDS-PAGE. The inhibition studies showed that synthesized compounds are more selective to CA XII isoenzyme. Hydratase IC_{50} values of the compounds was found as in the range of 15,068 μM – 99,020 μM for hCA I, 22,360 μM – 77,025 μM for hCA II, 23,902 μM – 138,629 μM for CA IX and 9,495 μM – 693,147 μM for CA XII.

Keywords: Cancer, carbonic anhydrase, copper complexes, inhibition, proton transfer salt, sulfosalicylic acid.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince hiçbir zaman desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Metin BÜLBÜL'e, tez çalışmasında kullanılan inhibitör bileşiklerin sentezi ve karakterizasyonunu gerçekleőtiren Prof. Dr. Cengiz YENİKAYA ve Yrd. Doç. Dr. Halil İLKİMEN'e, elektroforez işleminde katkılarından dolayı Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA ve Arő. Gör. Emrah OKUR'a, tez çalışmasını 2015–49 ve 2016–72 nolu projelerle destekleyen Dumlupınar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim Biyokimya ve Kimya Bölümü'nün değerli öğretim üye ve elemanlarına teőekkürü bir borç bilirim. Beni bugünlere getiren aileme ve her zaman yanımda olan eőim Yasemin TUNCA'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KANSER VE KANSER İLİŞKİLİ KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ	3
2.1. Kanser	3
2.2. Karbonik Anhidraz Enzimleri	4
2.2.1. Karbonik anhidraz enzimlerinin fizyolojik fonksiyonları	6
2.2.2. Karbonik anhidraz enzimlerinin yapısı ve kataliz mekanizması	8
2.2.3. Karbonik anhidraz inhibitörleri	11
2.3. Kanser İlişkili Karbonik Anhidraz İzoenzimleri: CA IX ve CA XII	13
2.3.1. Tarihçe	13
2.3.2. CA IX ve CA XII'nin yapısı	15
2.3.3. CA IX ve CA XII'nin doku dağılımları ve hücre içi yerleşimleri	17
2.3.4. CA IX ekspresyonunun düzenlenmesi	20
2.3.5. CA9 transkripsiyonunun düzenlenmesi: HIF yolu	20
2.3.6. Diğer düzenleyici yollar	21
2.3.7. CA XII ekspresyonunun düzenlenmesi	22
2.3.8. CA IX ve CA XII'nin tümör biyolojisindeki rolü	23
2.3.9. CA IX ve CA XII hedefli tedavi	26
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI	28
4. YAPILAN ÇALIŞMALAR	33
4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
4.2. Kullanılan Cihazlar	33
4.3. Kullanılan İnhibitör Bileşikler	34
4.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	38
4.5. Afinite Jelinin Hazırlanışı	41
4.5.1. Siyanojen bromür (CNBr) ile aktifleştirilmiş Sepharose® 4B matriksine L-tirozin bağlanması	41

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.5.2. 4-aminobenzensülfonamit bileşiğinin L-tirozin bağlanmış jele kenetlenmesi ..	41
4.6. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması	41
4.6.1. Eritrosit hemolizatının hazırlanışı	41
4.6.2. Hemolizatın afinite kolonuna yüklenmesi ve enzimin elüsyonu	43
4.7. Protein Tayini.....	43
4.7.1. Kalitatif protein tayini	43
4.7.2. Kantitatif protein tayini	43
4.8. Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Belirlenmesi	44
4.8.1. CO ₂ hidrasyon aktivitesinin (hidrataz) belirlenmesi	44
4.8.2. Esteraz aktivitesinin belirlenmesi	44
4.8.3. Esteraz K_m ve V_{max} sabitlerinin belirlenmesi	45
4.9. Diyaliz.....	46
4.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	46
4.11. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Kansere İlişkili Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi.	46
4.11.1. Hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	46
4.11.2. Esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi	47
4.12. Sonuçların Değerlendirilmesi, İstatistiksel Analiz ve Konu ile İlgili Şekillerin Oluşturulmasında Kullanılan Yazılımlar	47
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	48
5.1. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Eritrositlerden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılmasına İlişkin Sonuçlar	48
5.1.1. hCA I ve hCA II' nin elüsyonu, kalitatif protein tayini ve CO ₂ hidrasyon aktivitesi ölçümü	48
5.1.2. Kantitatif protein tayini	49
5.1.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin spesifik aktivitelerinin ve saflaştırma verimlerinin belirlenmesi.....	49
5.1.4. SDS–PAGE sonuçları.....	50
5.1.5. Saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin kinetik özelliklerinin belirlenmesi .	50
5.2. Sentezlenen Bileşiklerin hCA I, hCA II, CA IX ve CA XII İzoenzimlerinin Hidrataz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerine İlişkin Sonuçlar.....	52
5.2.1. Bileşiklerin hCA I hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi	53
5.2.2. Bileşiklerin hCA II hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi.....	62
5.2.3. Bileşiklerin CA IX hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi	73
5.2.4. Bileşiklerin CA XII hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi	86

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

5.3. Sentezlenen Bileşiklerin hCA I, hCA II, CA IX ve CA XII İzoenzimlerinin Esteraz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerine İlişkin Sonuçlar.....	101
6. TARTIŞMA	102
7. ÖNERİLER.....	109
KAYNAKLAR DİZİNİ	110
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. hCA II izoenziminin yapısı ve aktif bölgesindeki hidrofobik ve hidrofilik kısımlar	8
2.2. hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki hidrojen bağı	9
2.3. Karbonik anhidraz enziminin kataliz mekanizması	10
2.4. A: CO ₂ molekülünün aktif bölge ile etkileşimi. B: HCO ₃ ⁻ iyonunun aktif bölge ile etkileşimi	11
2.5. Karbonik anhidraz inhibisyon mekanizmaları	12
2.6. CA I, II, IX ve XII izoenzimlerinin amino asit sekanslarının kıyaslaması	14
2.7. CA IX (A) ve CA XII (B) yapılarının şematik gösterimi	16
2.8. Hipoksinin CA IX ekspresyonu üzerine etkisi	21
2.9. CA XII ekspresyonunun düzenlenmesi	23
2.10. CA IX ve CA XII'nin kanser hücre pH'sının düzenlenmesindeki rolü	24
4.1. Afinite jelinin hazırlanması esnasında gerçekleşen reaksiyonlar	42
5.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kolonundan elüsyonu esnasında absorpsanları ve aktivitelerindeki değişim.	48
5.2. Protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	49
5.3. SDS-PAGE sonuçları	50
5.4. hCA I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	51
5.5. hCA II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	51
5.6. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK1 bileşiğinin etkisi	53
5.7. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK3 bileşiğinin etkisi	54
5.8. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK6 bileşiğinin etkisi	55
5.9. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK1 bileşiğinin etkisi	56
5.10. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK2 bileşiğinin etkisi	57
5.11. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK3 bileşiğinin etkisi	58
5.12. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK4 bileşiğinin etkisi	59
5.13. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK5 bileşiğinin etkisi	60
5.14. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK6 bileşiğinin etkisi	61
5.15. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK1 bileşiğinin etkisi	62
5.16. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK2 bileşiğinin etkisi	63
5.17. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK3 bileşiğinin etkisi	64
5.18. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK6 bileşiğinin etkisi	65
5.19. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK7 bileşiğinin etkisi	66
5.20. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK1 bileşiğinin etkisi	67

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.21. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK2 bileşiğinin etkisi.	68
5.22. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK3 bileşiğinin etkisi.	69
5.23. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK4 bileşiğinin etkisi.	70
5.24. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK5 bileşiğinin etkisi.	71
5.25. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK6 bileşiğinin etkisi.	72
5.26. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK1 bileşiğinin etkisi.	73
5.27. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK2 bileşiğinin etkisi.	74
5.28. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK3 bileşiğinin etkisi.	75
5.29. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK4 bileşiğinin etkisi.	76
5.30. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK5 bileşiğinin etkisi.	77
5.31. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK6 bileşiğinin etkisi.	78
5.32. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK7 bileşiğinin etkisi.	79
5.33. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK1 bileşiğinin etkisi.	80
5.34. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK2 bileşiğinin etkisi.	81
5.35. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK3 bileşiğinin etkisi.	82
5.36. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK4 bileşiğinin etkisi.	83
5.37. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK5 bileşiğinin etkisi.	84
5.38. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK6 bileşiğinin etkisi.	85
5.39. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine B2 bileşiğinin etkisi.	86
5.40. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine T1 bileşiğinin etkisi.	87
5.41. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK1 bileşiğinin etkisi.	88
5.42. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK2 bileşiğinin etkisi.	89
5.43. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK3 bileşiğinin etkisi.	90
5.44. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK4 bileşiğinin etkisi.	91
5.45. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK5 bileşiğinin etkisi.	92
5.46. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK6 bileşiğinin etkisi.	93
5.47. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK7 bileşiğinin etkisi.	94
5.48. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK1 bileşiğinin etkisi.	95
5.49. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK2 bileşiğinin etkisi.	96
5.50. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK3 bileşiğinin etkisi.	97
5.51. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK4 bileşiğinin etkisi.	98
5.52. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK5 bileşiğinin etkisi.	99

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.53. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK6 bileşiğinin etkisi	100
6.1. Çalışmada kullanılan ve serbest $-SO_3H$ grubu içeren bileşikler.	106
6.2. Çalışmada kullanılan ve çoklu $-NH_2$ grubu içeren bileşikler.	107
6.3. Çalışmada kullanılan ve çift merkez atom içeren bileşikler.	108



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. 2007-2017 yılları arasında geliştirilen bazı hedefli kemoterapi ajanları	3
2.2. α -CA izoenzimlerinin organ/doku dağılımları, hücre içi yerleşimleri ve CO ₂ hidrasyon aktiviteleri	5
2.3. Çeşitli hastalıklarda ilaç hedefi/hedef dışı olan hCA izoformları.....	13
4.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan inhibitör bileşikler ve kodları.....	34
5.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin spesifik aktiviteleri ve saflaştırma verimleri.....	49
5.2. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK1 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	53
5.3. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK3 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	54
5.4. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK6 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	55
5.5. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK1 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	56
5.6. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK2 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	57
5.7. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK3 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	58
5.8. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK4 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	59
5.9. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK5 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	60
5.10. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK6 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	61
5.11. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK1 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	62
5.12. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK2 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	63
5.13. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK3 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	64
5.14. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK6 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	65
5.15. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK7 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	66
5.16. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK1 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	67

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
5.17. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK2 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	68
5.18. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK3 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	69
5.19. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK4 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	70
5.20. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK5 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	71
5.21. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK6 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	72
5.22. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK1 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	73
5.23. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK2 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	74
5.24. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK3 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	75
5.25. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK4 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	76
5.26. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK5 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	77
5.27. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK6 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	78
5.28. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK7 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	79
5.29. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK1 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	80
5.30. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK2 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	81
5.31. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK3 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	82
5.32. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK4 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	83
5.33. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK5 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	84
5.34. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK6 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	85
5.35. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine B2 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	86

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
5.36. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine T1 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	87
5.37. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK1 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	88
5.38. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK2 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	89
5.39. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK3 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	90
5.40. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK4 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	91
5.41. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK5 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	92
5.42. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK6 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	93
5.43. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine BK7 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	94
5.44. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK1 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	95
5.45. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK2 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	96
5.46. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK3 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	97
5.47. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK4 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	98
5.48. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK5 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	99
5.49. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine PTK6 bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.	100
5.50. Bileşiklerin hidrataz IC ₅₀ değerleri.	101
6.1. CA izoenzimlerinin aktif bölge amino asitlerinin kıyaslanması.	104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ζ	Zeta
η	Eta
θ	Teta
Å	Angstrom
μ	Mikro
M	Molarite
°C	Celcius
mL	Mililitre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
K_m	Maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu
V_{max}	Maksimum hız
[I]	İnhibitör konsantrasyonu
IC ₅₀	Enzim aktivitesini %50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu
[S]	Substrat konsantrasyonu

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BCR	B hücresi reseptörü
BTK	Bruton tirozin kinaz
CA	Karbonik anhidraz
CCRCC	Clear Cell Renal Cell Carcinoma
CDK	Siklin bağımlı kinaz
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER α	Östrojen reseptör alfa

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
GLUT1	Glukoz taşıyıcı 1
HDAC	Histon deasetilaz
HeLa	Rahim ağzı kanseri hücre hattı
HIF	Hipoksi uyarılı faktör
HRE	Hipoksi yanıt elemanı
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
MaTu	HeLa hücresi yarı viral ajanı
MDCK	Madine–Darby Canine Kidney
PARP	poli(ADP–riboz) polimeraz
PD–1	Programlı hücre ölümü reseptörü 1
PDGFR	Trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü
PHD	Prolil hidroksilaz
PI3K	Fosfatidilinositol–3–kinaz
pVHL	von Hippel–Lindau tümör baskılayıcı proteini
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
T–ALL	T hücresi akut lenfoblastik lösemi
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte gün geçtikçe hastalıklar artmakta ve bu hastalıkların tedavisinde çözüm olması için yeni ilaçlar sentezlenmeye çalışılmaktadır. Çözüm bekleyen hastalıklardan biri de kanserdir. Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi sonucu ortaya çıkan bir hastalık gurubu olup, dünya çapında nüfusu etkileyen hastalık ve ölüm oranının başlıca nedenidir. GLOBOCAN verilerine göre yılda yaklaşık 14,1 milyon yeni kanser vakası tespit edilmekte ve kanser kaynaklı ölümlerin yılda 8,2 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir. (Forman ve Ferlay, 2014). Kanser kaynaklı ölüm oranının önümüzdeki yirmi yıllık süre zarfında yaklaşık %75 artması beklenmektedir (Milkovic vd., 2017). Dolayısıyla, kansere karşı savaşacak, hastaların hayatta kalma oranını ve yaşam kalitesini artıracak yeni tedavi stratejilerinin ve yeni ilaçların geliştirilme ihtiyacı önem arz etmektedir. Kanser tedavisi için birtakım yöntemler mevcuttur, ancak çeşitli kanser tedavi yaklaşımları, tümör hücrelerinin radyoterapiye, kemoterapiye ve diğer cerrahi olmayan yöntemlere karşı duyarsızlaşarak adeta direnmesi ile sık sık karşı karşıya kalmaktadır (Ondriskova vd., 2015). Bu tipik kanser davranışı, tedavi yanıtında tümör içi heterojenliğin kritik bir rolünü yansıtır. İlaç direncinin genetik olarak belirlenmiş mekanizmalarının yanı sıra, zayıf tümör kan dolaşımı, doku oksijenasyonu, besin maddesi temini, asit-baz dengesi ve biyoenerjetik durum gibi farklı fizyolojik faktörlerin de bu olguya katkı sağladıkları belirlenmiştir (Vaupel vd., 1989).

Tümör vaskülaritesinin mimarisi oldukça karmaşıktır (dolaşık, uzamış ve genellikle açılmış damarlar şeklindedir) ve bu durum değişken ve yetersiz beslenmenin yanı sıra hipoksik bölgelerin gelişimine neden olan, katı neoplazmı büyüten yetersiz oksijen iletimine de neden olur. Hücreler bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için, sürekli gelişme ve metastazı kaçınılmaz kılan bir uyum sürecinden geçerler (Harris, 2002; Fukumura ve Jain, 2007). Azalan oksijenasyon, hücresel seviyede, metabolizmanın anaerobik glikolize kayması, asidoz, anjiyogenez, hücre adezyonunda bozulma, hücresel göç oranında artış, azalmış proliferatif aktivite ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Moleküler seviyede ise oksijen azlığı, hipoksi-uyarılabilir transkripsiyon faktörünün α alt biriminin (HIF-1 α) gen ekspresyon profilinde kayda değer değişiklikler yapması ile sonuçlanır. HIF-1 α hipoksik koşullar altında stabildir, ancak normal oksijen seviyelerinde hızlı bir şekilde yıkıma uğrar (Semenza, 2010; Kim ve Dang, 2006). Hipoksi, tümör homojenliğinin bozulmasında görev alır ve tercihini en iyi uyum sağlayan kanser hücrelerinden yana kullanarak bu hücrelerin oldukça saldırgan fenotipik özellikler göstermesini tetikler.

Metabolik değişmenin glikolitik yola doğru olması, tümör hücre fizyolojisinde hipoksi tarafından tetiklenen değişikliklerin en önemlilerinden biridir. Daha az enerji üretmesine rağmen glukoz metabolizması, oksidatif fosforilasyona göre ağır basmaktadır. Çünkü bu yol kararsız oksijen tedarikinin olduğu şartlarda kanser hücrelerinin yaşamasına olanak tanır ve amino asit sentezi, nükleik asit sentezi ve neoplazma gelişmesini sağlayan lipidlerin sentezi gibi reaksiyonların gerçekleşmesi için kullanışlı ara ürünler sağlar. Onkogenik metabolik yollar sitozolik pH'nın geçici olarak düşmesine neden olan CO₂'i ve protonları oluştururken, buna karşılık artan glikoliz esnasında tümör hücreleri yüksek miktarda laktik asit üretirler. Kanser hücreleri asidik maddelerden kurtulmak ve hücre içi pH'sını tamponlamak için etkili stratejiler geliştirmişlerdir. Çünkü önemli hücre içi faaliyetler pH'nın nötr ile zayıf alkali değerler arasında sıkı bir şekilde düzenlenmesine bağlıdır. Asidik maddelerin hücre dışına çıkarılması, sırasıyla, hücre dışı asidifikasyona, kusurlu vasküleriteye ve atıkların yetersiz uzaklaştırılmasına neden olur, böylece tümör genişlemesi desteklenir (Gatenby ve Gillies, 2004; Kroemer ve Pouyssegur, 2008; Brahimi-Horn vd., 2011).

CO₂'in bikarbonat (HCO₃⁻) ve protona (H⁺) dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen, hipoksi uyarılı ve kanser ilişkili karbonik anhidraz (CA) izoformları olan CA IX ve CA XII, karbon dioksit (CO₂) metabolizmasına aktif olarak katılırlar, pH kontrolü ve tümör gelişiminde rol oynarlar. Tümör lezyonları ile yakın ilişkileri, biyobelirteçler ve terapötik hedefler olarak bu enzimlerin potansiyel klinik yararını göstermektedir (Pastorekova vd., 2006). Bu durum son yıllarda hedefli kemoterapi ajanları arasına CA IX ve CA XII inhibitörlerinin dahil edilmesi arayışını tetiklemiştir ve bu alandaki çalışmaların sayısı günden güne artmaktadır. Bu tez çalışmasında, diğer CA IX ve CA XII inhibitörlerinden farklı olarak sülfosalisilik asit ile 2-aminopiridin türevlerinin reaksiyonundan elde edilen proton transfer tuzlarının ve bu tuzların Cu(II) komplekslerinin kanser ilişkili bu iki izoenzim üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* şartlarda incelenmesi ve insan sitozolik CA I ve CA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon potansiyelleri ile kıyaslanması amaçlanmıştır.

2. KANSER VE KANSER İLİŞKİLİ KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ

2.1. Kanser

Kanser, gen ekspresyonundaki çoklu değişikliklerin sebep olduğu, hücre çoğalması ve hücre ölümü dengesinin düzensizleşmesine yol açan ve sonuçta dokulara invazyon ve farklı bölgelere metastaz yapabilen ve tedavi edilmezse ölüme sonuçlanan anormal hücre çoğalmasıdır (Ruddon, 2007). Kansere neden olan faktörler sigara, beslenme tarzı, çevre kirliliği, obezite, hareketsiz yaşam, meslek, virüsler, alkol, UV ve iyonize radyasyon, bazı kimyasallar, serbest radikaller, bazı ilaçlar ve genetik faktörler olarak sıralanabilir (Ruddon, 2007, Colditz, 2011). Akciğer kanseri %13,0 oranla dünya genelinde en sık karşılaşılan kanser türü iken, onu sırasıyla, meme (%11,9), kolon (%9,7), prostat (%7,9), mide (%6,8), karaciğer (%5,6), rahim ağzı (%3,7), yemek borusu (%3,2) ve mesane (%3,1) kanseri izlemektedir. Ülkemizde ise sıralama dünya sıralamasına benzemekle birlikte, %17,0 akciğer, %10,0 meme, %8,5 prostat, %8,1 kolon, %7,3 mesane, %6,8 mide, %5,8 tiroid, %3,4 Non-Hodgkin lenfoma ve %3,0 merkezi sinir sistemi kanseri şeklinde seyretmektedir (GCO, 2017).

Kemoterapi, kanser tedavisinde gerek radyoterapi ile kombine edilerek gerekse tekil olarak uzun yıllardır uygulanan bir tedavi yöntemidir. Zaman içerisinde gelişen teknoloji ve oluşan bilgi birikimi ile kanserli hücrelerdeki belirli molekülleri hedef alan ajanlar geliştirilmeye başlanmıştır ve günümüzdeki tedavi yaklaşımları da bu yönde geliştirilmektedir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. 2007–2017 yılları arasında geliştirilen bazı hedefli kemoterapi ajanları (Workman ve Collins, 2014; CenterWatch, 2017).

Yıl	Molekül Adı	İlaç Türü	Birincil Moleküler Hedefi
2017	Copanlisib	Küçük molekül	BCR, NFκB
	Acalabrutinib	Küçük molekül	BTK
2016	Pembrolizumab	Antibadi	PD-1
	Rucaparib	Küçük molekül	PARP
2015	Panobinostat	Küçük molekül	HDAC
	Lenvatinib	Küçük molekül	RTK
	Ixazomib	Küçük molekül	20S proteozom
2014	Belinostat	Küçük molekül	HDAC
	Pembrolizumab	Antibadi	PD-1
	Idelalisib	Küçük molekül	PI3K
2013	Obinutuzumab	Antibadi	CD20
	Ibrutinib	Küçük molekül	BTK
	Afatinib	Küçük molekül	EGFR

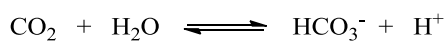
Çizelge 2.1. 2007–2017 yılları arasında geliştirilen bazı hedefli kemoterapi ajanları (devamı).

Yıl	Molekül Adı	İlaç Türü	Birincil Moleküler Hedefi
2012	Enzalutamid	Küçük molekül	Androjen reseptörü
	Pazopanib	Küçük molekül	VEGFR1, 2, 3
	Regorafenib	Küçük molekül	Multikinez
	Pertuzumab	Antibadi	ERBB2
	Karfilzomib	Küçük molekül	26S proteozom
	Aksitinib	Küçük molekül	VEGFR1, 2, 3
	Vismodegib	Küçük molekül	Hedgehog sinyal yolu
	Bosutinib	Küçük molekül	BCR-ABL, SRC
2011	Abirateron	Küçük molekül	CYP17
	Vemurafenib	Küçük molekül	BRAFV600E
	İpilimumab	Antibadi	CTLA-4
	Krizotinob	Küçük molekül	ALK, c-MET
	Vandetanib	Küçük molekül	VEGFR, EGFR
	Sunitinib	Küçük molekül	PDGFR, VEGFR, c-KIT
	Brentuksimab vedotin	Antibadi-sitotoksik konjüгат	CD30
2010	Trastuzumab	Antibadi	ERBB2
2009	Romedepsin	Küçük molekül	HDAC
	Bevacizumab	Antibadi	VEGF
	Ofatumumab	Antibadi	CD20
2007	Lapatinib	Küçük molekül	EGFR, ERBB2

CA IX ve CA XII izoenzimleri, tümör hücrelerinde ifadelenen proteinlerdendir. Ancak Çizelge 2.1’ de de görüldüğü gibi bu izoenzimleri hedef alan bir ilaç henüz pazara sunulmamıştır. Bu enzimlere spesifik inhibitörlerin geliştirilmesi, kemoterapi için yeni bir umut olacaktır.

2.2. Karbonik Anhidraz Enzimleri

Karbonik anhidrazlar (CA, EC 4.2.1.1) birçok organizmada var olan, birbirinden bağımsız yedi gen ailesi (α , β , γ , δ , ζ , η , θ) tarafından kodlanan, karbon dioksitin (CO_2) bikarbonat (HCO_3^-) ve protona (H^+) tersinir hidrasyonunu katalizleyen ve aktif bölgesinde Zn^{2+} iyonu bulunduran metaloenzimlerdir (Alterio vd., 2012; Krishnamurthy vd., 2008; Supuran, 2008a; Xu vd., 2008; Kikutani vd., 2016).



Bu sayede, CA enzimleri hücre içi ve hücre dışı CO_2 , H^+ ve HCO_3^- konsantrasyonunu düzenlerler (Frost, 2014). α -CA’ lar omurgalılarda, tek hücrelilerde, alglerde, yeşil bitkilerin sitoplazmalarında ve pek çok Gram negatif bakteride (Supuran, 2016a; Supuran, 2008a; Xu vd., 2008; Capasso ve Supuran, 2015); β -CA’ lar Gram negatif ve pozitif bakterilerde, tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında, pek çok mantar çeşidinde ve bazı *Archaea* türlerinde (Supuran ve Capasso, 2015; Supuran, 2011, Del Prete vd., 2014a); γ -CA’ lar *Archaea*,

siyanobakteriler ve birçok bakteri türünde (Neri ve Supuran, 2011; Supuran, 2008a; Capasso ve Supuran, 2015); δ - ve ζ -CA' lar deniz diatomlarında (Del Prete vd., 2014a); η -CA' lar ise tek hücrelilerde bulunur (Del Prete vd., 2014b). θ -CA' ların ise bir deniz diatomu olan *Phaeodactylum tricornutum*'un tilakoid lümeninde bulunduğu tespit edilmiştir (Kikutani vd., 2016). İnsanlarda bulunan CA enzimleri ise α -CA gen ailesine aittir (Alterio vd., 2012). Günümüze kadar molekül yapısı, oligomerik düzen, hücresel yerleşim, organlardaki ve dokulardaki dağılım, ifade seviyeleri, kinetik özellikleri ve inhibitörlere hassasiyet gibi özellikleri farklılık gösteren on altı farklı α -CA enzimi tanımlanmıştır (Supuran, 2008a; Supuran, 2008b; Clare ve Supuran, 2006). Bunlardan sekiz tanesi sitozolik protein (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA VIII, CA X, CA XI, CA XIII), iki tanesi mitokondri matriks proteini (CA VA, CA VB), bir tanesi salgı proteini (CA VI), iki tanesi glikozilfosfatidilinositol bağlı protein (CA IV, CA XV) ve üç tanesi membrana gömülü proteindir (CA IX, CA XII, CA XIV) (Çizelge 2.2). Sitozolik izoformlardan üçü (VIII, X ve XI), katalitik bölgede çinko iyonu ile koordine olmuş bir veya daha fazla histidin kalıntısı içermediğinden enzim aktivitesine sahip değildir. Bir grup olarak bunlara CA ilişkili proteinler denir ve sadece beyinde ifade edildikleri gözlenmiştir (Aspatwar vd., 2010).

Çizelge 2.2. α -CA izoenzimlerinin organ/doku dağılımları, hücre içi yerleşimleri ve CO₂ hidrasyon aktiviteleri (Alterio vd., 2012; Supuran, 2008a).

Izoenzim*	$k_{cat}(s^{-1})$	Hücre İçi Yerleşim	Doku/Organ Dağılımı
hCA I	$2,0 \times 10^5$	Sitozol	Eritrositler, sindirim sistemi, göz
hCA II	$1,4 \times 10^6$	Sitozol	Eritrositler, göz, sindirim sistemi, kemik osteoklastları, böbrek, akciğer, testis, beyin
hCA III	$1,0 \times 10^4$	Sitozol	İskelet kası, adipositler
hCA IV	$1,1 \times 10^6$	Membrana bağlı	Böbrek, akciğer, pankreas, beyin kılcalları, kolon, kalp kası, göz
hCA VA	$2,9 \times 10^3$	Mitokondri	Karaciğer
hCA VB	$9,5 \times 10^5$	Mitokondri	Kalp ve iskelet kası, pankreas, böbrek, omurilik, sindirim sistemi
hCA VI	$3,4 \times 10^3$	Salgı (Tükürük, süt)	Tükürük ve meme bezleri
hCA VII	$9,5 \times 10^3$	Sitozol	Merkezi sinir sistemi
hCA VIII	<i>Katalitik değil</i>	Sitozol	Merkezi sinir sistemi
hCA IX	$3,8 \times 10^3$	Membrana gömülü	Tümörler, sindirim sistemi mukozası
hCA X	<i>Katalitik değil</i>	Sitozol	Merkezi sinir sistemi
hCA XI	<i>Katalitik değil</i>	Sitozol	Merkezi sinir sistemi
hCA XII	$4,2 \times 10^3$	Membrana gömülü	Böbrek, bağırsak, üreme epiteli, göz, tümörler
hCA XIII	$1,5 \times 10^3$	Sitozol	Böbrek, beyin, akciğer, bağırsak, üreme sistemi
hCA XIV	$3,1 \times 10^3$	Membrana gömülü	Böbrek, beyin, karaciğer, göz
mCA			
XV**	$4,7 \times 10^5$	Membrana bağlı	Böbrek

*h: İnsan, m: Fare

**İnsanlarda ifadelenenmemektedir.

2.2.1. Karbonik anhidraz enzimlerinin fizyolojik fonksiyonları

Yıllardır süren araştırmalar, CA' yı, hava-su ara yüzeyinde gaz alışverişi, membranlar arasında CO₂ ve HCO₃⁻ taşınımı, metabolik açıdan aktif dokulardaki biyosentetik reaksiyonlar (glukoneogenez, lipogenez ve ürejeniz vb.), asit-baz dengesi, elektrolit salınımı, kalsifikasyon, sinyal iletimi, onkogeniz ve üremeyi kapsayan geniş bir fizyolojik süreç yelpazesine dahil etmiştir (Frasseto vd., 2012; Chaput vd., 2012; Biswas ve Kumar, 2012). Bu fizyolojik fonksiyonlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Hemolitik anemi, kırmızı kan hücrelerinin zamanından önce yok edildiği ve kansızlığa yol açan bir hastalıktır. Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz eksikliği, hemolitik anemiyi tetikler (Chiang vd., 2001). Bu hastalar, kontrol ile kıyaslandıklarında, oldukça düşük CA I ekspresyonuna sahiptirler (Kuo vd., 2005). Bu durumun hemoglobine göre, CA I sentez oranı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. CA I, fizyolojik olarak daha belirgin izoform olan CA II' ye göre önemli ölçüde düşük aktiviteye sahip olduğu halde, CA I ekspresyonu hemolitik anemi için bir belirteç görevi görebilir (Frost, 2014).

CA II, eritrositlere ilaveten, böbrek interkalasyon hücrelerinde yüksek oranda, proksimal tübüller ve toplama kanalı ana hücrelerinde ise daha düşük oranda ifadenir ve buradaki bikarbonat akışını düzenler (Frost, 2014). Ayrıca sitoplazmik pH'ı dengelemek için, klorür/bikarbonat değiştirici (AE1) (McMurtie vd., 2004), sodyum-bikarbonat birlikte taşıyıcı (NBC1) (Becker ve Deitmer, 2007) ve sodyum/hidrojen değiştirici (NHE1) (Li vd., 2002) gibi membrana bağlı bazı iyon taşıyıcılarıyla etkileşmektedir. Bu etkileşimler, taşıyıcıların aktivitesini artırır ve taşıma metabolonlarını oluştururlar (McMurtie vd., 2004). Bu taşıyıcılara ilaveten, CA II, monokarboksilat taşıyıcılarından MCT1 ve MCT4 ile de etkileşir ve aktivitelerini artırır (Stridh vd., 2012).

CA III, disülfür bağları aracılığıyla, glutatyona tersinir olarak bağlanabilen iki reaktif sülfhidril grubu içerir. Bu reaksiyon muhtemelen hücreleri geri dönüşümsüz protein oksidasyonundan korumaktadır. CA III' ün aşırı ekspresyonu, hücreleri, H₂O₂-uyarılı apoptozdan korur (Frost, 2014). Farelerle yapılan deneyler, CA III' ün hücreleri oksidatif hasara karşı koruduğunu doğrulamıştır (Thomas ve Mallis, 2001). Ayrıca CA III ekspresyonu adipojeniz esnasında uyarılır ve yağ asidi biyosentezinin hız belirleyici basamağı olan asetil CoA karboksilaza HCO₃⁻ sağladığı düşünülmektedir (Frost, 2014).

Karbonik anhidraz ailesinin en az karakterize edilen üyelerinden biri olan CA VII, CA III' e benzer şekilde iki reaktif sistein içerir ve glutatyona bağlanabilir (Truppo vd., 2012). CA

VII ayrıca GABA_A reseptörlerine bağlı kanallar vasıtasıyla, iletme aracılık edebilen HCO₃⁻ iyonlarını sağladığından nöronal uyarım ile de ilişkilendirilmiştir (Thiry vd., 2007). Yapılan deneylerde CA VII' nin nöronal uyarılma ve nöbetlerde rol oynadığı gösterilmiştir (Ruusuvori vd., 2004).

İnsan CA XIII izoenzimi 2004 yılında tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Lehtonen vd., 2004). Normal döllenme sağlamak için üreme organlarında pH ve iyon dengesinin sıkı bir şekilde düzenlenmesi muhtemel olduğundan, CA XIII' ün, sperm hareketliliğinin korunması için optimum HCO₃⁻ konsantrasyonunu ve pH dengesini kontrol ederek üreme süreçlerine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, CA XIII' ün, servikal ve endometrial mukusu alkalinize etmek için uygun bikarbonat konsantrasyonunu üreterek de normal döllenme sürecine katkıda bulunabileceği varsayılmaktadır (Kummola vd., 2005).

HCO₃⁻ iyonlarının iç mitokondri membranından geçemediği kanıtlandıktan sonra, glukoneogenez yolundaki pirüvat karboksilaz ve üregenez yolundaki karbamoil fosfat sentetaz I için gerekli olan HCO₃⁻' in mitokondri içerisinde *de novo* sentezlenmesi gerektiği fikri ağır basmış ve bu hipotez mitokondriyal izoenzimler olan CA VA ve CA VB' nin keşfedilmesiyle sonuçlanmıştır (Frost, 2014). Daha sonraları yapılan çalışmalarda, bu iki izoenzimin antiobezite ilaçları için hedef olabilecekleri gösterilmiştir (Arechederra vd., 2013).

Bir salgı enzimi olan CA VI ise tükürük, süt ve gözyaşında (Frost, 2014) bulunur. Parkkila vd., (1995) tükürükteki CA VI salgısının sirkadiyen ritim ile değiştiğini, uyku esnasında düşük, kahvaltı esnasında ise yüksek olduğunu göstermiştir (Parkkila vd., 1995). Tükürük oral homeostazda kritik bir rol oynar ve düşük salınım oranları oral enfeksiyon ve diş çürüğü riskini artırır (Ship, 2003). Tükürük salgılarının tamponlama kapasitesi, birincil olarak bikarbonat iyonlarına bağlıdır ve diş minesini aşınmasına karşı koruma sağlar. Bazı çalışmalar CA VI' nin diş biyofilminde asit nötralizasyonundan sorumlu olduğunu göstermiştir (Frost, 2014).

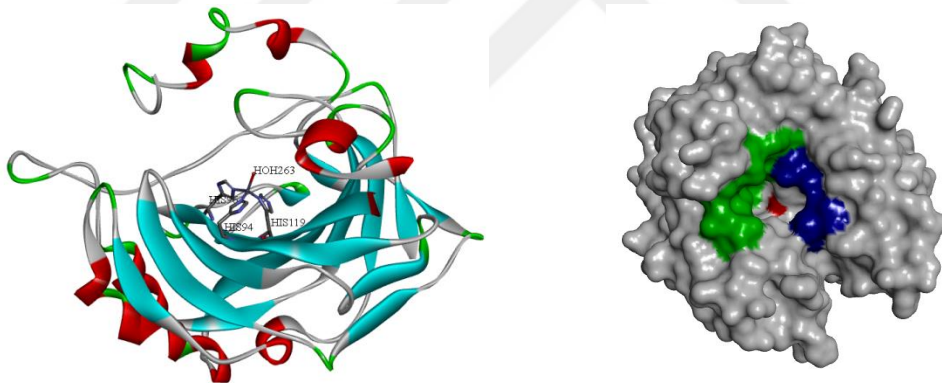
Membrana bağlı izoenzim olan CA IV, böbreklerden HCO₃⁻ iyonlarının geri emilmesinde rol oynar (Frost, 2014). CA II' ye benzer olarak CA IV de Cl⁻/ HCO₃⁻ taşıyıcıları ile etkileşir (Sterling vd., 2002). CA IV, ayrıca, Na⁺/bikarbonat yardımcı taşıyıcısı (NBC1) ile fonksiyonel bir kompleks oluşturur (Yang vd., 2005). Bu etkileşimin retina ve retinal pigment epiteli çevresinde uygun pH dengesini korumak için gerekli olduğu gösterilmiştir.

Membrana bağlı diğer iki izoenzim olan CA IX ve CA XII' den bölüm 2.3' de bahsedilmiştir.

CA XIV izoenzimi ise yüksek irtifada gözlenen kronik hipoksiye adaptif bir yanıt olarak kas ve eritrositlerin asit-baz dengesinde rol oynamaktadır (Juel vd., 2003). Diğer membrana bağlı CA' lar gibi CA XIV' de bikarbonat taşıyıcılarıyla etkileşir (Vargas ve Alvarez, 2012). Kalp kasında CA XIV' ün AE3 ile etkileştiği gösterilmiştir. Hipertansif farelerden alınan hipertrofik kalplerde, CA XIV ekspresyonunun AE aracılı bikarbonat taşıyıcısı ile birlikte arttığı gözlenmiştir. Bu durum AE3 hiperaktivitesinde CA XIV' ün bir rolü olduğunu göstermektedir (Frost, 2014).

2.2.2. Karbonik anhidraz enzimlerinin yapısı ve kataliz mekanizması

Bütün karbonik anhidraz izoformlarında aktif bölge, proteinin yüzeyinden merkezine uzanan, yaklaşık 12 Å genişlik ve 13 Å derinlikli geniş konik bir boşlukta bulunur (Alterio vd., 2012). Katalitik çinko iyonu bu boşluğun tabanında bulunur ve üç histidin kalıntısı (His94, His96, His119) ile bir su molekülü/hidroksit iyonu tarafından tetrahedral olarak koordine edilmiştir (Şekil 2.1) (D'Ambrosio vd., 2015).

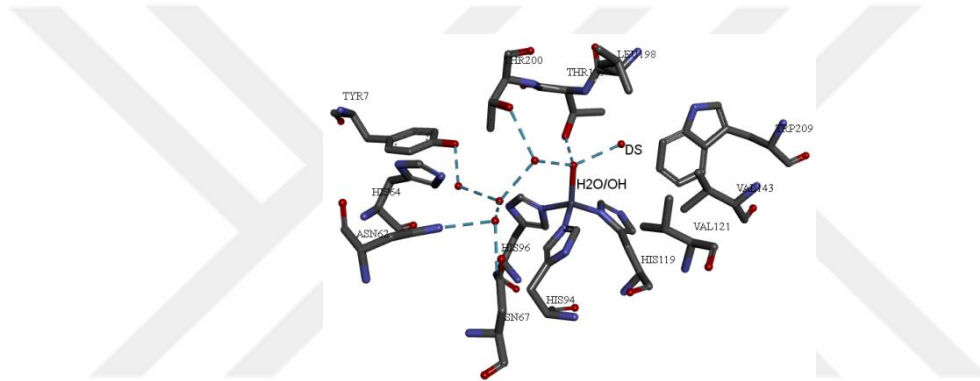


Şekil 2.1. hCA II izoenziminin yapısı (sol) ve aktif bölgesindeki hidrofobik (yeşil) ve hidrofilik (mavi) kısımlar (sağ). Zn²⁺ kırmızı ile gösterilmiştir. (PDB: 1CA2)

Zn²⁺ ye bağlı su molekülü/hidroksit iyonu, nükleofilikliğini artırmaya yardımcı olan bir hidrojen bağı ağında yer alır. Bu molekül/iyon, Thr199' un hidroksil grubuna ve birbirine karşı tarafta bulunan iki su molekülüne hidrojen bağı ile bağlanmıştır. Bunlardan ilki “derin su” olarak da adlandırılır ve hidrofobik bölgedeki Val121, Val143, Leu198 ve Trp209 tarafından çevrelenmiştir. İkinci su molekülü ise aktif bölgenin girişine doğru olan hidrofilik ortamda bulunur (Şekil 2.2) (Sjöblom vd., 2009). Tüm izoformlarda aktif bölge boşluğu iki farklı çevreye bölünmüştür. Bunlardan birincisi hidrofobik amino asitler olan Ile91, Val121, Phe131,

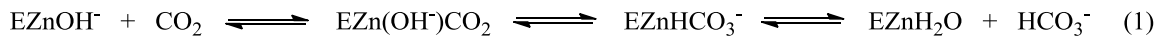
Val135, Leu141, Val143, Leu198, Pro202, Leu204, Val207 ve Trp209' dan, diğeri ise hidrofilik amino asitler olan Asn62, His64, Asn67 ve Gln92' den oluşur (Alterio vd., 2012) (Şekil 2.1).

Karakter olarak, birbirine zıt olan amino asitlerin, aynı aktif bölgenin iki yarısını oluşturmaları bir çok araştırmacı tarafından, CO_2 ' in HCO_3^- a katalitik olarak daha hızlı dönüştürülmesini sağladığı şeklinde yorumlanmıştır. Hidrofobik bölge, CO_2 substratını saptamak ve karbon atomunu çinko bağlı hidroksit tarafından yapılan nükleofilik saldırıya yönlendirmek için gerekliyken, hidrofilik bölge çinko bağlı su molekülünden çözücü ortamına proton transfer reaksiyonunu sağlayan, iyi organize olmuş hidrojen bağlı bir çözücü ağı oluşturur (Şekil 2.2) (Domsic vd., 2008).



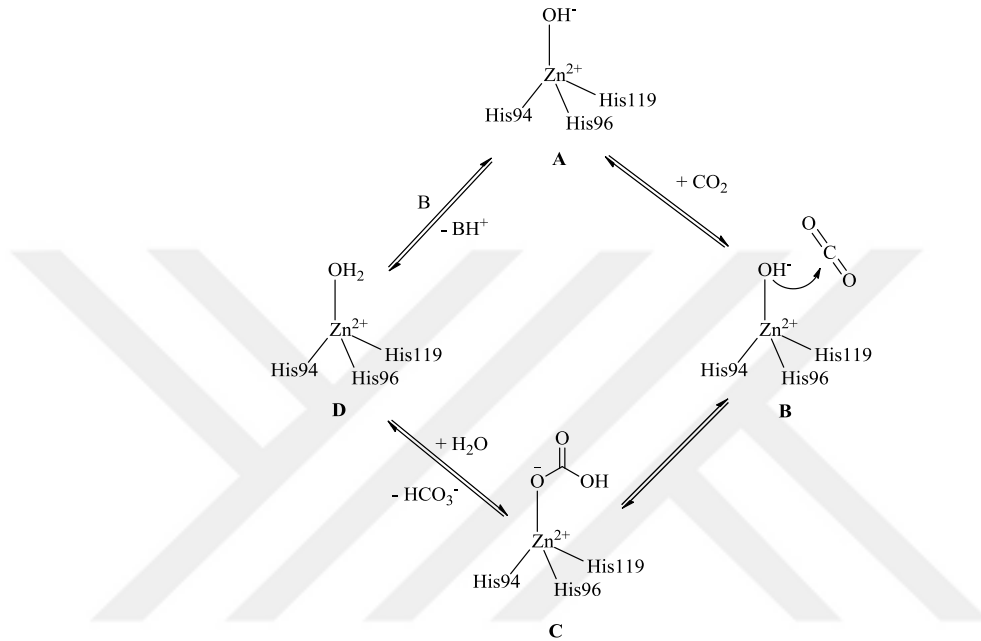
Şekil 2.2. hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki hidrojen bağı ağı. DS derin su olarak tanımlanmıştır (PDB: 1CA2).

CA' nın kinetiği ve katalitik mekanizması, hCA II model alınarak detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bununla birlikte bütün α -CA' ların aynı genel şema olan, Zn-OH^- in CO_2 ' e nükleofilik atak yapma yolunu izledikleri düşünülmektedir. Kataliz, iki basamaklı bir ping-pong mekanizması yoluyla gerçekleşir (Frost, 2014):



İlk basamakta çinkoya bağlı hidroksit iyonu (Şekil 2.3A) karbon dioksit molekülüne nükleofilik atak yapar (Şekil 2.3B) ve çinkoya koordine olmuş bikarbonat iyonunun oluşumuna yol açar (Şekil 2.3C). Çinkonun bikarbonat bağlı formu kararsızdır, dolayısıyla bikarbonat, ortamdaki su ile yer değiştirir ve ortama salınır. Bu esnada enzimin katalitik olarak inaktif

formu olan asidik formu oluşur (Şekil 2.3D). İkinci basamakta ise çinkoya bağlı su molekülünden ortama bir proton transfer reaksiyonu gerçekleşir ve enzim aktif formunu geri kazanır (Şekil 2.3A). Bu reaksiyonun ikinci basamağı hız belirleyici basamaktır (Mikulski ve Silverman, 2010).

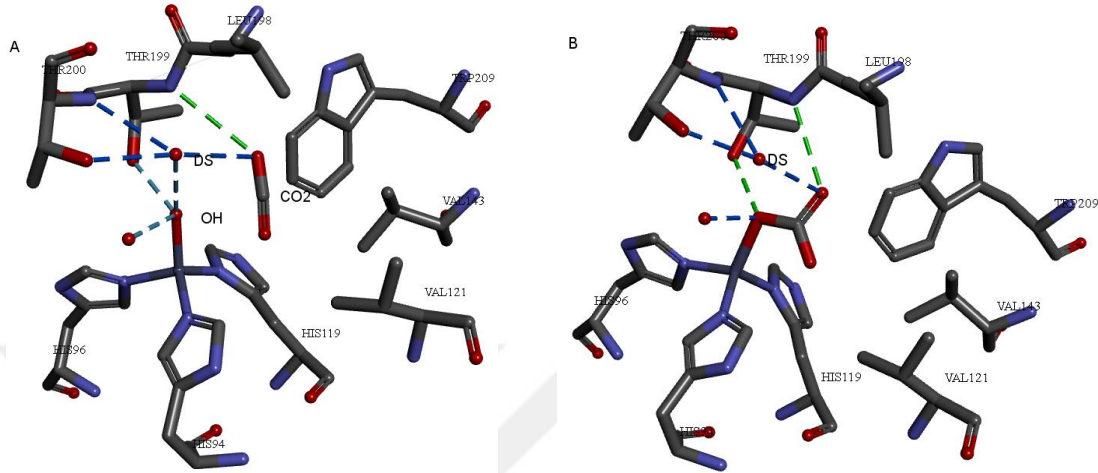


Şekil 2.3. Karbonik anhidraz enziminin kataliz mekanizması.

Kataliz reaksiyonunun ilk basamağı esnasında, substrat molekülü, Val121, Val143, Leu198 ve Trp209 ile sınırlandırılmış küçük bir hidrofobik boşluğa bağlıdır (Şekil 2.4A). Burada CO₂' in oksijen atomlarından biri, substrat bağlı olmadığı durumda “derin su” tarafından doldurulan pozisyonla hemen hemen aynı konumdadır (Şekil 2.2 ve 2.4A). Çinkoya bağlı hidroksitin karbon dioksit karbonuna nükleofilik atağını takiben oluşan HCO₃⁻, karbon dioksit ile aynı düzlemde bulunur ve çinkoya bağlandığı oksijen atomlarından birisi ile de Zn-OH⁻ yapısındaki tetrahedral koordinasyonu korur (Şekil 2.4B) (Sjöblom vd., 2009).

Hız belirleyici basamağın açıklanması için çeşitli araştırma grupları tarafından yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar, çinko bağlı su molekülünden dış ortama proton transfer reaksiyonuna yardımcı olmak için aktif bölgenin ortasında bulunan bir amino asit kalıntısının rolünü ortaya koymuştur. Bu kalıntı bir proton mekiği olarak rol oynar ve insan izoformlarının çoğunda bir His kalıntısı olarak bulunur (His64) (Alterio vd., 2012). His64' e ilaveten hız sınırlayıcı basamağı etkileyen ve çeşitli CA izoenzimlerinin katalitik etkinliğini belirleyen diğer yapısal özellikler de belirlenmiştir. Özellikle hCA II' de, çinkoya bağlı su molekülü ile His64' ü

birbirine bağlayan, düzenlenmiş su moleküllerinin oluşturduğu bir hidrojen bağı ağının varlığı kataliz sırasında proton transferinin iyi ayarlanmasını sağlar (Şekil 2.2) (Zheng vd., 2008).



Şekil 2.4. A: CO₂ molekülünün aktif bölge ile etkileşimi (PDB: 2VVA). B: HCO₃⁻ iyonunun aktif bölge ile etkileşimi (PDB: 2VVB).

2.2.3. Karbonik anhidraz inhibitörleri

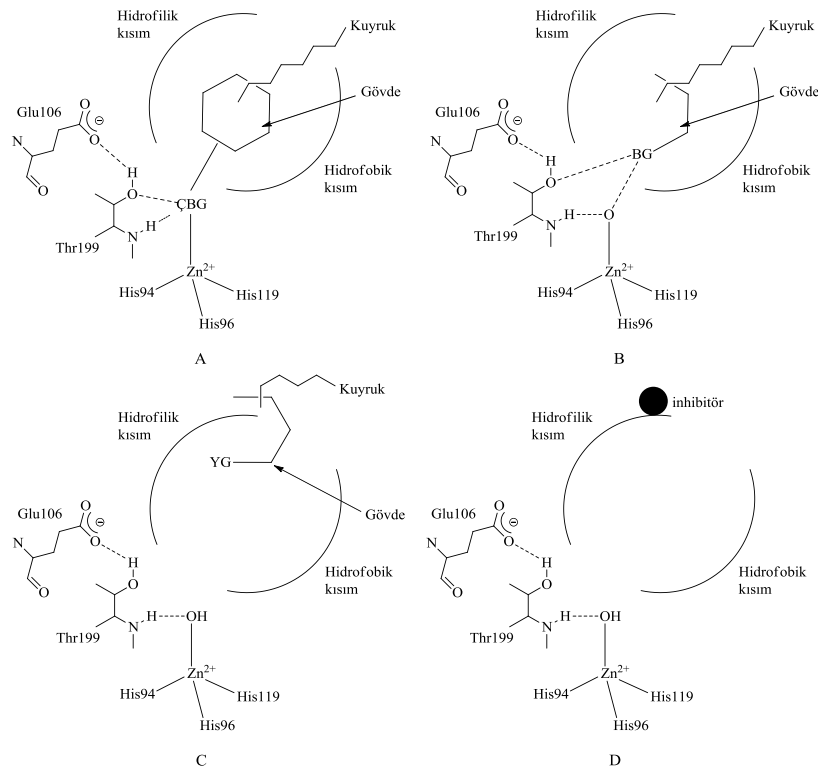
Karbonik anhidraz inhibitörlerinin birçok sınıfı, çinko bağlayıcı olarak hareket ederler (Şekil 2.5A). Klasik inhibitörler, çinko bağlayıcı (ÇBG) olarak SO₂NH⁻ grubu içeren sülfonamidler, sülfamatlar ve sülfamidlerdir (Supuran, 2008a; Neri ve Supuran, 2011; Supuran, 2012; Alterio vd., 2012). Bu gibi bileşikler, aktif bölgenin hidrofobik veya hidrofilik yarısı veya her ikisi ile etkileşime girebilen bir gövdenin yanı sıra, çeşitli CA izoformlarının en değişken bölgesi olan aktif bölge boşluğunun çıkışına da bağlanabilen kuyruk kısımları da bulundurulabilirler (De Simone vd., 2013; Supuran, 2016b). Metal iyonuna bağlanan diğer inhibitör sınıfları ise karboksilatlar (Mori vd., 2015), hidroksamatlar (Di Fiore vd., 2012), ditiyokarbamatlar ve izosterleridir (Carta vd., 2012).

Şekil 2.5B de gösterilen, ikinci CA inhibisyon mekanizması, metal iyonuna koordine olmuş su molekülü/hidroksit iyonu üzerine bağlanmadır. Bu inhibitörler metal iyonuna koordine olmuş nükleofile hidrojen bağı ile bağlanan ve α -sınıfı CA enzimlerinde komşu kalıntılar olan Thr199 ve Glu106 gibi kalıntılarla ilave hidrojen bağları yapabilen bir bağlayıcı grup (BG) bulundurulur. Bu inhibisyon mekanizmasına sahip olduğu belirlenen ilk inhibitör fenol olup (Supuran, 2016a), onu takiben poliaminler (Carta vd., 2010), esterler (Davis vd., 2011) ve sülfokumarinlerin (Tars vd., 2013) de aynı inhibisyon mekanizmasına göre hareket ettikleri

tespit edilmiştir. Çinko bağlayıcı inhibitörlerde olduğu gibi, bu inhibitörlerin gövdesi de, aktif bölge boşluğunun bir yarısı ile veya her iki yarısı ile etkileşebilir ve inhibitörlerin izoenzim seçicilik profilini arttıracak bir kuyruk bulundurabilir (Supuran, 2016b).

Bir diğer inhibitör sınıfı ise, metal iyonuna veya metal iyonuna koordine olmuş su molekülü/hidroksit iyonu üzerine bağlanmayan, aktif bölgenin girişindeki amino asitlerle etkileşerek aktif bölgeyi kapatan inhibitörlerdir (Şekil 2.5C). Bu bileşikler OH, amino veya COOH gibi yapışkan bir grup (YG) bulundururlar ve ilaveten diğer inhibitörlerdeki gibi bir gövde veya kuyruk da içerebilirler. Bu mekanizma kumarinler için keşfedilmiştir (Maresca vd., 2009). Daha sonra yapısal olarak benzer diğer bileşik sınıflarının da bu şekilde enzime bağlandığı gösterilmiştir (Touisni vd., 2011; Supuran, 2016a).

Dördüncü CA inhibisyon mekanizması ise X-ray kristalografisi çalışmaları sonucunda keşfedilmiştir (Şekil 2.5D) (D'Ambrosio vd., 2015). Bir benzoik asit türevi, aktif bölge boşluğunun dışında, aktif bölge girişine bitişik bir hidrofilik cebe bağlanmış olarak gözlemlenmiştir. İnhibisyon, tüm katalitik döngünün çökmesine yol açan proton mekik kalıntısının (His64) dış konformasyonunda bloke edilmesi ile gerçekleşir (D'Ambrosio vd., 2015).



Şekil 2.5. Karbonik anhidraz inhibisyon mekanizmaları (Supuran 2016a' dan uyarlanmıştır).

Karbonik anhidraz inhibitörleri önceleri diüretikler, antiglokom ajanları, antiepileptikler olarak ve yüksek irtifa hastalığının tedavisinde kullanılmışlardır. Günümüzde ise antiobezite ilaçları ve antitümör ilaçlar/tanı araçları olarak da klinik araştırmalara girmektedirler (Supuran, 2017). Çizelge 2.3' de ilaç hedefi olan ve hedef dışı olan çeşitli hCA izoformları belirtilmiştir.

Çizelge 2.3. Çeşitli hastalıklarda ilaç hedefi/hedef dışı olan hCA izoformları (Alterio vd., 2012).

İzoform	Dahil olduğu hastalık	Hedef dışı olan diğer hCA izoformları
CA I	retina/beyin ödemi	<i>Bilinmiyor</i>
CA II	glokom, ödem, epilepsi, yüksek irtifa hastalığı	CA I
CA III	oksidatif stress	<i>Bilinmiyor</i>
CA IV	glokom, pigmenter retinopati, felç	CA I
CA VA/VB	obezite	CA I, CA II
CA VI	karyojenez	CA II
CA VII	epilepsi	<i>Bilinmiyor</i>
CA VIII	nörodejenerasyon, kanser	<i>Bilinmiyor</i>
CA IX	kanser	CA I, CA II
CA XII	kanser, glokom	CA I, CA II
CA XIII	kısırlık	<i>Bilinmiyor</i>
CA XIV	epilepsi, retinopati	<i>Bilinmiyor</i>

2.3. Kanser İlişkili Karbonik Anhidraz İzoenzimleri: CA IX ve CA XII

2.3.1. Tarihçe

1990'ların başında, insan tümör hücrelerindeki viral kanser ilişkili proteinlerin tanımlanması üzerine yapılan ve uzunca süren bir araştırma beklenmedik bir şekilde CA IX'un keşfiyle sonuçlanmıştır. Başlangıçta bu enzimin HeLa hücrelerindeki bir ajan olan MaTu'nun endojen bir kısmı olduğu düşünülmüştür ve MN olarak adlandırılmıştır. Spesifik monoklonal antikor M75 tarafından tespit edilen MN antijeni, izole edilmiş ve onun moleküler karakterizasyonunu sağlayacak olan cDNA'sının sekans analizi yapılmıştır. Temel olarak, hücre dışı bölgesi dahil, yüksek oranda korunmuş CA domaini, Zn²⁺ bağlama kapasitesi ve CO₂ hidrasyonu gibi ortaya çıkan özelliklerden dolayı, (Şekil 2.6) MN proteini CA ailesinin yeni bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır (Pastorek vd., 1994). Daha sonra böbrek kanser hücrelerinde tespit edilen G250 antijeninin de bir MN/CA IX homologu olduğu kanıtlanmıştır (Grabmaier vd., 2000).

MN proteininin CA IX olarak tanımlanmasından önce, Zavada vd. (1993), pek çok insan karsinoması ile MN ifadenmesi arasında yakın bir ilişki bulunduğunu önermişler ve normal dokularda MN proteininin bulunmamasıyla önerilerini desteklemişlerdir. Daha sonraları

MN/CA IX'un tümör biyolojisindeki rolü ve tümör belirteci olarak kullanılabilirliği ile ilgili birçok soru ortaya çıkmıştır (Zavada vd., 1993).

1998 yılında, iki bağımsız araştırma grubu, CA XII'nin tümör ilişkili ikinci CA izoformu olduğunu tanımlamışlar ve karakterize etmişlerdir. Tureci vd. (1998), insan böbrek kanser hücrelerinde, CA XII molekülünü tespit etmişlerdir. Hücre dışı CA domaininin bilinen insan CA'ları ile %30–40 oranında benzer olduğu ve Zn^{2+} bağlayıcı kalıtlar içerdiği kanıtlanmıştır (Şekil 2.6). Northern blot, özellikle clear cell type (CCRCC) olan renal karsinomaların %10'unda CA XII transkriptinin aşırı ifadelendiğini ortaya çıkarmıştır (Tureci vd., 1998). Bu çalışmaya paralel olarak Ivanov vd. (1998), RNA diferansiyel görüntüleme tekniği kullanarak von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı proteini (pVHL) tarafından düzenlenen genleri çalışmışlar ve wild-type pVHL' nin CA12 ve CA9 genlerinin ifadenmesini güçlü bir şekilde inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (Ivanov vd., 1998).

CAH2_HUMAN	1	-----	0
CAH1_HUMAN	1	-----	0
CAH12_HUMAN	1	-----	0
CAH9_HUMAN	1	MAPLCPSPWLPPLLIAPAPAGLTVQLLLSLLLVPVHPQRLPRMQEDSPLGGGSSGEDDPL	60
CAH2_HUMAN	1	-----	0
CAH1_HUMAN	1	-----	0
CAH12_HUMAN	1	-----MPRRSLHAAAVLLLVILKEQPS	22
CAH9_HUMAN	61	GEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPVVKPKSEEEGSLKLEDLPIVEAPG	120
CAH2_HUMAN	1	-----MSHHWGKGRHNGPEHHKDFEIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSL	44
CAH1_HUMAN	1	-----MASPDWGGDDKNGPEQNSKLYPIANGNNSPVDIKTSETKHDTSL	45
CAH12_HUMAN	23	-----SPAPVNGSKWTTFGPDGENSENSKKYPSGGLLQSEIDLHSDILQYDASL	71
CAH9_HUMAN	121	DPQEPQNAHRDKEGDDQSHWRKNG---GDPPNPRVSEACAGRFQSEVDIRPQLAAFCPAL	177
		* * * * *	
CAH2_HUMAN	45	KPLSVS-YDQA--TSLRILNNGHAFNVEFDDSQDKAVLKGGLDGTVRLIQPFHFWGSL-	100
CAH1_HUMAN	46	KPLSVS-YNPA--TAKEIINVGHSFVNVEDNDNRSVLKGPPFSDSRLFPFHFHWGST-	101
CAH12_HUMAN	72	TPLEFQGYLSANKQFLTNNGHNSVKLNLPSPDM----HIQGLQSRYSATQLHLEHWGNPN	126
CAH9_HUMAN	178	RPDELLGFQLPPLPELRLRNNGHNSVQLTTPGLEMAL---GPGREYRALQLHLEHWGAA-	232
		* : . . : : * * * : : : .	
CAH2_HUMAN	101	DGQSEHTVDKPKYAELHVVHWNT-KYGFGRVQCPDGLAVLGIPLKVGSA-APGLQK	158
CAH1_HUMAN	102	NEHSEHTVDGKYSAEELVAHWNSAKYSSLAEPASKADGLAVIGVLMKVGAE-ANPKLQK	160
CAH12_HUMAN	127	DPHSEHTVSGHFPAEELHIVYNSDLYPDASTASNKSEGLAVLAVLIEMGSA-FNPSYDK	185
CAH9_HUMAN	233	GRPSEHTVSGHRFPAEIIVVHLST-AFARVDEALGRPGGLAVLAALFEEGPEENSAYEQ	291
		. ***** : : * * * : * : : * : * * * * : : : * : : : *	
CAH2_HUMAN	159	VVDVLDISKTKGKSADEFNFDPRGLLES-LDYWTTPGSLTTPELLECVTIIVLKEPTISV	217
CAH1_HUMAN	161	VLDALQAIKTKGRAPFTNEDPSTLLPSS-LDFWTTPGSLTTPHPLYESTIIVLCKRESISV	219
CAH12_HUMAN	186	IFSHLQHVYKQQAEPVPGFNIEELLEPERTAEYRNRGSLTTPPCNPTVLTIVVFNPNVQI	245
CAH9_HUMAN	292	LLSRLEEIAEEGSETQVPGLDISALLPSSDFSRVQFEGSLTTPPCAQGVIIWTFVNTQVML	351
		:: . . * : : * : : : : * * * . : : * * * * * * * * * * : : : : *	
CAH2_HUMAN	218	SSEQVLKFRKLNFGEG--EPEELVDNWRPAQPLKNRQIKASFK-----	260
CAH1_HUMAN	220	SSEQLAQFRSLLSNVEG--DNAVPMQHNRPTQPLKGRIVTRASF-----	261
CAH12_HUMAN	246	SQEQLLALETALYCTHMDPSPREMNNFRQVQKEDERLVYTSFSQV-----	292
CAH9_HUMAN	352	SAKQLHTLSDTLWG----PGDSRLQLNFRATQPLNGRVIEASFAPAGVDSSPRAAEPVQL	406
		* : * : : : : * * * * * : : * * * : : * : * * *	
CAH2_HUMAN	261	-----	260
CAH1_HUMAN	262	-----	261
CAH12_HUMAN	293	QVCTAAGLSLGIILSLALAGILGICIVVVVSIWLFRRKSIKRGDNKGVIIYKPATRMETEA	352
CAH9_HUMAN	407	NSCLAAGDILALVFGLEF---A---VTSVAFLVQMRRQRRGRTKGGVSYRPAEVAETGA	459

Şekil 2.6. CA I, II, IX ve XII izoenzimlerinin amino asit sekanslarının kıyaslaması. (Gri: benzer amino asitler, pembe: sinyal peptidi, mor: metal bağlayıcı amino asitler, turuncu: glikozilasyon bölgesi, sarı: transmembran dizisi)

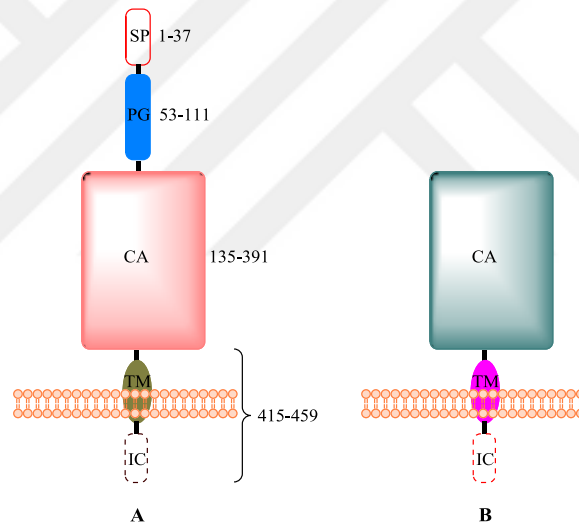
2.3.2. CA IX ve CA XII'nin yapısı

CA IX, hücre dışı domain (ECD), tek yönlü geçişi olan transmembran bölgesi (TM) ve hücre içi uzantıdan (IC) oluşan, hücre membranına gömülü bir glikoproteindir. Hücre dışı kısım N-terminal sinyal peptidi, proteoglikan benzeri kısım (PG) ve katalitik domainden (CA) oluşur (Şekil 2.7A) (Pastorek vd., 1994).

CA IX, monomerik formda, 58/54 kDa ağırlığında bir proteindir, ancak fizyolojik şartlarda 153 kDa ağırlığında bir trimer oluşturduğu ileri sürülmüştür (Pastorekova vd., 1992). Son zamanlarda yapılan karakterizasyon, iki monomerin membranın aynı yönünde bulunması ile CA IX'un bir dimer oluşturabileceğini göstermiştir (Alterio vd., 2009). Molekül içi ve moleküller arası etkileşimler, CA domainindeki molekül içi bağa katkı sağlayan Cys156, Cys336 ile Cys174 olmak üzere üç sistein ve moleküller arası etkileşime katkı sağlayan, transmembran bağlanma bölgesine yakın bir sistein (Cys409) arasındaki disülfür bağları aracılığıyla olur (Hilvo vd., 2008). Baculovirüs de üretilen CA IX'un CA domaininin son zamanlarda yayınlanan kristal yapısı iki CA domaininin kararlı bir dimer oluşturmak üzere moleküller arası tekli disülfür bağı ile birleştiğini göstermiştir (Alterio vd., 2009). Glikozillenmiş dimerin 54/58 kDa'luk her bir proteininin toplam CA IX'un %90'mı oluşturduğu ve böylece enzimin katalitik aktivitesinin çoğunluğunu bünyesinde barındırdığı MDA-MB-231 göğüs kanser hücrelerindeki dimerlerde görülmüştür (Li vd., 2011). CA IX, PG domaininin Thr115 üzerindeki O-glikozilasyon bölgesi ve CA domaininin Asn346 üzerindeki N-glikozilasyon bölgesi olmak üzere en az iki glikozilasyon bölgesi içerir (Hilvo vd., 2008).

CA domaininin pH düzenlenmesindeki ana fonksiyonu, tümörün yaşamasını sağlamak ve metastaz potansiyelini artırmak için hücre dışı pH değerinin (pH_e) asidifikasyonu aracılığı ile hücre içi pH'sını (pH_i) nötral-zayıf alkali değerde tutmasıdır (Swietach vd., 2007). CA domaini ile N-terminal PG bölgesini bağlayan ilave sekans bir keratan sülfat glukozaminoglikan zinciri olarak nitelendirilir. Bu bölge, CA IX'un ekstraselüler matriksteki bileşenlerle etkileşimine aracılık eder (Hilvo vd., 2008). PG domaini hücreler arası iletişimi sağlar ve hücre adezyonu ile hücre yayılmasında görev alır (Zavada vd., 2000; Zavadova ve Zavada, 2005). PG bölgesi, negatif yüklü amino asitlerce zengin olup, CA domaininde bulunan pozitif yüklü amino asitlerle etkileşebilir ve bu etkileşim aracılığıyla, substratın aktif bölgeye erişimini kontrol edebilir veya asidik pH da enzimin katalitik fonksiyonunu destekler (Innocenti vd., 2009). Diğer CA ların PG bölgesi içermemesi, CA IX'un M75 tarafından seçici olarak tespit edilmesini mümkün kılar (Zavada vd., 2000). IC uzantısı CA IX enzimatik aktivitesini ve sinyalizasyonunu kontrol eden Thr443, Ser448 ve Tyr449 dan oluşan üç fosforilasyon bölgesi bulundurur. Thr443 ün protein

kinaz A (PKA) tarafından fosforilasyonu ve Ser448 in defosforilasyonu, CA IX'un enzimatik aktivitesi için gereklidir (Ditte vd., 2011). Tyr449, fosfatidilinositol-3 kinaz/Akt kinaz (PI-3K/Akt) tarafından takip edilen, epidermal büyüme faktörü/epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGF/EGFR) aracılı sinyal iletimine katılır (Dorai vd., 2005). IC uzantısının CA IX'un plazma membranına doğru yerleşimi ve taşınım olayında rol oynadığı görülmüştür. Ayrıca, IC uzantısında bulunan temel amino asitlerdeki mutasyonlar, ekstraselüler asidifikasyon, inhibitör bağlama ve hücre deadezyon kapasitesi gibi özelliklerin engellenmesi ile sonuçlanmıştır (Hulikova vd., 2009). Dahası tam uzunluktaki CA IX'un, hipoksi koşulları ile birlikte artan nükleer translokasyona uğradığı ve IC uzantısındaki Thr443 ile Tyr449 kalıntılarının fosforilasyonunun TNPO1 importin ve XPO1 exportin gibi nükleositolplazmik geçişleri sağlayan proteinlerle etkileşimi artırdığı kanıtlanmıştır (Buanne vd., 2013).



Şekil 2.7. CA IX (A) ve CA XII (B) yapılarının şematik gösterimi.

CA XII, 40/45 kDa ağırlığında, N-terminal CA domaini, α -sarmal TM bölgesi ve kısa IC uzantısı bulunduran, ancak PG bölgesi bulundurmayan membrana gömülü bir proteindir (Şekil 2.7B). Enzimin aktif bölgesi hücre dışında olup, Asn52 ve Asn136 üzerinde iki glikozilasyon bölgesi bulunduran bir dimer oluşturur. Glikozilasyon, dimerizasyon veya kristal paketlenmesini etkilemez (Whittington vd., 2001). IC domaini, Ser ve Thr üzerinde potansiyel fosforilasyon bölgeleri içerir ve bu bölgelerin fosforilasyonu enzimin yapısı, aktivitesi ve sinyal yolları üzerinde etkili olabilir (Tureci vd., 1998). CA XII, ayrıca, tekli disülfür bağı oluşturan Cys23 ve Cys203 kalıntılarını da içerir. TM bölgesinin GXXXG ve GXXXS amino asit sekans

motifleri muhtemelen dimer oluşumuna katkı sağlamaktadır (Whittington vd., 2001). Daha detaylı moleküler karakterizasyon, 1,55 Å çözünürlükte X-ışını kristal yöntemleri ile rekombinant enzimin yüksek çözünürlüklü, üç boyutlu yapısının belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kristal yapı karakterizasyonu, iki CA XII domaininin, bir eşdeğer dimer oluşturmak üzere birleştiğini göstermiştir. Dimer ara yüzeyi enzimin optimum işlevi için her monomerin aktif bölgesi tamamen açıkta olacak şekilde konumlandırılmıştır (Waheed ve Sly, 2017). Ayrıca CA XII aktif bölgesinin yapısı CA II ve CA IV'e çok benzerdir. Katalitik proton mekiği olan His64 CA XII'de de korunmuştur (Waheed ve Sly, 2017).

2.3.3. CA IX ve CA XII'nin doku dağılımları ve hücre içi yerleşimleri

Fizyolojik koşullar altında CA IX ifadenmesi, sindirim sistemi epitelinin bazolateral membranları içerisinde sınırlanmıştır. Gastrik epitelini oluşturan bütün ana hücre tiplerinde CA IX antijeni bulunmuştur. Güçlü CA IX boyama sinyali özellikle yüksek proliferatif aktiviteli hücreleri olan on iki parmak bağırsağı ve ince bağırsağın üst kısımlarının kriptom enterositleri başta olmak üzere bağırsağın çeşitli kısımlarında da görülmüştür. Bu durum CA IX'un hücre çoğalması ve farklılaşmasındaki olası rolünü göstermektedir. Öte yandan, ince bağırsağın alt kısmı, kör bağırsak ve kör bağırsak ile kalın bağırsak arasında kalan kısmın girintilerinde zayıf boyama sinyali tespit edilmiştir. Gastrointestinal kanalın baş-kuyruk eksenine boyunca immün reaksiyon zayıflar ve CA IX-negatif olan rektumda maksimum düzeye ulaşır. Bazolateral yüzeylerinde CA IX bulunduran diğer epitel hücreler safra kesesi ve safra kanalında bulunur (Ondriskova vd., 2015). CA IX' un doğal olarak ifadelenmediği diğer dokular ise over, testis ve iskelet sisteminin özelleşmiş hücreleri, saç foliküllerinin bazal hücreleri ve merkezi sinir sisteminin bazı kısımları olarak sıralanabilir (Ivanov vd., 2001).

Normal CA IX fonksiyonunu açıklamak için CA IX kodlayan genden yoksun (*CAR^{0/0}*) fareler üretilmiştir. CA IX' un eliminasyonu mukus üreten hücrelerin aşırı çoğalmasından kaynaklı mide hiperplazisi ile sonuçlanmıştır. Ayrıca ana hücrelerin sayısı azalırken, paryetal hücrelerin sayısı artmıştır. Yine de CA IX eksikliği olan fareler düzenli HCl salgısını, uygun asidik luminal pH'ını, asit-baz dengesini ve plazma elektrolitlerinin değerlerini dahi korumayı başarmıştır. Bu sonuçlar; hücre çoğalmasının kontrolünde, göç ve farklılaşmanın etkilenmesinde ve böylece mide mukoza dokusunun korunmasında CA IX' un etkili olduğunu göstermiştir (Gut vd., 2002).

CA IX, ilk olarak, rahim ağzı kanseri hücrelerinde (HeLa) tespit edilmiştir. Daha sonraları böbrek, kolon, akciğer, meme, beyin, yemek borusu, pankreas, vulva, over, karaciğer, baş, boyun vb. dokuların iyi huylu ve kötü huylu katı tümörlerinde bu enzimin aşırı miktarda

ifadelenmediği bulunmuştur. Fizyolojik antijen bulunduran dokularda, onkogenik dönüşüm, ilerleyen tümör evrelerine doğru CA IX seviyesini düşürür (Ondrskova vd., 2015). İlginç bir şekilde, yalnızca kanser hücrelerinin değil göğüs kanseri, kolorektal kanser, akciğer adenokarsinoma, baş ve boyun skuamöz hücre karsinoması ve ağız boşluğu skuamöz hücre karsinomasındaki tümör ilişkili stromal hücrelerin de CA IX ifadelediği tespit edilmiştir (Brockton vd., 2012). Dahası, Fiaschi vd. (2013), neoplazma ve bağlı stoma arasındaki karşılıklı ilişkileri daha detaylı incelemişler ve tümör hücreleriyle etkileşim halindeki kanser ilişkili fibroblastlarda CA IX ifadenmesinin güçlü bir şekilde arttığını belirtmişlerdir (Fiaschi vd., 2013).

CA IX'un kanser ilişkili ifadenme artışı ektoptiktir. Çünkü CA IX ifadeleyen tümörler, genellikle, başlangıçta CA IX-negatif olan dokulardan türerler. HeLa hücreleri ve normal gastrik epitel hücrelerinden izole edilen CA9 cDNA nükleotitlerinin karşılaştırmalı analizi, mutasyonların olmadığı durumlarda CA IX ifadenmesinin tümör oluşumu esnasında aktive edilen sinyal yolları ile oldukça ilişkili olduğunu göstermiştir (Ondrskova vd., 2015).

CA IX, ağırlıklı olarak plazma membranında bulunur, ancak asetone fiksasyonu ve takiben yapılan boyama işlemi, enzimin olgunlaşmamış hücre içi formunun nükleer/perinükleer bölgede de sinyal verdiğini göstermiştir (Pastorekova vd., 1992). Ancak sitoplazmik yerleşim, aktifleşmiş hücre içine yönelimin bir sonucu olabilir, çünkü pek çok hücre reseptörü gibi CA IX'un endositoz sürecine katıldığı kanıtlanmıştır (Zatovicova ve Pastorekova, 2013). Bu, sadece miktarın düzenlenmesi için değil, aynı zamanda düzenleyici proteinlerin partnerleri veya substratları ile çok yakın ilişki içinde olabildiği endozomlardan gelen sinyal için de geçerlidir (Joffre vd., 2011). Svastova vd. (2003), MDCK-polarize epitel hücrelerinde CA IX endositozunun, E-cadherin endositozu eşliğinde hipoksik koşullar altında hücreler arası temas dengesizleşmesine neden olduğunu önermişlerdir (Svastova vd., 2003). Bu durum doğal bir ligandın varlığını gösterebilir, çünkü VII/20 ve G250 antibadileri CA IX katalitik domaininde endositozu başlatabilecek bir epitopa yönlendirilirler (Zatovicova vd., 2010). İlginç bir şekilde veziküller ile çevrili CA IX molekülleri hücre yüzeyine geri dönebilir veya çekirdeğe taşınabilir. TNPO1 importin ve XPO1 eksportin, hipoksi esnasında CA IX proteininin çekirdeğe taşınımına aracılık ederler (Buanne vd., 2013). CA IX, ayrıca, ektodomaininin hücre dışı boşluğa salınması şeklinde bir kesilmeye de maruz kalır. Bu durum CA IX bolluğunun, dağılımının veya fonksiyonunun bir düzenleyicisi olarak görülmektedir (Zatovicova ve Pastorekova, 2013). CA IX'un hücrenin farklı kısımlarına yerleşmesi ve hücre dışı kısmının hücreler arası boşluğa salınabilmesi özellikle tümör gelişimi konusunda bu enzimin birden fazla fonksiyonu olduğunu göstermektedir (Ondrskova vd., 2015).

CA IX' un aksine CA XII kalın bağırsak, böbrek, prostat, rektum, yemek borusu, beyin, pankreas, over, testis, ter bezleri ve meme epiteli gibi çeşitli sağlıklı dokularda da yüksek oranda ifadelenir. Genellikle, CA IX ve CA XII' nin ifade dizileri farklıdır ve çok az örtüşürler (Ivanov vd., 2001). Kalın bağırsak, endometriyal epitel, meme ve böbrek hücreleri yüksek oranda CA XII bulundurduğu halde, aynı dokularda CA IX ifadelenmemektedir (Karhumaa vd., 2000).

Kalın bağırsağın her kısmı önemli bir CA XII boyama sinyali verir. CA XII, enterositlerin bazolateral membranları içerisinde bulunmaktadır. Bu durum su emiliminde CA XII' nin fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir (Kivela vd., 2000). CA XII ayrıca rahmin lümen ve salgı epitelinde bulunur ve salgı bezinin iç kısımlarında yüksek oranda ifadelenir. Boyama işlemleri, rahimde de CA XII' nin bazolateral membranda bulunduğunu göstermiştir. Rahim çevresinin alkali olması sperm hareketliliği için önemli olduğundan, CA XII pH' ı uygun değerde tutarak üremede rol oynuyor olabilir (Karhumaa vd., 2000). Wykoff vd. (2001), CA XII' nin göğsün lobular ve ductal epitelinde de bulunduğunu rapor etmişlerdir (Wykoff vd., 2001). Böbrekte korteks, distal kıvrımlı tübüllerin epitel hücrelerinde tespit edilen, en güçlü CA XII ekspresyonu olan kısımdır. İmmün reaksiyon en çok kalın bağırsak, rahim ve meme gibi dokuların epitel hücrelerinin bazolateral plazma membranlarında belirgindir (Ondriskova vd., 2015).

CA IX ve CA XII, kanallardan transepitelyal iyon taşınımı ve su taşınımına katkı sağlayan erkek efferent kanallarının epitel hücrelerinin bazolateral plazma membranlarında da bulunur. Dahası, CA XII ve daha az bir ölçüde CA IX, sıvı geri emilimi ile fonksiyonel ilişkisi olan akuaporin-1 (AQP-1) ile aynı hücrelerde ifade edilir (Ondriskova vd., 2015). Bir başka çalışmada, her iki proteinin de normal insan pankreasında, özellikle de asinar ve duktal epitel hücrelerinin bazolateral plazma membranında gelişigüzel olarak ifade edildiği ortaya çıkmıştır. CA XII boyaması asinar hücrelerinde çok güçlü sinyal vermiştir, ancak duktal epitel hücrelerinden zayıf sinyal alınmıştır. CA IX asinar hücrelerinde seyrek olarak ifadelenirken duktal adenokarsinoma durumunda belirgin bir şekilde üretilir. İlginç bir şekilde tüm müsinöz kistadenokarsinomlarda zayıf ila kuvvetli immün boyama görülmüştür. Ayrıca müsinöz kistadenomlar yüksek miktarda CA IX proteini bulundururlar. Öte yandan birçok pankreas karsinomunda CA XII ifadelenmesi çok düşük veya düşük seviyededir (Kivela vd., 2000).

Pek çok kanser hücre hattı ve normal dokuların kıyaslanması üzerine yapılan kapsamlı çalışmalar over, rahim ağzı, meme ve CCRCC gibi bazı tümörlerde CA XII ifadelenmesinin arttığını kanıtlamıştır. Bu tümörler çoğunlukla CA XII bulandıran sağlıklı dokulardan meydana

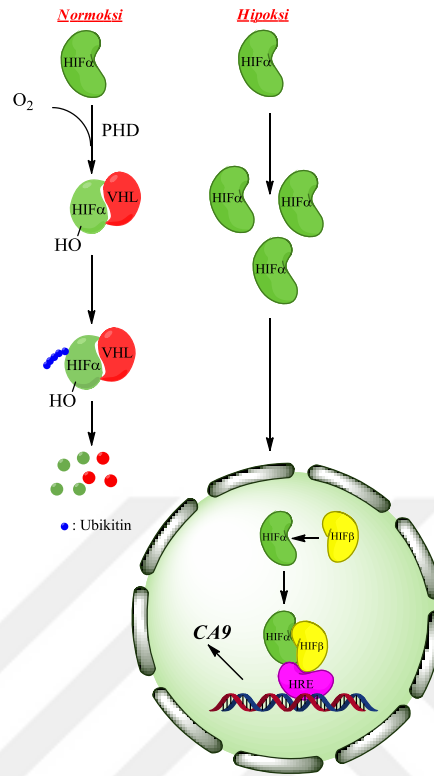
gelirler (Ivanov vd., 2001). Proescholdt vd. (2005), başlıca glioblastomalar olmak üzere gerçek ve metastatik beyin tümörlerinde CA XII ekspresyonunun arttığını tespit etmişlerdir (Proescholdt vd., 2005). Haapasalo vd. (2008), CA XII mRNA' sının astrositik gliomalar ve normal beyin dokusunda iki farklı versiyonunu çalışmışlar ve normal beyin dokusunda her iki izoform için zayıf sinyal gözlemişler, ancak astrositoma türlerinde ise daha kısa CA XII versiyonunun ifadelendiğini tespit etmişlerdir. İmmünohistokimya çalışmaları, CA XII proteininin çoğunlukla diffüz astrositomalarda bu kesilmiş mRNA izoformu tarafından kodlandığını doğrulamıştır (Haapasalo vd., 2008).

2.3.4. CA IX ekspresyonunun düzenlenmesi

CA9 geni 9. kromozomun kısa kolunda bulunan, yaklaşık 11 kb uzunlukta ve 11 eksondan oluşan bir genidir. 5' bölgeye yakın olan CA9 promotörü hipoksi yanıt elemanı (HRE) ve PR1-PR5 olmak üzere altı adet *cis* düzenleyici bölge bulundurur (Ondriskova vd., 2015). *In silico* analizlerle ilave *cis* elementleri tespit edilmiştir, ancak bunların CA9 transkripsiyonuna katkılarının olup olmadığı henüz bilinmemektedir. HRE, HIF transkripsiyon faktörü tarafından tanımlanmış bir çekirdek TACGTG konsensüs dizisi içerir. Bu bölge çok kritiktir, ancak CA9 geninin tam transkripsiyonel aktivasyonu için yetersizdir ve çevredeki diğer sekanslarla bir işbirliği gerektirir (Wykoff vd., 2000).

2.3.5. CA9 transkripsiyonunun düzenlenmesi: HIF yolu

HIF transkripsiyon faktörü, hücrelerin hipoksiye transkripsiyonel yanıtlarının anahtar rolündeki düzenleyicisidir. Bu faktör, hipoksik kanser hücrelerinin transkripsiyonel profilini, tümör mikro ortamında stresli koşullarda hayatta kalmalarını sağlamak için önemli ölçüde değiştirir (Harris, 2002). CA IX, CA9 geninin aktivasyonuna yol açan HIF yolu ile birlikte bu uyumun önemli bir bileşenidir (Wykoff vd., 2000) (Şekil 2.8). HIF heterodimeri temel olarak aktif β alt birimi ve oksijene bağlı α alt biriminden oluşur. HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α olmak üzere üç α alt birimi vardır (Huang ve Bunn, 2003). HIF-1 α CA9 ekspresyonunun en çok bilinen düzenleyicisidir (Wykoff vd., 2000). Normoksida HIF- α 'nın O₂'ne bağlı yıkım domainindeki iki prolinin prolil hidroksilazlar (PHD) tarafından hidroksilasyonu HIF- α 'nın pVHL bağımlı poliubikitinasyonuna ve proteozomda yıkımına neden olur. Hipoksida PHD'nin inaktivasyonu HIF- α 'nın kararlılığı ile sonuçlanır. Ayrıca HIF-1'i inhibe eden asparajinil hidroksilaz faktörü (FIH-1) HIF- α C-ucu aktivasyon domainindeki asparajinlerin hidroksilasyonuna neden olur. Böylece normoksik koşullar altında HIF- α 'nın transkripsiyonel koaktivatörler olan p300/CBP ile etkileşimini önler. FIH-1'in inaktivasyonu HIF- α 'nın transkripsiyonel aktivasyonuna neden olur (Schofield ve Ratcliffe, 2005).



Şekil 2.8. Hipoksinin CA IX ekspresyonu üzerine etkisi (Ondriskova vd., 2015' den uyarlanmıştır).

2.3.6. Diğer düzenleyici yollar

CA9 geni transkripsiyonu, hipoksi ile HIF'ye bağlı bir şekilde yüksek oranda indüklenebilir. Ancak bu genin tümörlerdeki dağılımı HIF-1 α , glukoz taşıyıcı 1 (GLUT1) veya vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi diğer hipoksik markörlerin dağılımıyla her zaman bağlantılı değildir. Bu, CA IX ve HIF-1 α 'nın ekspresyon kinetiği, salgılanması ve posttranslasyonel kararlılığı, hipoksik stresin şiddeti veya sinyal yollarının ve diğer faktörlerin etkileri arasındaki farklılıkları yansıtır (Rafajova vd., 2004).

HIF-1, CA9 transkripsiyonu için çok önemli olduğundan, hipoksiye ilave olarak CA9 transkripsiyonunu kontrol eden alternatif yolların büyük çoğunluğu, bu faktörün stabilizasyonuna veya aktivasyonuna yol açar. HIF-1 düzenlenmesi yoluyla CA9 ekspresyonunu etkileyen hipoksik olmayan faktörler veya yollar tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu (Hock vd., 2002), PI-3K yolunun veya MAPK yolunun katılımıyla yoğun normoksik kültürlerde hafif perisellüler hipoksi (Kopacek vd., 2005), HIF-1 α aktivasyonu ile pozitif olarak bağlantılı olan

azot oksit (NO) veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi (Dewhirst vd., 2008) ve hücre dışı asidoz gibi diğer mikroçevresel faktörlerdir (Rafajova vd., 2004).

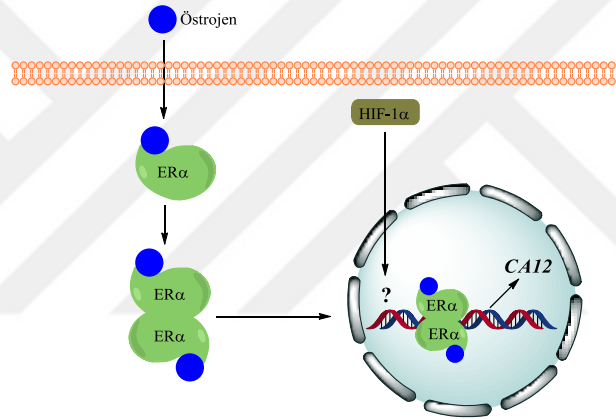
Hipoksiye ilaveten diğer mikroçevresel şartlar CA9 düzenlenmesine katkı sağlar. Bunlar arasında asidoz, glukoz yoksunluğu veya yüksek laktat konsantrasyonu sayılabilir. Asidoz hipoksiden ayrı veya hipoksiyle birlikte tümör hücreleri üzerinde etkili olabilir. AP1 ve SP1 gibi CA9 düzenlenmesinde rol alan transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlama kapasiteleri pH bağımlıdır, ayrıca düşük pH HIF- α 'nın birikimini tetikler (Mekhail vd., 2004). Glioblastoma multiforme'den türeyen hücrelerde asidoz (pH 6,4) hipoksiden bağımsız olarak CA IX ekspresyonunu artırmaktadır (Ondriskova vd., 2015). Asidoza sebep olan düşük bikarbonat (22,3 mM) seviyesi ve ilaveten düşük glukoz seviyesi (1 g/L) HeLa hücrelerinde hipoksik CA9 indüksiyonunda yardımcı etki gösterir. Ancak normoksik CA9 indüksiyonunda bu durum gözlenmez (Rafajova vd., 2004). Hücre türüne özgü asidozun etkilerinin gözlemlendiği çok sayıda örnek mevcuttur (Ondriskova vd., 2015).

Glikolitik metabolizmanın son ürünleri olan pirüvat ve laktat normoksik koşullarda bile HIF-1a'yı stabilize edebilir. Böylece PHD'nin aktif bölgesi ile etkileşerek CA9 genini de içeren HIF-1 uyarılabilir gen ekspresyonunu aktive eder. Sonuç olarak oksijene bağlı protein yıkımı inhibe edilmiş olur (Ondriskova vd., 2015).

2.3.7. CA XII ekspresyonunun düzenlenmesi

CA12 geni kromozom 15 üzerinde bulunur ve bu genin ekspresyonu da pVHL tarafından düzenlenir (Tureci vd., 1998). Buna ilaveten hipoksi, wild-type pVHL ile birlikte tümör hücrelerinin geniş bir spektrumunda CA XII'yi uyarabilir (Ivanov vd., 2001). Bir başka çalışmada zayıf oranda farklılaşmış meme kanser hücre hattı östrojen negatif reseptörde (ER-negatif) CA12'nin hipoksik uyarımı gösterilmiştir. Buna karşılık iyi oranda farklılaşmış ER pozitif hücrelerde oksijene bakılmaksızın CA12 seviyesinin yüksek oranda kaldığı görülmüştür. Ayrıca meme duktal karsinoma in situ doku örneklerinde (DCIS), invaziv meme karsinomunda, lobuler meme karsinomunda veya beyin gliomlarında CA XII ekspresyonunun yüksek olduğu ve düşük dereceli olgularda homojen olduğu, ancak yüksek dereceli tümörlerde ekspresyonun azaldığı ve CA XII'nin nekroza komşu bölgelere lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Özetle lezyonların derecesi ve farklılaşmaya bağlı faktörlerin gösterdiği hücrel farklılaşma durumu daha derin etkilere sahip olmakla birlikte, hipoksinin CA12 ekspresyonunun başlıca düzenleyicisi olmadığı doğrulanmıştır, ancak yüksek dereceli tümörlerdeki indüksiyonunu yalnızca lokal olarak etkilediği düşünülmektedir (Wykoff vd., 2001).

ER α meme kanserlerinin yaklaşık %70'inde ifadelenen, nükleer reseptörler ailesine ait olan bir transkripsiyon faktörüdür (Rosenfeld vd., 2006). *CA12* ER α pozitif tümörlerde güçlü bir şekilde uyarılır ve *CA12*'nin ekspresyonu düşük dereceli tümörler, daha düşük tekrar oranları ve daha iyi hasta sağkalımı ile ilişkilidir (Wykoff vd., 2001). Böyle pozitif bir ilişkiyi CA IX göstermezken CA XII göstermektedir. ER α , *CA12* geninin yaklaşık 6 kb yukarısındaki artırıcıya bağlanarak hormon uyarımı şeklinde meme kanseri hücrelerindeki *CA12* geninin ekspresyonunu büyük ölçüde artırır (Şekil 2.9). Hormon ile etkileşim RNA polimeraz II' nin transkripsiyon başlangıç bölgesinde ve yardımcı düzenleyicilerin artırıcı bölgede birikmesini uyarır ve transkripsiyonu başlatmak için promotörden itibaren artırıcı ve diğer bölgeler boyunca geniş H4 asetilasyonuna neden olur (Ondriskova vd., 2015).



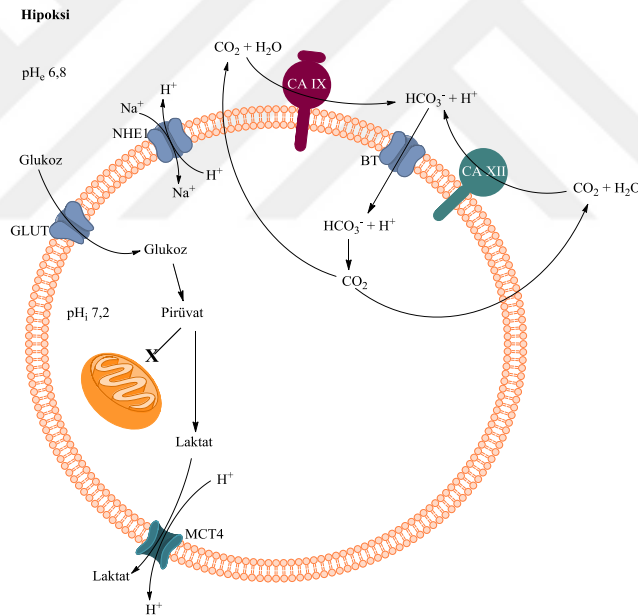
Şekil 2.9. CA XII ekspresyonunun düzenlenmesi (Ondriskova vd., 2015' den uyarlanmıştır).

CA XII' nin hipoksik olarak düzenlenmesi hala cevaplanmayı bekleyen bir sorudur. İlaveten *CA12*'nin hipoksik düzenlenmesini gösterecek hiçbir HRE elemanı transkripsiyon başlama bölgesinin yakınına yerleşmemiştir. *CA12* geninin üst bölgesi ortak HIF bağlanma dizisi olan birkaç varsayımsal HRE elementine sahiptir fakat fonksiyonları doğrulanmamıştır (Ondriskova vd., 2015).

2.3.8. CA IX ve CA XII' nin tümör biyolojisindeki rolü

Hipoksik bölgelerdeki katı tümörlerin karakteristik bir özelliği olan asidik mikro çevre, tümör invazyonu ile ilişkilidir ve antikanser tedaviyi olumsuz etkiler. Birçok tümör hücresinin hipoksi sırasında enerji metabolizmasını oluşturan artan glikoliz, laktik asit birikimine ve hücre dışı pH'ın (pH_e) asidifikasyonuna neden olur (Gatenby ve Gillies, 2004). Bununla birlikte glikoliz eksikliği bulunan kanser hücreleriyle yapılan deneyler asidozla ilgili

başka bir kaynak olan CO_2 'i açığa çıkarmıştır (Helmlinger vd., 2002). İnsan ve kemirgen katı tümörlerindeki mikroelettrot pH_e ölçümleri normal dokulara (7,4-7,5) kıyasla daha asidik değerler (6,8-7,0) göstermiştir. Öte yandan pH_i 'nin ^{31}P NMR ölçümleri sağlıklı ve kanserli dokular arasında sadece ihmal edilebilir farklılıklar (6,9-7,2) göstermiştir (Ondriskova vd., 2015). Tümör hücreleri, mikro çevre asidozuna karşı daha dirençlidirler ve onu tolere edebilirler, ancak sitoplazmik pH dengesi, tümör hücrelerinin yaşaması ve çoğalması için kritiktir. Dolayısıyla, hücre içi fizyolojik pH'ın hipoksik ve asidik koşullar altında korunması, yüksek seviyedeki iyon taşıyıcılarının yanı sıra monokarboksilat taşıyıcısını (MCT) ve Na^+/H^+ değiştiricisini (NHE) de içeren hassas bir düzenleme gerektirir. Öte yandan dışardan HCO_3^- alımı ve pH_i tamponlanması $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anyon değiştirici (AE) ve $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ yardımcı taşıyıcısı (NBC) aracılığıyla olur (Parks vd., 2011). MCT4, AE2, NHE1, CA IX ve CA XII kodlayan genler ise pVHL/HIF-1 yolunun kontrolü altındadır (Şekil 2.10) (Wykoff vd., 2000).



Şekil 2.10. CA IX ve CA XII'nin kanser hücre pH'sının düzenlenmesindeki rolü (Ondriskova vd., 2015' den uyarlanmıştır).

Hücre dışı boşluğa bakan bir enzimatik aktif bölgesi bulunan membrana bağlı CA IX, proton ile birlikte HCO_3^- üreten CO_2 ' in hidratasyonunu katalize eder. Bu enzimin aktivitesi, yüksek bikarbonat konsantrasyonu ile inhibe edilmektedir. Bikarbonat iyonları plazma membranından geçemezler ve hücre içerisine taşınım için AE veya NBC gibi bikarbonat taşıyıcılarına (BT) ihtiyaç duyarlar. Glikolitik metabolizma esnasında hücre içi protonları tüketen HCO_3^- sitoplazmayı gaz halinde terk eden yeni bir CO_2 molekülünün oluşmasına neden

olur. Böylece CA IX HCO_3^- üreterek pH_i nötralizasyonuna katkıda bulunur ve dolayısıyla tümör yaşamını ve gelişimini destekler. Öte yandan CA IX, proton üretimi ve hızlandırılmış CO_2 difüzyonu ile hücre dışı asidifikasyona, dolayısıyla tümör saldırganlığına katkı sağlar (Ondriskova vd., 2015).

Kanser hücre hareketliliği ve invazyonunu içeren pek çok biyolojik süreç için etkili pH düzenlemesi gereklidir (Stock ve Schwab, 2009). CA IX bikarbonat taşınım metabolonu oluşturmak ve böylece göçü artırmak için AE2 ve NBCe1 ile etkileşir. Katalitik bölgenin çıkarılması kadar enzim aktivitesinin inhibisyonu da hücre göç aktivitesini bozar (Svastova vd., 2012). Çeşitli göç/invazyon testleri, doksisiklin tetiklemeli shRNA CA9 susturma veya CA IX aşırı ekspresyonunu takiben, CA IX' un farklı kanser hücre hatlarında hareketli fenotipi düzenleme kabiliyetini doğrulamıştır (Shin vd., 2011). Hipoksi, CA IX ekspresyonunu olduğu kadar katalitik performansını da uyarır, üstelik bu enzim laktatla dolu mikro çevrede de verimli çalışabilmektedir (Wykoff vd., 2000). CA IX' un hipoksik aktivasyonunun arkasındaki mekanizma, bu enzimi Thr443' de fosforile eden PKA' nın artışına yol açan yüksek cAMP derecesidir (Ditte vd., 2011).

Basolateral membran yerleşiminin tespit edilmesi CA IX' un hücre adezyonu ve hücreler arası iletişimdeki rolü hakkındaki önerileri desteklemiştir (Pastorekova vd., 1992). Zavada vd. (2000), CA IX' u bir hücre adezyon molekülü (CAM) olarak çalışmışlardır. İmmobilize edilmiş tam uzunluktaki CA IX proteini canlı hücreleri yakalayabilme kapasitesi gösterirken TM ve IC bölgelerinin bulunmadığı kesilmiş versiyonu bunu başaramamıştır (Zavada vd., 2000).

CA IX-pozitif hücreler PG-bağımlı bir şekilde artmış bir adezyon ve yayılma oranı gösterirler, çünkü M75 ile PG' nin silinmesi CA IX' un bu etkisini bozar. Yayılmakta olan hücrelerde CA IX, hücre bağlanmasının ilk evresinden tamamen yayılmış morfoloji elde edilene kadar adezyon proteini paksillin ile birlikte yerleştiği odaksal temaslarda bulunur. Dahası CA9 susturma, daha uzun süre korunan yuvarlak hücre morfolojisine göre yapışmanın ve yayılmanın azalmasına neden olur. Tümör gelişimi bağlamında CA IX, hücre adezyonunun artırılması ve yayılma yoluyla sekonder lezyonların ilk kurulması sırasında kanser hücrelerine avantaj sağlayabilir. İlginç bir şekilde göç eden hücrelerde CA IX-pozitif ve CA IX-negatif bölgelere bölünmüş lamellipodia'nın detaylı analizi, CA IX ve paksillin'in hızla dönen ve çıkıntılı zarin ileriye doğru hareket ettirilmesi için geçici kuvvetler uygulayan küçük, yeni oluşan temas noktaları bulunan yerlere lokalize olduğunu, oysa CA IX-serbest bölgelerin, substrata pasif bağlantılar olarak hizmet eden daha uzun, daha olgun paksillin adezyonları gösterdiğini açığa

çıkarmıştır. CA IX yeni oluşan temas noktalarının hızla gelişmesini teşvik eder, böylece hücre dışı ortamın asitlendirilmesi başlangıç yapışma hızına katkıda bulunduğundan, muhtemelen enzim aktivitesi ile göç hızını artırır (Ondriskova vd., 2015).

CA XII'nin tümör biyolojisindeki rolünü belirten çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birisi, CA XII eksikliğinin CA IX varlığında tümör büyümesini etkileyemediğini, ancak CA IX baskılamasının antitümör etkisini artırabileceğini göstermiştir. Araştırmacılar insan kalın bağırsak kanser hücre hattı LS174Tr de CA9 susturulmasının yükselen CA XII mRNA ve protein ekspresyonuna yol açtığını bulmuşlardır. Aynı etki bağımsız bir çalışmada bir diğer kalın bağırsak kanser hücre hattı HT29' un üç boyutlu sferoidlerinde ve ksenograftlarında da gözlenmiştir. Ancak CA12 susturulmasının CA IX miktarına etkisi tespit edilememiştir. İlaveten bu olgunun başka birçok tümör hücresi türünde gözlenmediğine dikkat etmek gereklidir (Ondriskova vd., 2015).

2.3.9. CA IX ve CA XII hedefli tedavi

CA IX' u hedef alan iki ana strateji geliştirilmiştir. Bunlardan ilki CA IX' un enzim aktivitesini baskılayabilen ve böylece pH düzenleyici kapasitesini bozabilen inhibitörlerdir, ikincisi ise antikörlerin kullanıldığı tekniklerdir (Ondriskova vd., 2015).

CA IX inhibitörleri; inorganik anyonlar (Vullo vd., 2003), sülfonamidler ve türevleri olan sülfamatlar, sülfamidler vb. (Supuran, 2008a), fenoller (Innocenti vd., 2008), kumarinler (Maresca vd., 2009) ve protein tirozin kinaz (PTK) inhibitörleri (Parkkila vd., 2009) olmak üzere birkaç ana sınıfa ayrılabilir. Yüksek CA afinitesi, kolay sentezi, kararlılığı ve düşük toksisitesi nedeniyle sülfonamidler ve biyoesterleri olan sülfamatlar ve sülfamidler araştırmaların merkezinde kalan en yaygın CA inhibitörleridir. Yüksek inhibitör aktivitesi olan ancak tümör ilişkili CA enzimlerine karşı seçiciliği olmayan pek çok molekül geliştirilmiştir. Bu moleküllerin CA IX ve/veya CA XII ye karşı seçiciliklerini artırmak için; aktif bölgenin girişine bağlanan yan zincirlerin eklenmesiyle fiziksel ve kimyasal özelliklerin düzenlenmesi, membran geçirmezliğinin artırılması, boyut ve yüzey topolojisinin değiştirilmesi, etkinliğin artırılması veya hipoksi-aktifleştirilmiş inhibitörlerin geliştirilmesi gibi değişiklikler yapılmıştır (Ondriskova vd., 2015).

Zayıf membran geçirgenliği ve membrana gömülü CA' lar için üstün olmasına göre karakterize edilen inhibitörler; pozitif yüklü aromatik ve heterosiklik sülfonamidleri (Monti vd., 2013), hipoksi koşullarında seçici olarak CA IX' a bağlanan ve inhibe eden floresan sülfonamidleri (Cecchi vd., 2005), içe geçişi önlemek için yüklü fluorofor veya albumin

bağlayıcı kısma kovalent olarak bağlanmayan asetazolamit türevlerini (Ahlskog vd., 2009), üreid-süstitüe sülfonamitleri (Pacchiano vd., 2011), kumarinleri ve tiyokumarinleri (Maresca vd., 2009) kapsamaktadır.

In vitro ve in vivo çalışmalar CA IX inhibisyonunun primer tümör gelişiminin baskılanmasında olduğu kadar metastazların gerilemesinde de etkili olduğunu ortaya koymuştur. Buna örnek olarak CA IX-pozitif primer tümörlerin spesifik olarak inhibe edilmesinde floresan sülfonamitlerin etkinliğini gösteren, oldukça metastatik fare meme kanser hücrelerinden türetilen tümörlerde yapılan *in vivo* çalışmalar verilebilir (Ondriskova vd., 2015).

CA IX inhibisyonunun geleneksel kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğini de artırdığı bulunmuştur. Membrana gömülü CA' lar üzerinde yüksek afiniteye sahip olan indansülfonamit inhibitörü hücre kültüründe hipoksik CA IX aktivitesi göstermiş, hücre çoğalmasını azaltmış ve apoptozu artırmıştır. Eşzamanlı olarak, *in vivo* kolorektal tümör büyümesini yavaşlatmış ve ışın tedavisi ile kombinasyonu büyüme gecikmesinde daha fazla etkinlik sağlamıştır (Dubois vd., 2011).

Tümörlerle doğrudan ilişkisi daha az olmasına rağmen CA XII de antikanser tedavi için bir hedef olarak çalışılmıştır. Fare T lenfoma modeli ve insan T-hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoblastik lenfoma (T-ALL/LL) örneklerinde miktarı artacak şekilde düzenlendiği gösterilmiştir. Bu enzimin S-glikozitler tarafından farmakolojik olarak bloke edilmesi, hücre çoğalması ve canlılığını *in vitro ve in vivo* olarak düşürmüştür ve bu nedenle T-ALL/LL hastaları için yeni bir tedavi stratejisi oluşturacağı öngörülmüştür (Lounnas vd., 2013).

Antikorları kullanan ikinci yaklaşımda ise antibadi bağımlı hücre sitotoksitesini uyaran Mab' leri (monoklonal antibadi) kullanma fikri CCRCC hastalarında çalışılmıştır. Ancak Bağımsız Veri İzleme Komitesi plaseboya kıyasla iyileşme gözlemlenmediği için araştırmanın sonlandırılmasını istemiştir (Ondriskova vd., 2015).

3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

5-sülfosalisilik asit, 2-aminopiridin türevleri, proton transfer tuzları ve metal komplekslerinin CA izoenzimlerine etkisi üzerine yapılan çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Bayram vd. (2008), salisilik asit türevlerinin insan sitozolik CA I ve CA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerine etkilerini incelemişler ve 5-sülfosalisilik asit bileşiğinin milimolar seviyesinde inhibisyon potansiyeline sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bileşiğin esteraz IC₅₀ değerleri hCA I için 0,42 mM, hCA II için 0,29 mM olarak bulunmuş, K_i değerleri ise hCA I için 0,77 mM, hCA II için 1,92 mM olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada hCA I' in yarışmalı olarak inhibe edildiği, hCA II' nin ise yarışmasız olarak inhibe edildiği belirtilmiştir (Bayram vd., 2008).

Yenikaya vd. (2011a), 5-sülfosalisilik asit ile 2-amino-6-metilpiridin'in tepkimesinden bir proton transfer tuzu elde etmişler ve bu tuzun Cu(II) kompleksini hazırlamışlardır. Ayrıca tuzun ve kompleksin hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Proton transfer tuzunun; enzimin CO₂ hidrasyon (hidrataz) aktivitesi üzerindeki IC₅₀ değerleri hCA I için 0,40 µM, hCA II için 0,25 µM, esteraz aktivitesi üzerindeki IC₅₀ değerleri hCA I için 0,70 µM, hCA II için 0,50 µM, K_i değerleri ise hCA I için 0,34 µM, hCA II için 0,27 µM olarak bulunmuştur. Cu(II) kompleksinin; hidrataz aktivitesi üzerindeki IC₅₀ değerleri hCA I için 0,15 µM, hCA II için 0,27 µM, esteraz aktivitesi üzerindeki IC₅₀ değerleri hCA I için 0,20 µM, hCA II için 0,30 µM, K_i değerleri ise hCA I için 0,13 µM, hCA II için ise 0,08 µM olarak ölçülmüştür (Yenikaya vd., 2011a).

Ayvaz vd. (2013), ise 2-amino-3-siyanopiridin türevlerini sentezlemişler ve hCA I ile hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Bileşiklerin esteraz IC₅₀ değerlerini hCA I için 33,0-55,0 µM aralığında, hCA II için 56,0-99,0 µM aralığında bulmuşlardır. K_i değerlerini ise hCA I için 23,8-58,5 µM aralığında, hCA II için 41,0-182,0 µM aralığında bulmuşlardır. Ayrıca tüm bileşiklerin yarışmalı inhibisyon mekanizmasını izlediklerini belirlemişlerdir (Ayvaz vd., 2013).

Diaz vd. (2016), 5-amino-2-sülfonamit-1,3,4-tiyadiazol bileşiğinin sülfonat tuzlarını sentezlemişler ve bu bileşiklerin hCA I, II, IV, VII, IX ve XII izoenzimlerinin CO₂ hidrasyon aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemişler ve K_i değerlerini hCA I için 3400-8300 nM aralığında, hCA II için 320-327 nM aralığında, hCA IV için 2740-3630 nM aralığında, hCA VII

için 1980-4225 nM aralığında, hCA IX için 255-570 nM aralığında ve hCA XII için 570 nM olarak belirlemişlerdir (Diaz vd., 2016).

Alkaya vd. (2017), 2-amino-6-sülfamoilbenzotiyazol ve 2,6-piridindikarboksilik asit kullanarak bir proton transfer tuzu hazırlamışlar ve bu tuzun Fe(III), Co(II) ve Ni(II) komplekslerini sentezlemişlerdir. Bileşiklerin hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri üzerindeki etkilerini de incelemişler ve hidrataz IC₅₀ değerlerini hCA I için 0,397-4,075 µM aralığında, hCA II için 0,212-1,998 µM aralığında, esteraz IC₅₀ değerlerini hCA I için 0,066-0,409 µM aralığında, hCA II için 0,041-0,189 µM aralığında bulmuşlardır. K_i değerlerini ise hCA I için 0,028-0,192 µM aralığında, hCA II için 0,013-0,101 µM aralığında bulmuşlardır (Alkaya vd., 2017).

Yenikaya vd. (2016), (E)-4-okso-4-(4-sülfamoilfenilamino)büt-2-enoik asit ile 2-aminopiridin ve 1H-benzimidazol bileşiklerinin reaksiyonundan iki proton transfer tuzu hazırlamışlar ve bu tuzların Cu(II) komplekslerini sentezlemişlerdir. 2-aminopiridin proton transfer tuzundan sentezlenen Cu(II) kompleksinin CA inhibisyon potansiyelinin, 1H-benzimidazol proton transfer tuzundan sentezlenen Cu(II) kompleksinin CA inhibisyon potansiyeline göre yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. 2-aminopiridin proton transfer tuzundan sentezlenen Cu(II) kompleksinin hCA I ve hCA II için hidrataz IC₅₀ değerleri sırasıyla 21,76 ve 18,44 µM, esteraz IC₅₀ değerleri 0,80 ve 0,25 µM ve K_i değerleri 0,30 ve 0,12 µM olarak bulunmuştur (Yenikaya vd., 2016).

İlkimen vd. (2015), 2-amino-6-klorobenzotiyazol ve piridin-2,6-dikarboksilik asit bileşiklerinden bir proton transfer tuzu ve bu tuzun Fe(III), Co(II), Ni(II) ve Cu(II) komplekslerini sentezlemişlerdir. Bileşiklerin sitozolik CA' lar olan hCA I ve hCA II üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişler ve hidrataz aktivitesinin inhibe edilmediğini, buna karşılık esteraz aktivitesinin milimolar düzeyinde inhibe edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca proton transfer tuzunun başlangıç maddesi olan 2-amino-6-klorobenzotiyazol bileşiğinden daha güçlü bir inhibitör, metal komplekslerinin ise proton transfer tuzundan yaklaşık üç-dört kat daha güçlü inhibitörler olduğunu tespit etmişlerdir. Bileşiklerin esteraz IC₅₀ değerlerinin hCA I için 0,160-0,760 mM aralığında, hCA II için 0,140-0,740 mM aralığında olduğu bildirilmiştir (İlkimen vd., 2015). Bir başka çalışmada ise 2-amino-6-metoksibenzotiyazol ile 2,6-piridindikarboksilik asit proton transfer tuzu hazırlanmış ve Fe(II), Co(II), Ni(II) ve Cu(II) kompleksleri sentezlenmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmaya benzer şekilde hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitelerinin milimolar seviyesinde inhibe edildiği görülmektedir. Proton tuzunun ve metal komplekslerinin inhibisyon potansiyelinin başlangıç maddelerinden yüksek olduğu görülmüştür.

Bileşiklerin esteraz IC₅₀ değerlerinin hCA I için 0,193-0,512 mM aralığında, hCA II için ise 0,174-0,493 mM aralığında olduğu belirlenmiştir (İlkimen vd., 2014a). Benzer bir çalışmada 2-aminobenzotiyazol ile dipikolinik asit proton transfer tuzu sentezlenmiş, daha sonra bu tuzun Fe(II), Co(II), Ni(II) ve Cu(II) kompleksleri elde edilmiştir. Bu çalışmada başlangıç bileşiği olan 2-aminobenzotiyazol inhibisyon etkisi göstermezken proton transfer tuzu ve metal kompleksleri inhibisyon etkisi göstermiştir. Bileşiklerin esteraz IC₅₀ değerleri hCA I için 0,241-0,746 mM, hCA II için 0,221-0,674 aralığında bulunmuştur (İlkimen vd., 2014b). 2-amino-6-metilbenzotiyazol ile piridin-2,6-dikarboksilik asit proton transfer tuzunun ve bu tuzun Fe(III), Fe(II), Co(II), Ni(II) ve Cu(II) komplekslerinin hazırlandığı ve hCA I ve hCA II üzerindeki etkilerinin incelendiği benzer bir çalışmada enzimlerin esteraz aktivitelerinin inhibe edildiği belirlenmiştir. Üstelik metal kompleksleri başlangıç maddesi olan 2-amino-6-metilbenzotiyazol'den yaklaşık altı kat daha güçlü inhibisyon etkisi göstermiştir. Bileşiklerin esteraz IC₅₀ değerleri hCA I için 0,147-0,600 mM, hCA II için 0,128-0,564 mM aralığında bulunmuştur (İlkimen vd., 2013).

Yenikaya vd. (2011b), 2,4-diklor-5-sülfamoilbenzoik asit ile etilendiamin ve 2,4-diklor-5-sülfamoilbenzoik asit ile 2-amino-3-metilpiridin bileşiklerinin proton transfer tuzlarını hazırlamışlar ve hCA I ile hCA II üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Etilendiamin ve 2-amino-3-metilpiridin inhibisyon etkisi göstermezken diğer bileşikler CA izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktivitelerini inhibe etmişlerdir. Bileşiklerin hidrataz IC₅₀ değerleri hCA I için 0,150-0,320 µM, hCA II için 0,060-0,150 µM arasında, esteraz IC₅₀ değerleri hCA I için 0,130-0,800 µM, hCA II için 0,100-0,140 µM arasında, K_i değerleri ise hCA I için 0,137-0,990 µM, hCA II için 0,075-0,157 arasında bulunmuştur (Yenikaya vd., 2011b). Başka bir çalışmada ise 2,4-dikloro-5-sülfamoilbenzoik asit ile 2-amino-3-metilpiridin bileşiklerinden proton transfer tuzu hazırlanmış ve bu tuzun Zn(II) kompleksi sentezlenmiştir. Elde edilen tuz ve kompleks hCA I ve hCA II'nin hidrataz ve esteraz aktivitelerini inhibe etmiştir. Metal kompleksinin hCA I ve hCA II hidrataz IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,130 ve 0,150 µM, esteraz IC₅₀ değerleri 0,045 ve 0,230 µM ve K_i değerleri ise 0,058 ve 0,240 µM olarak bulunmuştur (Yenikaya vd., 2010).

Büyükkıdan vd. (2017), etil 1-(3-nitrofenil)-5-fenil-3-((5-sülfamoil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)karbamoyl)-1H-pirazol-4-karboksilat bileşiğinin Ni(II), Cu(II) ve Zn(II) komplekslerini sentezlemişler ve bu bileşiklerin hCA I ve hCA II üzerine etkisini incelemişlerdir. Sentezlenen bileşikler enzimlerin hidrataz ve esteraz aktivitesini inhibe etmişlerdir. Hidrataz IC₅₀ değerleri hCA I için 0,052-2,400 µM aralığında, hCA II için 0,034-0,900 µM aralığında, esteraz IC₅₀ değerleri hCA I için 0,082-2,800 µM aralığında, hCA II için 0,019-5,600 µM aralığında, K_i

değerleri hCA I için 0,146-1,100 μM aralığında, hCA II için 0,072-5,300 μM aralığında bulunmuştur (Büyükkıdan vd., 2017).

Özdemir vd. (2017), metansülfonik asit hidrazid, etansülfonik asit hidrazid, propansülfonik asit hidrazid ve bütansülfonik asit hidrazid bileşiklerinin Ag(I) komplekslerini sentezlemişler ve bu bileşiklerin hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Bileşiklerin K_i değerlerinin $1,47 \times 10^{-4}$ - $1,88 \times 10^{-4}$ M aralığında olduğu belirlenmiştir (Özdemir vd., 2017).

Qurrat-ul-Ain vd. (2017), çeşitli hidrazid türevlerini ve bunların Pd(II) komplekslerini sentezlemişler ve bu bileşiklerin CA II üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Bileşiklerin esteraz IC_{50} değerlerinin 10,80 μM ile >500 μM arasında değiştiğini rapor etmişlerdir (Qurrat-ul-Ain vd., 2017).

Özbek vd. (2017), 2-hidroksiasetofenon-*N*-metil *p*-toluensülfonilhidrazon bileşiğinin Co(II), Pd(II) ve Pt(II) komplekslerini sentezlemişler ve hCA II üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemişlerdir. Çalışmada komplekslerin esteraz IC_{50} değerlerinin $2,54 \times 10^{-2}$ mM- $3,56 \times 10^{-2}$ mM arasında olduğu belirlenmiştir (Özbek vd., 2017).

Çağlar vd. (2016), 2-piridinetanol ve 2-piridinpropanol ile diklofenak karışık ligantlarını içeren Co(II), Ni(II) ve Cu(II) komplekslerini sentezlemişler ve bu bileşiklerin hCA I ve hCA II esteraz aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Komplekslerin K_i değerlerinin hCA I için 1,52-55,06 μM aralığında, hCA II için 0,23-5,61 μM aralığında olduğu belirlenmiştir (Çağlar vd., 2016).

Kaya vd. (2015), 3,4-dimetoksibenzoat ve nikotinamid karışık ligandlı Cu(II) kompleksini sentezlemişler ve hCA I ile hCA II esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Kompleksin hCA I ve hCA II için K_i değeri 0,35 mM olarak bildirilmiştir (Kaya vd., 2015).

Özdemir vd. (2014), *N*'-asetil bütan sülfonik asit hidrazid bileşiğinin Cu(II) kompleksini sentezleyerek hCA II esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Sentezlenen kompleksin IC_{50} değeri $1,85 \times 10^{-4}$ M, K_i değeri $1,48 \times 10^{-4}$ M olarak belirlenmiştir (Özdemir vd., 2014).

Alyar ve Adem, (2014), salisilaldehit-*N*-metil-*p*-toluensülfonilhidrazon bileşiğinin Pd(II) ve Co(II) komplekslerini sentezlemişlerdir. Komplekslerin hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktivitesi üzerindeki etkilerini de incelemişlerdir. Hidrataz IC_{50} değerleri hCA I için sırasıyla 9,6 ve 82,6 μM , hCA II için 1,5 ve 13,0 μM , esteraz IC_{50}

değerleri hCA I için sırasıyla 69,0 ve 402,0 μM , hCA II için 25,0 ve 130,0 μM , K_i değerleri hCA I için sırasıyla 2,32 ve 13,49 μM ve hCA II için 0,044 ve 0,230 μM olarak bulunmuştur (Alyar ve Adem, 2014).

Çağlar vd. (2014), 3-pikolin ve 1-(2-aminoetil)pirolidin varlığında diklofenak bileşiğinin Co(II) ve Ni(II) komplekslerini sentezlemişler ve bu bileşiklerin hCA I üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Komplekslerin IC_{50} değerlerinin 0,223-0,391 mM arasında ve K_i değerlerinin 0,173-0,340 arasında olduğu bildirilmiştir (Çağlar vd., 2014).

Takashima vd. (2013), yaptıkları bir çalışmada 2,2'-bipiridin (bpy) ve 4'-metil-2,2'-bipiridinil-4-karboksilik asit (2-{2-[(4-sülfamoilbenzoilamino) etoksi]etoksi}etil) amit (bpybs) ligantlarını kullanarak $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpybs})]^{2+}$ kompleksini sentezlemişler ve CA üzerindeki inhibisyon etkisini incelemişlerdir. Bileşiğin K_i değeri 1,9 μM olarak bulunmuştur (Takashima vd., 2013).

Büyükkıdan vd. (2013), 4-benzoil-1,5-difenil-*N*-(5-sülfamoil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-1*H* pirazol-3-karboksamit ve etil-1-(3-nitrofenil)-5-fenil-3-(5-sülfamoil-1,3,4-tiyadiazol-2-ilkarbamoil)-1*H*-pirazol-4-karboksilat ligantlarını kullanarak Co(II) kompleksleri sentezlemişler ve hCA I ve hCA II üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Komplekslerin hidrataz IC_{50} değerleri hCA I için 0,065-0,473 μM aralığında, hCA II için 0,213-0,833 μM aralığında, esteraz IC_{50} değerleri hCA I için 0,058-0,297 μM aralığında, hCA II için 0,052-0,110 μM aralığında, K_i değerleri hCA I için 0,039-0,247 μM , hCA II için 0,078-0,363 μM aralığında bulunmuştur (Büyükkıdan vd., 2013a). Benzer bir çalışmada ise *N*-[5-(aminosülfonil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il]-4-benzoil-1-(3-nitrofenil)-5-fenil-1*H*-pirazol-3-karboksamit ligantının Co(II), Ni(II) ve Cu(II) kompleksini sentezlemişlerdir. Bileşiklerin CA üzerindeki inhibisyon etkileri mikromolar seviyesinde olup K_i değerlerinin hCA I için 0,081-0,316 μM aralığında, hCA II için 0,145-0,325 μM aralığında olduğu bildirilmiştir (Büyükkıdan vd., 2013b).

Monnard vd. 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada ise çeşitli rutenyum komplekslerini sentezlemişler ve hCA II üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Bileşiklerin K_i değerlerinin 145,3-329,1 nM arasında olduğu bildirilmiştir (Monnard vd., 2011).

4. YAPILAN ÇALIŞMALAR

4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan CNBr aktifleştirilmiş Sepharose®4B, sodyum klorür, 4-nitrofenil asetat, gliserol, 2-merkaptoetanol, TEMED, 2-propanol, Coomassie Brilliant Blue G-250, Coomassie Brilliant Blue R-250, metanol, fosforik asit, DMSO, aseton, sodyum hidroksit ve diyaliz torbası (D9777) Sigma-Aldrich firmasından, L-tirozin, 4-aminobenzensülfonamid, sodyum bikarbonat, TRIS, sodyum sülfat, sodyum asetat, sodyum perklorat, disodyum hidrojenfosfat, sodyum barbital, glisin, SDS, hidroklorik asit, EDTA, bromofenol blue, akrilamid, N,N'-metilenbisakrilamid, amonyumper sülfat, glisiel asetik asit ve sülfürik asit Merck firmasından, rekombinant insan CA IX enzimi Abcam firmasından, rekombinant insan CA XII enzimi Sino Biological firmasından, karbon dioksit gazı ise yerel firmalardan temin edilmiştir.

4.2. Kullanılan Cihazlar

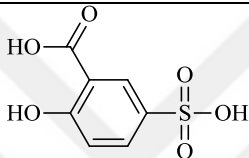
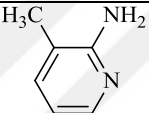
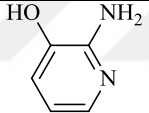
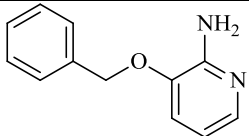
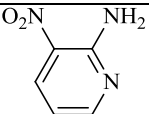
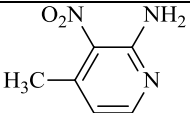
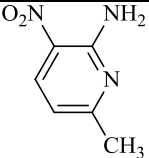
Çalışmalar esnasında, Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya Bölümü, Kimya Bölümü ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında bulunan aşağıdaki cihazlardan yararlanılmıştır.

UV-Vis Spektrofotometre	: SHIMADZU UV1700 PharmaSpec
Soğutmalı Santrifüj	: SIGMA 3K30
Santrifüj	: NÜVE NF 800
Vorteks	: HEIDOLPH ReaxTop
Istıcılı Manyetik Karıştırıcı	: DAIHAN MSH-20A
Analitik Hassas Terazî	: SHIMADZU ATX224
Elektroforez Sistemi	: WEALTEC Elite 300
Mikropipetler	: BRAND Transferpette®
Peristaltik Pompa	: ISMATEC REGLO Digital MS-4/8
pH Metre	: WTW inoLab pH 7110
Orbital Çalkalayıcı	: Lab Companion CWS-350
Etüv	: BINDER
Saf Su	: MILLIPORE Elix 10
Buz Makinesi	: SCOTSMAN AF 80
Soğutucu	: Ev tipi buzdolabı

4.3. Kullanılan İnhibitor Bileşikler

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan proton transfer tuzlarının, başlangıç maddelerinin Cu(II) komplekslerinin ve proton transfer tuzlarının Cu(II) komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyeleri Prof. Dr. Cengiz YENİKAYA ve Yrd. Doç. Dr. Halil İLKİMEN tarafından yapılmıştır. Bileşiklerin önerilen açık formülleri, isimleri ve verilen kodları Çizelge 4.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan inhibitör bileşikler ve kodları.

Bileşiğin Formülü	Bileşiğin Adı	Bileşiğin Kodu
	5-sülfosalisilik asit	B1
	2-amino-3-metilpiridin	B2
	2-amino-3-hidroksipiridin	B3
	2-amino-3-benzoksipiridin	B4
	2-amino-3-nitropiridin	B5
	2-amino-3-nitro-4-metilpiridin	B6
	2-amino-3-nitro-6-metilpiridin	B7

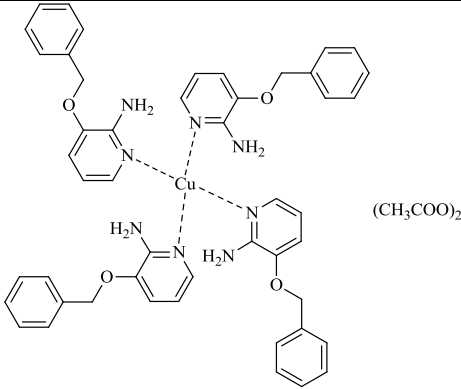
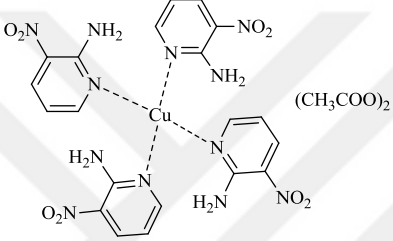
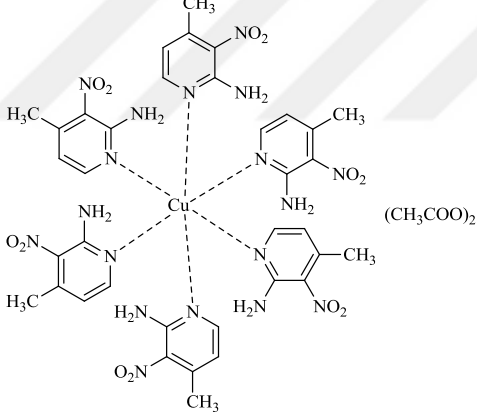
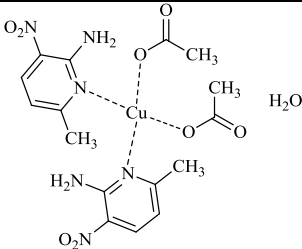
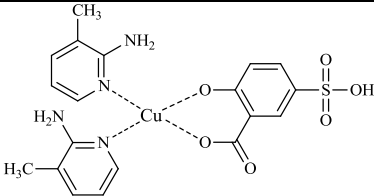
Çizelge 4.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan inhibitör bileşikler ve kodları (devamı).

	Sodyum 2-oksido-5-sülfonatobenzoat	T1
	2-amino-3-metilpiridinyum klorür	T2
	2-amino-3-hidroksipiridinyum klorür	T3
	2-amino-3-benzoksipiridinyum klorür	T4
	2-amino-3-nitropiridinyum klorür	T5
	2-amino-3-nitro-4-metilpiridinyum klorür	T6
	2-amino-3-nitro-6-metilpiridinyum klorür	T7
	2-amino-3-metilpiridinyum 2-hidroksi-5-sülfobenzoat	PT1
	2-amino-3-hidroksipiridinyum 2-hidroksi-5-sülfobenzoat	PT2
	2-amino-3-benzoksipiridinyum 2-hidroksi-5-sülfobenzoat	PT3

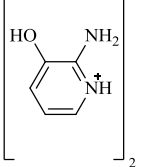
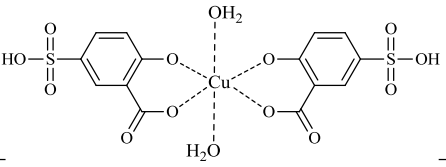
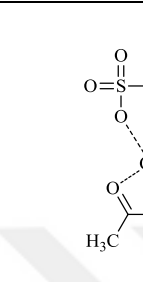
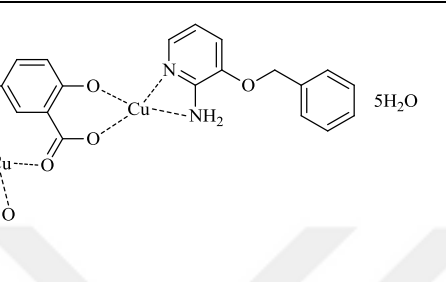
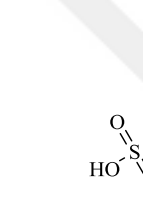
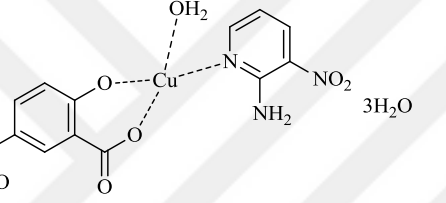
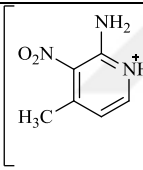
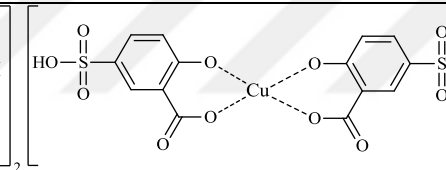
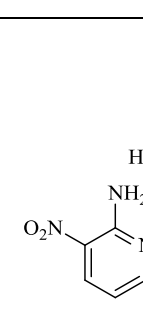
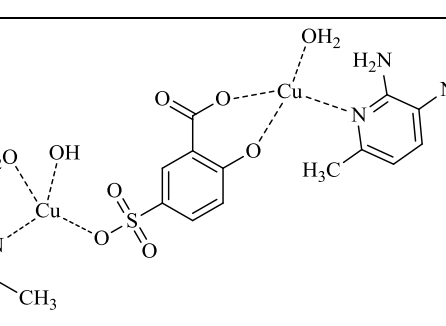
Çizelge 4.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan inhibitör bileşikler ve kodları (devamı).

	2-amino-3-nitropirydinyum 2-hidroksi-5-sülfobenzoat	PT4
	2-amino-3-nitro-4-metilpiridyum 2-hidroksi-5-sülfobenzoat	PT5
	2-amino-3-nitro-6-metilpiridyum 2-hidroksi-5-sülfobenzoat	PT6
	diakuabis(2-hidroksi-5-sülfobenzoato)bakır(II)	BK1
	bis(2-amino-3-metilpiridin-κN)di(asetato-κO)bakır(II)	BK2
	bis(2-amino-3-hidroksipiridin-κ²N,O)bakır(II)	BK3

Çizelge 4.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan inhibitör bileşikler ve kodları (devamı).

 <p>(CH₃COO)₂</p>	<p>tetrakis(2-amino-3-benzoksipiridin-κN) bakır(II) asetat</p>	<p>BK4</p>
 <p>(CH₃COO)₂</p>	<p>tetrakis(2-amino-3-nitropiridin-κN) bakır(II) asetat</p>	<p>BK5</p>
 <p>(CH₃COO)₂</p>	<p>heksakis(2-amino-3-nitro-4-metilpiridin-κN) bakır(II) asetat</p>	<p>BK6</p>
 <p>H₂O</p>	<p>bis(2-amino-3-nitro-6-metilpiridin-κN)di(asetato-κO) bakır(II) hidrat</p>	<p>BK7</p>
	<p>bis(2-amino-3-metilpiridin-κN)(2-oksido-5-sülfobenzoato-κ²O,O') bakır(II)</p>	<p>PTK1</p>

Çizelge 4.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan inhibitör bileşikler ve kodları (devamı).

		<p>2-amino-3-hidroksipiridinyum diakuabis (2-oksido-5-sülfobenzoato-κ^2O,O')bakır(II) dihidrat</p>	PTK2
		<p>μ-(2-oksido-5-sülfonatobenzoato-κ^4O,O',O'',O''') (asetato-κ^2O,O')bakır(II) (2-amino-3-benzoksipiridin-κ^2N,N')bakır(II) pentahidrat</p>	PTK3
		<p>(2-amino-3-nitropiridin-κ^N)(2-oksido-5-sülfobenzoato-κ^2O,O')bakır(II) trihidrat</p>	PTK4
		<p>2-amino-3-nitro-4-metilpiridinyum bis (2-oksido-5-sülfobenzoato-κ^2O,O')bakır(II)</p>	PTK5
		<p>μ-(2-oksido-5-sülfonatobenzoato-κ^4O,O',O'',O''') aqua(2-amino-3-nitro-6-metilpiridin-κ^N)hidroksobakır(II) aqua(2-amino-3-nitro-6-metilpiridin-κ^N)bakır(II) pentahidrat</p>	PTK6

4.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı ve kullanıldıkları yerler şu şekildedir:

1. *Sepharose*[®]4B matriksine *L*-tirozinin bağlanması: 0,2 M, pH 10,0 NaHCO₃ tamponu kullanıldı. 16,80 g NaHCO₃, 950 mL saf suda çözülüp pH değeri 10,0 oluncaya kadar 1,0 M NaOH ile titre edildikten sonra hacim saf su ile 1,0 L' ye tamamlandı.

2. *Afinite jelinin dengelenmesi:* pH 8,7, 0,025 M TRIS-HCl/0,1 M Na₂SO₄ tamponu kullanıldı. 3,028 g TRIS ve 14,20 g Na₂SO₄ 950 mL saf suda çözülüp pH değeri 8,7 oluncaya kadar 1,0 M HCl ile titre edildikten sonra hacim saf su ile 1,0 L' ye tamamlandı.

3. *Afinite jelinin yıkanması:* pH 8,7, 0,025 M TRIS-HCl/0,022 M Na₂SO₄ tamponu kullanıldı. 3,028 g TRIS ve 3,124 g Na₂SO₄ 950 mL saf suda çözülüp pH değeri 8,7 oluncaya kadar 1,0 M HCl ile titre edildikten sonra hacim saf su ile 1,0 L' ye tamamlandı.

4. *hCA I izoenziminin afinite kolonundan elüsyonu:* pH 6,3, 0,025 M Na₂HPO₄/1,0 M NaCl tamponu kullanıldı. 8,875 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl 200 mL saf suda çözülüp pH değeri 6,3 oluncaya kadar 1,0 M HCl ile titre edildikten sonra hacim saf su ile 250 mL' ye tamamlandı.

5. *hCA II izoenziminin afinite kolonundan elüsyonu:* pH 5,6, 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ tamponu kullanıldı. 15,313 g NaClO₄ ve 2,050 g CH₃COONa 200 mL saf suda çözülüp pH değeri 5,6 oluncaya kadar 1,0 M HCl ile titre edildikten sonra hacim saf su ile 250 mL' ye tamamlandı.

6. *Diyaliz:* pH 7,4, 0,05 M TRIS-SO₄ tamponu kullanıldı. 6,055 g TRIS 950 mL saf suda çözülüp pH değeri 7,4 oluncaya kadar 1,0 M H₂SO₄ ile titre edildikten sonra hacim saf su ile 1,0 L' ye tamamlandı.

7. Elektroforez işleminde kullanılan çözeltiler:

a) *Elektroforez tamponu:* 0,05 M TRIS, 0,38 M glisin ve 0,007 M SDS içerecek şekilde hazırlandı. 6,055 g TRIS, 28,53 g glisin ve 2,02 g SDS yaklaşık 950 mL saf suda çözüldükten sonra hacim 1 L' ye tamamlandı.

b) *TRIS-HCl tamponu:* pH 8,8, 1,0 M olarak hazırlandı. 12,114 g TRIS yaklaşık 60 mL hacimde saf su ile çözüldükten sonra 1,0 M HCl ile titre edilerek pH 8,8 değerine ayarlandı ve hacim 100 mL' ye tamamlandı.

c) *TRIS-HCl tamponu:* pH 6,8, 1,0 M olarak hazırlandı. 12,114 g TRIS yaklaşık 60 mL hacimde saf su ile çözüldükten sonra 1,0 M HCl ile titre edilerek pH 6,8 değerine ayarlandı ve hacim 100 mL' ye tamamlandı.

d) *Akrilamid çözeltisi:* %40' lık çözelti olarak kullanıldı. 19,48 g akrilamid ve 0,52 g N,N'-metilenbisakrilamid son hacim 50 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.

e) *Amonyumpersulfat çözeltisi*: %10' luk çözelti olarak kullanıldı. 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 1,0 mL saf suda çözüldü.

f) *SDS çözeltisi*: %10' luk olarak hazırlandı. 1,0 g SDS 10,0 mL saf suda çözüldü.

g) *Numune yükleme çözeltisi*: %60 gliserol, 0,3 M TRIS-HCl (pH 6,8), 0,012 M EDTA, %12 SDS, 0,846 M 2-merkaptoetanol ve %0,05 bromofenol blue içerecek şekilde hazırlandı. 6,0 mL gliserol, 3,0 mL 1,0 M TRIS-HCl (pH 6,8), 0,045 g EDTA, 1,2 g SDS, 600 μL 2-merkaptoetanol ve 0,005 g bromofenol blue karıştırılarak 10,0 mL lik çözelti hazırlandı.

h) *Jel boyama çözeltisi*: %0,1 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50,0 metanol ve %10,0 glasiyel asetik asit içerecek şekilde hazırlandı. 1,0 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 500,0 mL metanol ve 100,0 mL glasiyel asetik asit karıştırılıp hacim saf su ile 1,0 L' ye tamamlandı.

i) *Jel yıkama çözeltisi*: %10,0 metanol ve %7,0 glasiyel asetik asit içerecek şekilde hazırlandı. 100,0 mL metanol ve 70,0 mL glasiyel asetik asit karıştırılarak hacim saf su ile 1,0 L' ye tamamlandı.

8. *Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti*: %0,01' lik Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi hazırlandı. 0,01 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 5,0 mL %95 lik etanolde çözüldükten sonra üzerine 11,2 mL %85' lik H_3PO_4 ilave edildi ve hacim saf su ile 100,0 mL' ye tamamlandı.

9. *Hidrataz aktivitesi tamponu (veronal)*: pH 8,2, 0,025 M sodyum barbital çözeltisi olarak hazırlandı. 5,15 g sodyum barbital yaklaşık 950 mL saf suda çözülüp 1,0 M HCl ile titre edilerek pH 8,2' ye ayarlandı ve hacim 1,0 L' ye tamamlandı.

10. *Hidrataz aktivitesi substratı*: Yaklaşık 0 °C sıcaklıktaki 1,0 L saf suyun içerisinde yarım saat süreyle CO_2 gazı geçirilmek suretiyle hazırlandı.

11. *Esteraz aktivitesi tamponu*: Diyaliz tamponu ile aynı tampon kullanıldı.

12. *Esteraz aktivitesi substratı*: 3,0 mM 4-nitrofenil asetat çözeltisi hazırlandı. 0,0272 g 4-nitrofenil asetat 2,0 mL aseton içerisinde çözülüp, 48,0 mL saf suya 15 dk. sürede ilave edilerek hazırlandı.

13. *İnhibitör stok çözeltileri*: %1,0'lik olarak hazırlandı. 0,005 g inhibitör 5,0 mL DMSO içerisinde çözüldü.

4.5. Afinite Jelinin Hazırlanışı

4.5.1. Siyanojen bromür (CNBr) ile aktifleştirilmiş Sepharose®4B matriksine L-tirozin bağlanması

pH'ı 10,0 olan 0,2 M 250,0 mL NaHCO₃ tamponunda 80,0 mg L-tirozin çözüldü ve üzerine 7,5 g CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose®4B ilave edildi. Bu işlemi takiben süspansiyon 4 °C' de iki saat süreyle karıştırıldı ve 16 saat süreyle bu sıcaklıkta bekletildi. Bekletme işleminin sonrasında L-tirozinin fazlasını uzaklaştırmak için, jel 280 nm de absorban gözlenmeyene kadar bol su ile yıkandı. Yıkama işlemi 100,0 mL pH 8,8 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile tekrarlandı ve L-tirozin bağlanmış jel, aynı tamponun 40,0 mL' si içerisinde alındı (Arslan vd., 1996; Axén vd., 1967; Falkbring vd., 1972).

4.5.2. 4-aminobenzen-sülfonamit bileşiğinin L-tirozin bağlanmış jele kenetlendirilmesi

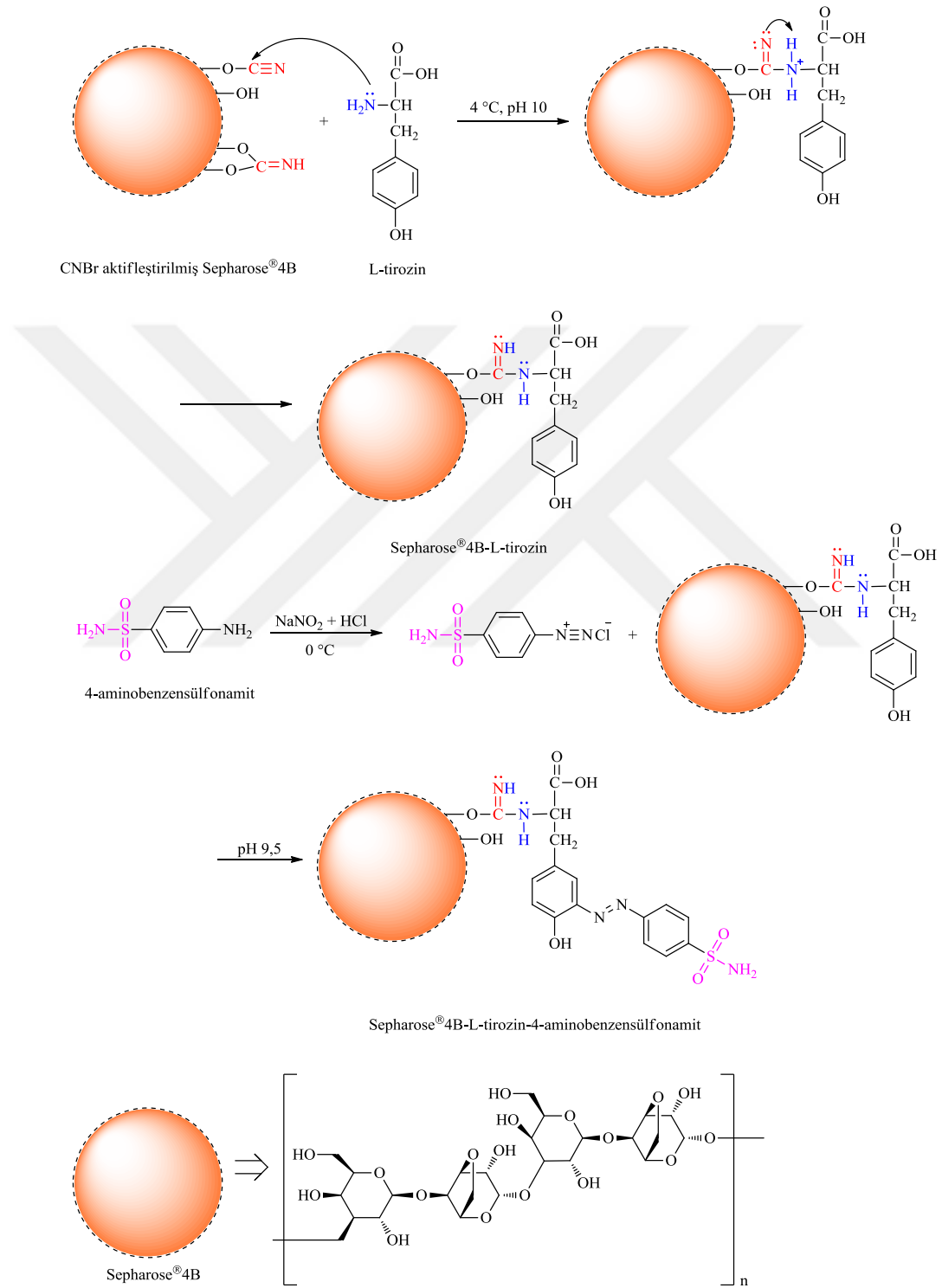
25,0 mg 4-aminobenzen-sülfonamit 0 °C sıcaklıkta 10,0 mL 1,0 M HCl içerisinde çözüldü. 75,0 mg NaNO₂ içeren 0 °C sıcaklıktaki 5,0 mL çözelti, 4-aminobenzen-sülfonamit çözeltisine 10 dk. sürede damla damla ilave edildi. Bu reaksiyon ile elde edilen 4-aminobenzen-sülfonamit diazonyum tuzu, 40,0 mL Sepharose®4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. Ortam pH'ı 1,0 M NaOH ile 9,5 değerine ayarlandı. Üç saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra 1,0 L su ve 200,0 mL 0,05 M pH 7,4 TRIS-SO₄ tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi (Arslan vd., 1996; Axén vd., 1967; Falkbring vd., 1972). Afinite jelinin hazırlandığı reaksiyonlar şekil 4.1' de özetlenmiştir.

4.6. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması

4.6.1. Eritrosit hemolizatının hazırlanışı

Enzim saflaştırma işlemlerinde kullanılacak olan kan, antikoagülanlı kan torbasına alındıktan sonra 4 °C de muhafaza edildi ve 48 saat süre içerisinde kullanıldı. Antikoagülanlı kan 10 mL lik tüplere alınarak 2500 rpm de 15 dk. süreyle santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüplerin üst kısmında toplanan plazma ve lökositler ayrıldıktan sonra eritrositler %0,9' luk NaCl çözeltisi ile yıkayıp tekrar 2500 rpm de 15 dk. süreyle santrifüjlendi. Yıkama işlemi birkaç kez tekrarlandıktan sonra eritrositler, 0 °C de hacimlerinin 1,5 katı saf su kullanılarak 30 dk. hemoliz edildi (Keilin ve Mann, 1940; Nyman, 1961; Rickli vd., 1964). Parçalanmış hücre membranlarının ortamdaki uzaklaştırılması için 4 °C de 20000 rpm de 30 dk. süreyle

santrifüjlendi. Santifüj işleminden sonra süpernatantın pH'ı, katı TRIS kullanılarak afinite kolonunun pH değeri olan 8,7' ye ayarlandı (Arslan vd., 1996).



Şekil 4.1. Afinite jelinin hazırlanması esnasında gerçekleşen reaksiyonlar.

4.6.2. Hemolizatın afinite kolonuna yüklenmesi ve enzimin elüsyonu

Afinite jeli 50 cmx1,5 cm ebatlarındaki bir kolona paketlenip pH'ı 8,7 olan 0,025 M TRIS-HCl/0,1 M Na₂SO₄ çözeltisi ile dengelendi. Dengeleme işlemi, kolona yüklenen tampon ile kolondan elüe edilen tamponun 280 nm de aynı absorbans değerini vermesine kadar sürdürüldü. Daha sonra pH'ı 8,7' ye ayarlanmış eritrosit hemolizati, akış hızı 1,0 mL/dk olan kolona yüklendi. Hemolizatın tamamı kolondan geçtikten sonra pH'ı 8,7 olan 0,025 M TRIS-HCl/0,022 M Na₂SO₄ çözeltisi ile yıkama yapıldı. Yıkama işlemine, 280 nm de köre karşı 0,05 absorbans değeri okununcaya kadar devam edildi. Afinite jelinin 4-aminobenzen-sülfonamit ucuna bağlanmış olan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin elüsyonu sırasıyla 0,025 M Na₂HPO₄/1,0 M NaCl (pH 6,3) çözeltisi ve 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Elüatlar beşer mL'lik fraksiyonlar halinde toplandı, 280 nm de kalitatif protein tayini ve CO₂ hidrasyon aktivitesi ölçümü yapıldıktan sonra aktif fraksiyonlara diyaliz işlemi uygulandı (Arslan vd., 1996; Bülbül vd., 2002).

4.7. Protein Tayini

4.7.1. Kalitatif protein tayini

hCA I ve hCA II izoenzimleri afinite kolonundan elüe edildikten sonra alınan fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası, proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin 280 nm de maksimum absorbans göstermesine dayanmaktadır (Edelhoc, 1967). Fraksiyonların absorbansları spektrofotometrede köre karşı ölçüldü.

4.7.2. Kantitatif protein tayini

Bradford metodu kullanıldı (Bradford, 1976). Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için 1,0 mg/mL konsantrasyonundaki stok sığır serum albümin çözeltisinden deney tüplerine 0,1-1,0 mL aralığında on farklı miktarda alınarak 0,1-1,0 mg/mL konsantrasyonlarında standart protein çözeltileri hazırlandı. Tüplere 5,0 mL Comassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ilave edildi ve 10 dk. süreyle inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon süresinin tamamlanmasından sonra 595 nm de köre karşı absorbansları ölçüldü. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile hemolizattaki ve afinite kolonundan alınan elüatlardaki protein miktarları belirlendi (Şekil 5.2).

4.8. Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Belirlenmesi

4.8.1. CO₂ hidrasyon aktivitesinin (hidrataz) belirlenmesi

Aktivite tayini Wilbur-Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde CO₂ bileşiğinin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH'ın 8,2 den 6,3 e düşmesi için geçen süre pH-stat metodu kullanılarak belirlenir (Wilbur ve Anderson, 1948; Maren, 1960).



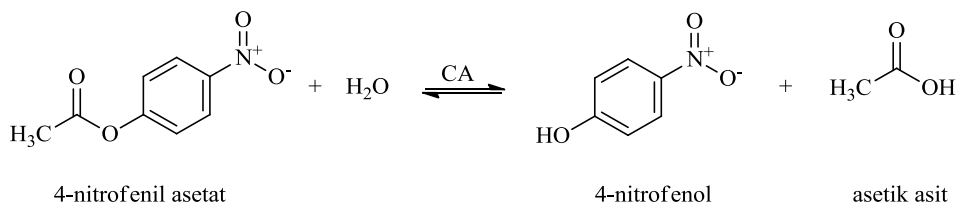
Deneyde reaksiyon ortamına 100,0 µL veronal tamponu, 50,0 µL su, 10,0 µL enzim çözeltisi ve 250,0 µL doymun CO₂ çözeltisi konuldu. pH değerinin 6,3 e düşmesi için geçen süre (t_c) ölçüldü. Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine su ile yapıldı (t₀). Bu yöntemde göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyon süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Yani;

$$EU = \frac{(t_0 - t_c)}{t_c}$$

eşitliği ile kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı.

4.8.2. Esteraz aktivitesinin belirlenmesi

Verpoorte (1967) metodu ile belirlendi (Verpoorte vd., 1967). Bu yöntem, karbonik anhidrazın esterleri hidrolizleme aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan 4-nitrofenil asetatı, 348 nm de absorban veren 4-nitrofenol veya 4-nitrofenolat'a hidroliz etmektedir.



348 nm de 4-nitrofenol ve 4-nitrofenolat'ın her ikisi de aynı absorban değerini göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir.

Aktivite ölçümü için, 1,0 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzimden oluşan bir reaksiyon ortamı hazırlanıp 25°C de 348 nm de 3 dakika süresince absorbans değerindeki değişim kaydedildi. Ayrıca, 4-nitrofenil asetat bileşiğinden kaynaklı absorpsiyon durumunun düzeltilmesi için enzim yerine 0,1 mL tampon kullanılarak, 3 dakika süreyle karışımın absorbans değerindeki değişim belirlendi. Böylelikle bu süre içerisinde 4-nitrofenil asetatın kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve absorpsiyonu için düzeltme yapıldı.

Bütün esteraz aktivitesi ölçümlerinde hazırlanan stok substrat çözeltisi 3,0 mM dır. Aktivite ölçüm ortamının toplam hacmi 3,0 mL olduğundan ve 1,0 mL substrat çözeltisi kullanıldığından, reaksiyon ortamındaki substrat konsantrasyonu 1,0 mM dır. Aktivite birimi ise şöyle hesaplandı:

348 nm de 4-nitrofenol ve 4-nitrofenolat iyonunun molar absorpsiyon sabiti (ϵ) $5,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. 4-nitrofenil asetatın molar absorpsiyon sabiti ise $0,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olduğundan; 348 nm'de ölçülen absorbans değerinin 5 sayısına bölümü ortamdaki 4-nitrofenol (4-nitrofenolat) iyon konsantrasyonunu mM cinsinden verir.

$$4\text{-nitrofenol konsantrasyonu (M)} = \text{Okunan absorbans değeri} / 5 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$4\text{-nitrofenol konsantrasyonu (mM)} = \text{Okunan absorbans değeri} / 5 \text{ mM}$$

Bulunan bu değer 3 dakika için olduğuna göre 1 dakikada oluşan 4-nitrofenol miktarını bulmak için 3 e bölünür. Toplam hacim 3 mL olduğuna göre 1 dakikada oluşan 4-nitrofenol miktarı şu şekilde bulunur:

$$4\text{-nitrofenol miktarı} = ((\text{Okunan absorbans değeri} / 5 \text{ mM}) / 3 \text{ dakika}) \times 3 \text{ mL}$$

$$= \text{Okunan absorbans değeri} / 5 \text{ (}\mu\text{mol/dakika)}$$

4.8.3. Esteraz K_m ve V_{max} sabitlerinin belirlenmesi

K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için beş farklı substrat konsantrasyonunda (0,6, 0,8, 1,0, 1,2 ve 1,4 mM) üç tekrarlı olarak esteraz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Esteraz reaksiyonu sonucu oluşan 4-nitrofenol miktarı hız (V) değeri olarak alındı. Daha sonra Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934; Verpoorte vd., 1967).

$$\text{Lineweaver-Burk eşitliği: } \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

4.9. Diyaliz

Diyaliz işlemi için ayırma gücü 12000 Da olan diyaliz torbaları kullanıldı. Bu işlem, diyaliz tamponu içerisinde, 4 °C sıcaklıkta ve 24 saat süreyle gerçekleştirildi. Her dört saatte bir tampon değiştirilerek diyaliz işlemi tamamlandı (Arslan vd., 1996; Bülbül vd., 2002). Diyalizden sonra, saflaştırılan hCA I ve hCA II enzimlerinin saflıklarının kontrolü ve molekül ağırlıklarının belirlenmesi için SDS-PAGE yapıldı.

4.10. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Elektroforez işlemi Laemmli tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı (Laemmli, 1970). Bunun için %12' lik ayırma jeli ve %3,75' lik yığıma jeli hazırlandı. Ayırma jeli hazırlamak için 3,15 mL su, 3,75 mL 1,0 M TRIS-HCl (pH 8,8), 3,00 mL %40 akrilamid, 100 µL %10 SDS, 100 µL %10 amonyum persülfat ve 6 µL TEMED karıştırıldı. Daha sonra vakit kaybedilmeden cam plakalar arasına döküldü ve üzerine 1,0 mL 2-propanol ilave edildi. Jel katılaştıktan sonra 2-propanol döküldü ve yığıma jeli hazırlandı.

Yığıma jeli hazırlamak için 2,33 mL su, 375 µL 1,0 M TRIS-HCl (pH 6,8), 281 µL %40 akrilamid, 30 µL %10 SDS, 30 µL %10 amonyum persülfat ve 5 µL TEMED karıştırıldı. Karışım ayırma jeli üzerine döküldü ve tarak yerleştirildi. Jel katılaştıktan sonra tarak yavaşça çıkartıldı.

Kuyulara yüklenecek numuneler 20 µg protein içerecek şekilde hazırlandı ve 30 µL' lik hacimler halinde yüklendi. 30 µL' lik her bir numune için 5 µL numune yükleme çözeltisi kullanıldı ve 90 °C de 5dk. süreyle denatürasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemi takiben yaklaşık 10 sn. süreyle 12000 rpm de santrifüjlendi ve numuneler kuyulara yüklendi. Yaklaşık 90 dk. süreyle, 150 V' luk akım uygulanarak standart eşliğinde yürütüldü. Daha sonra jel, boyama çözeltisine alınarak 1 saat kadar çalkalandı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra jel berraklaşmaya kadar yıkama çözeltisinde bekletildi. Son olarak bantların görüntüsü alındı (Şekil 5.3).

4.11. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Kansere İlişkili Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

4.11.1. Hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi

Hidrataz aktivitesi inhibisyon ölçümleri için, %1,0'lik olarak hazırlanan inhibitör stok çözeltileri, uygun konsantrasyonlarda seyreltilerek kullanıldı. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan

hCA I ve hCA II izoenzimleri ile rekombinant olarak temin edilen CA IX ve CA XII izoenzimleri için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı (Maren, 1960). Beşinci bölümde, çizelge ve grafiklerde verilen [I] değerleri aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 410,0 μ L).

4.11.2. Esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi

Hidrataz aktivitesi ölçümlerinde olduğu gibi %1,0'lik olarak hazırlanan inhibitör stok çözeltileri, uygun konsantrasyonlarda seyreltilerek kullanıldı. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri ile rekombinant olarak temin edilen CA IX ve CA XII izoenzimleri için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı (Verpoorte, 1967).

4.12. Sonuçların Değerlendirilmesi, İstatistiksel Analiz ve Konu ile İlgili Şekillerin Oluşturulmasında Kullanılan Yazılımlar

Aktivite ölçümlerinden elde edilen sonuçlar Microsoft Excel 2010 paket programı kullanılarak grafik haline getirildi ve yine aynı yazılım ile IC_{50} değerleri hesaplandı.

Verilen tüm veriler üç bağımsız deneyle teyit edildi ve ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Veriler, çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (SPSS 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılarak analiz edildi. $p < 0,0001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

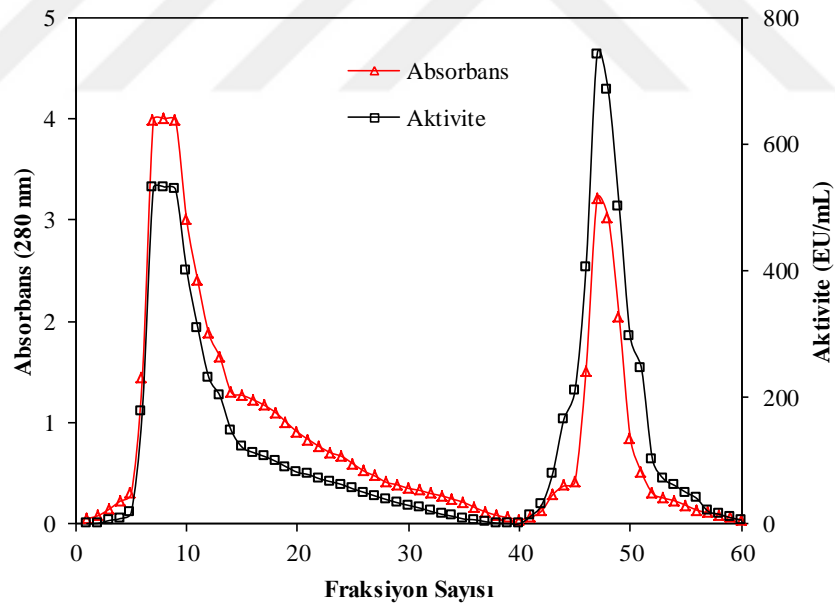
Tezin ikinci kısmındaki protein kristal yapılarının gösteriminde Accelrys Discovery Studio 4.1 Visualizer paket programından, kimyasal formüllerin ve diğer şekillerin çiziminde ise ChemBioDraw Ultra 12.0 paket programından yararlandı. CA I, II, IX ve XII izoenzimlerinin sekanslarının kıyaslanması ise BLAST kullanılarak BLOSUM-62 matrisi ile yapıldı.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Eritrositlerden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılmasına İlişkin Sonuçlar

5.1.1. hCA I ve hCA II' nin elüsyonu, kalitatif protein tayini ve CO₂ hidrasyon aktivitesi ölçümü

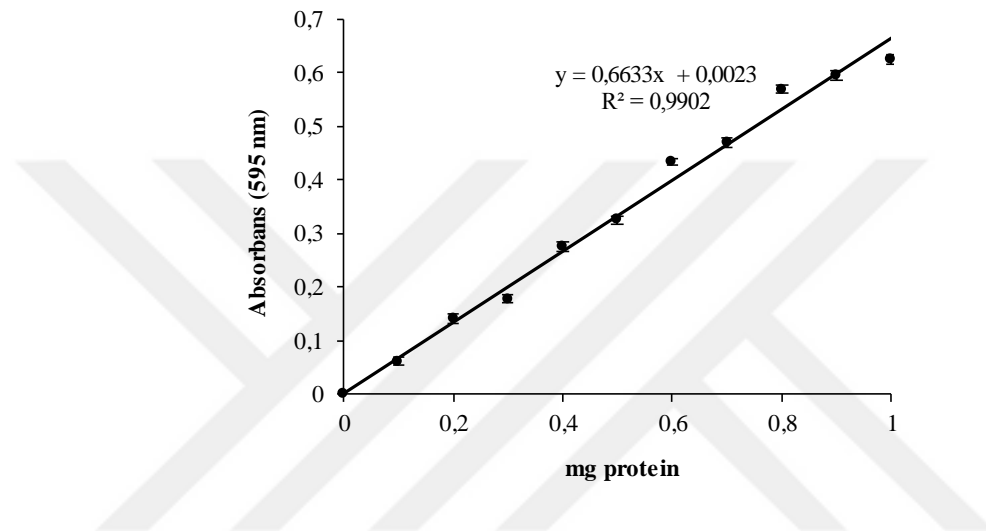
hCA I ve hCA II izoenzimleri aynı afinite jeli kullanılarak ayrı ayrı saflaştırıldı. TRIS ile pH'ı 8,7 değerine ayarlanmış olan hemolizatın kolona yüklenmesi ve yıkama işlemlerini takiben hCA I izoenzimi 25,0 mM Na₂HPO₄/1,0 M NaCl (pH= 6,3) tamponu kullanılarak elüe edildi. hCA I'in elüsyonu tamamlandıktan sonra hCA II izoenzimi 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH= 5,6) tamponu ile elüe edildi. Elüatlar 5,0 mL lik fraksiyonlar halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbansları ölçüldü. Absorbans gösteren fraksiyonlar için CO₂ hidrataz aktivitesi ölçümü yapıldı (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kolonundan elüsyonu esnasında absorbansları ve aktivitelerindeki değişim. (1. – 40. fraksiyonlar hCA I izoenzimine, 41. – 60. Fraksiyonlar hCA II izoenzimine aittir.)

5.1.2. Kantitatif protein tayini

Kantitatif protein tayini için Bradford metodu kullanıldı (Bradford, 1976). Hazırlanan kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem yardımıyla eritrosit hemolizatındaki ve afinite kolonundan alınan elüatlardaki protein miktarları belirlendi. Kalibrasyon eğrisi şekil 5.2’ de gösterilmiştir.



Şekil 5.2. Protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

5.1.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin spesifik aktivitelerinin ve saflaştırma verimlerinin belirlenmesi

Eritrosit hemolizatından ve saflaştırılan enzimlerden alınan numunelerde CO₂ hidrataz aktivitesi ölçümü ve protein miktarı tayini yapıldı. Elde edilen verilerden hCA I ve hCA II izoenzimlerinin spesifik aktiviteleri ve bu izoenzimlerin kaç kat saflaştırıldığı hesaplandı. İlgili sonuçlar Çizelge 5.1’ de gösterilmiştir.

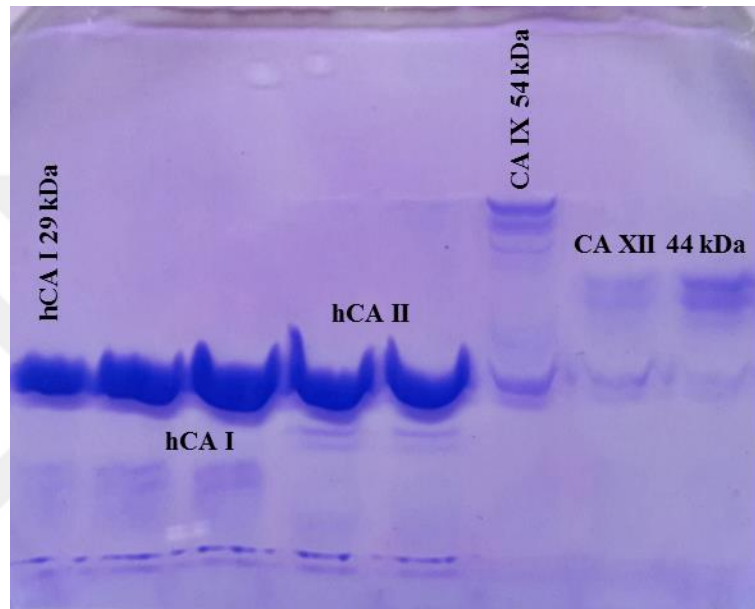
Çizelge 5.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin spesifik aktiviteleri ve saflaştırma verimleri.

Saflaştırma Basamağı	Aktivite (EU/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	118,19	50,00	12,36	618,00	5909,50	9,56	100,00	1,00
Afinite Krm. (hCA I)	532,14	5,00	0,34	1,70	2660,70	1565,12	45,02	163,72
Afinite Krm. (hCA II)	741,26	5,00	0,19	0,95	3706,30	3901,37	62,72	408,09

Afinite Krm.: Afinite kromatografisi

5.1.4. SDS–PAGE sonuçları

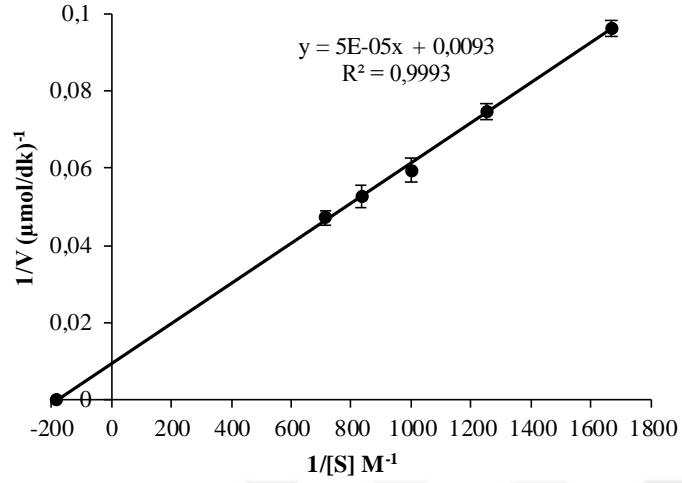
Afınite kromatografisi ile saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflıklarını kontrol etmek amacıyla bölüm 4.10’ da anlatıldığı şekilde SDS–PAGE yapıldı. Standart olarak molekül ağırlıkları şekilde belirtilen enzimler kullanıldı. Protein bantlarının belirginleşmesini takiben fotoğrafları çekildi (Şekil 5.3).



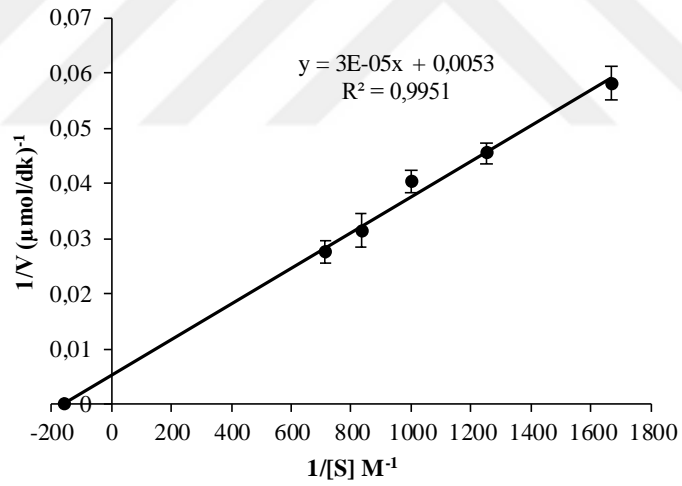
Şekil 5.3. SDS–PAGE sonuçları.

5.1.5. Saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin kinetik özelliklerinin belirlenmesi

Eritrositlerden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için bölüm 4.8.3 de tarif edildiği şekilde beş farklı substrat konsantrasyonunda esteraz aktivitesi ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve grafik yardımıyla hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Buna göre hCA I izoenzimi için K_m değeri 5,380 mM, V_{max} değeri 108,00 $\mu\text{mol.dk}^{-1}$ olarak hesaplandı. hCA II izoenzimi için ise K_m değeri 5,660 mM, V_{max} değeri 189,00 $\mu\text{mol.dk}^{-1}$ olarak hesaplandı (Şekil 5.4, Şekil 5.5).



Şekil 5.4. hCA I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 5.5. hCA II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.

5.2. Sentezlenen Bileşiklerin hCA I, hCA II, CA IX ve CA XII İzoenzimlerinin Hidrataz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerine İlişkin Sonuçlar

Sentezlenen bileşiklerin hCA I, hCA II, CA IX ve CA XII izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkileri bölüm 4.11.1’ de açıklandığı şekilde belirlendi. Çizilen %Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen denklem yardımıyla bileşiklerin IC₅₀ değerleri hesaplandı. Şekil 5.6 için örnek hesaplama yapılırsa:

$$y = 100e^{-0,014x}$$

Eşitlikte %50 aktivite için y yerine 50 yazılıp her iki taraf 100’ e bölünürse

$$0,5 = e^{-0,014x}$$

eşitliği elde edilir. Her iki tarafın ln değeri alınıp gerekli sadeleştirmeler yapıldığında

$$x = 49,511$$

bulunur. Bu değer IC₅₀ değeridir. Diğer tüm grafiklerde de benzer şekilde hesaplama yapıldı.

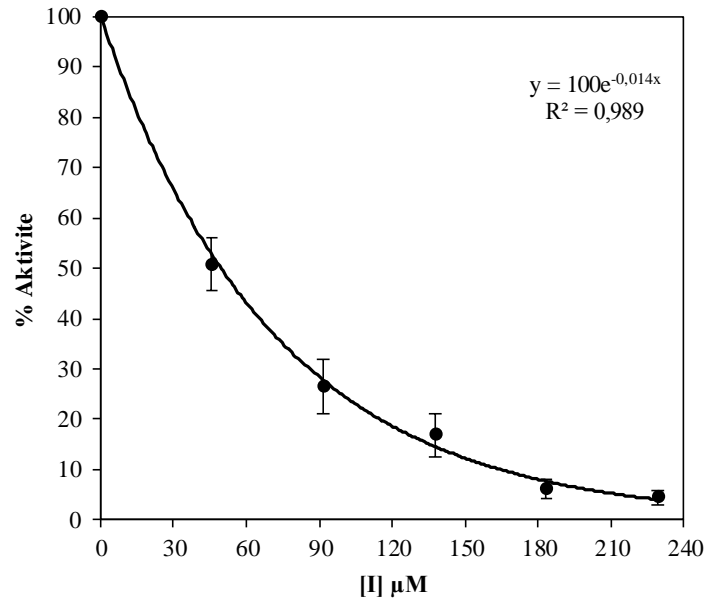
5.2.1. Bileşiklerin hCA I hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi

hCA I izoenzimi üzerinde inhibitör etki gösteren bileşiklere ait deneysel verileri içeren çizelgeler ve bu çizelgelerdeki sonuçlardan elde edilen grafikler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 5.2. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK1** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	45,854	47,368	48,000	56,842	50,737±5,297
BK1	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	91,708	24,812	22,000	32,566	26,459±5,472
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	137,562	15,790	13,333	21,531	16,885±4,207
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	183,416	5,817	4,667	8,290	6,258±1,851
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	229,270	3,890	3,429	6,179	4,499±1,473

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

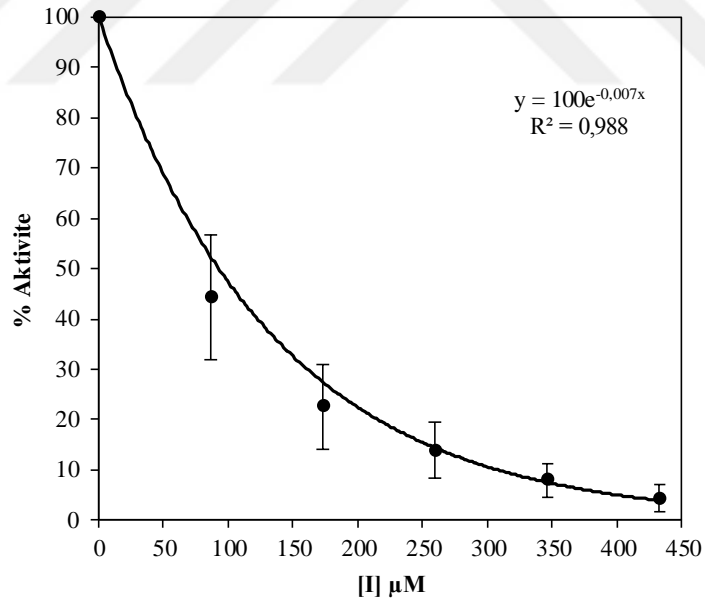


Şekil 5.6. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK1** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.3. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK3** bileşiminin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	Inh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	86,564	46,429	31,035	55,556	44,340±12,393
BK3	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	173,128	23,469	13,793	30,556	22,606±8,415
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	259,692	14,286	8,046	19,192	13,841±5,586
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	346,256	8,163	4,509	11,111	7,928±3,307
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	432,820	2,597	3,017	7,407	4,341±2,664

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

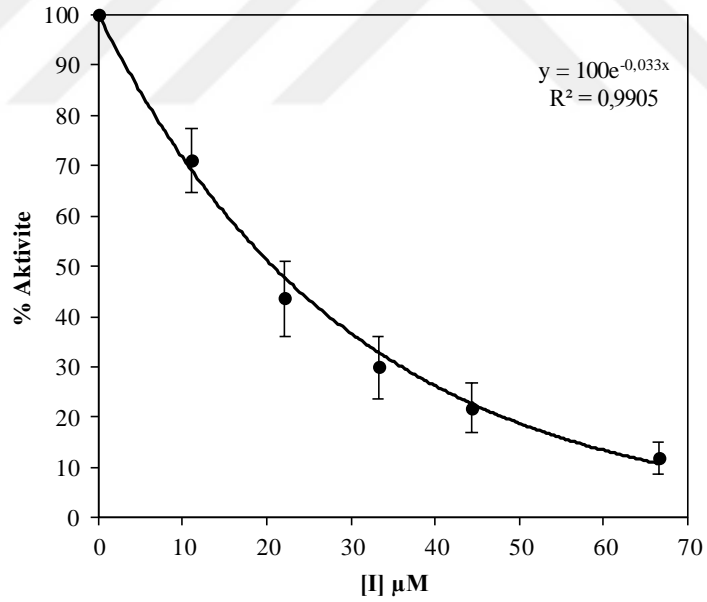


Şekil 5.7. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK3** bileşiminin etkisi.

Çizelge 5.4. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK6** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	Inh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	11,082	72,222	64,286	76,923	71,144±6,387
BK6	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	22,164	44,444	35,714	50,550	43,569±7,456
	100,0	10,0	15,0	35,0	250,0	33,245	30,556	23,409	35,897	29,974±6,234
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	44,327	22,222	16,667	26,573	21,821±4,966
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	66,490	11,111	9,341	15,385	11,946±3,107

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

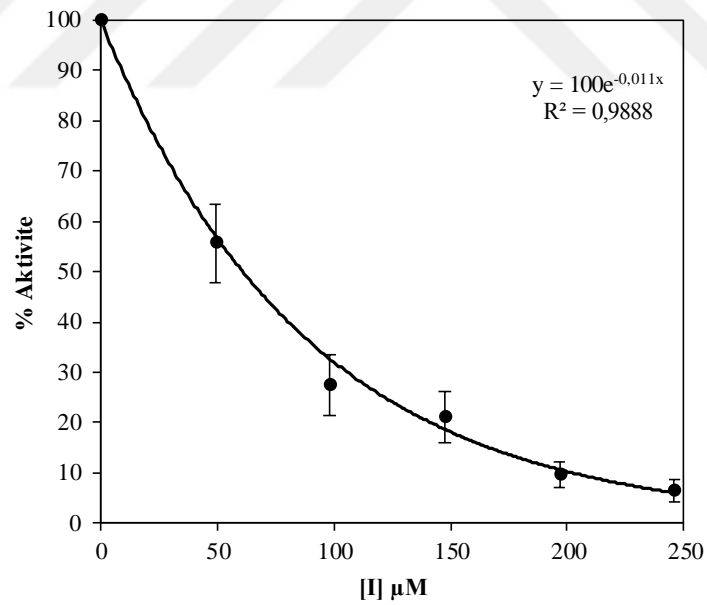


Şekil 5.8. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK6** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.5. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK1** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	49,174	56,757	47,368	62,963	55,696±7,851
PTK 1	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	98,348	27,928	21,053	33,333	27,438±6,155
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	147,522	21,376	15,790	25,926	21,030±5,077
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	196,696	9,910	7,121	12,281	9,771±2,583
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	245,869	5,405	5,263	9,091	6,587±2,170

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

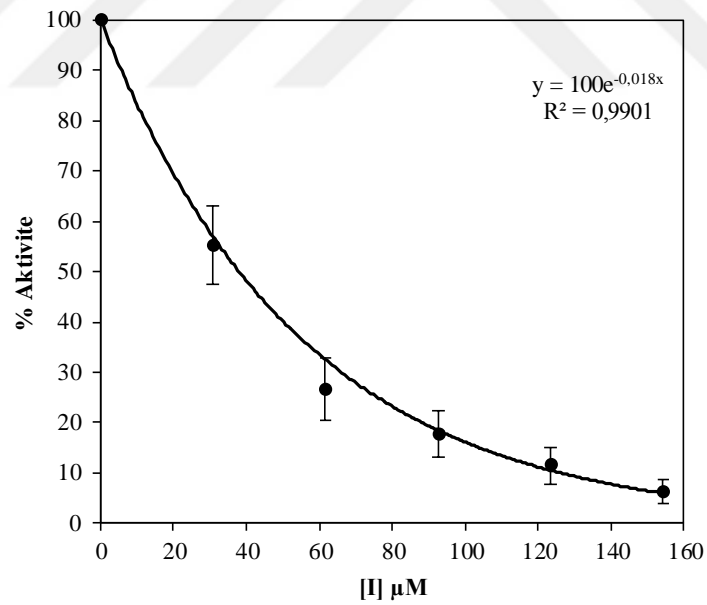


Şekil 5.9. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK1** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.6. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK2** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	Inh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	30,866	56,250	46,875	62,500	55,208±7,864
PTK2	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	61,733	27,083	20,313	32,500	26,632±6,106
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	92,599	17,969	13,068	22,115	17,717±4,529
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	123,465	9,926	8,929	15,625	11,493±3,613
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	154,332	4,891	4,934	8,929	6,251±2,319

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

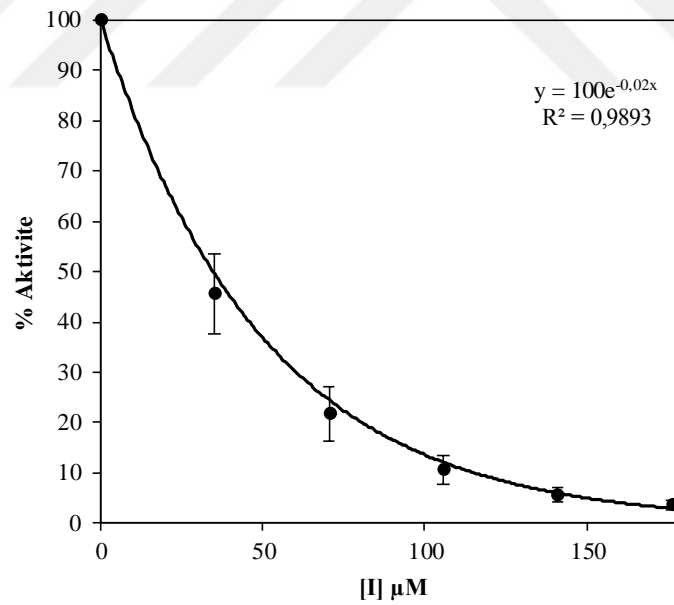


Şekil 5.10. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK2** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.7. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK3** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	Inh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	35,266	46,429	37,209	52,962	45,533±7,914
PTK3	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	70,532	22,078	16,279	26,830	21,729±5,284
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	105,798	10,714	7,661	13,351	10,575±2,847
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	141,064	5,714	4,070	7,130	5,638±1,531
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	176,330	3,226	2,824	4,878	3,643±1,089

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

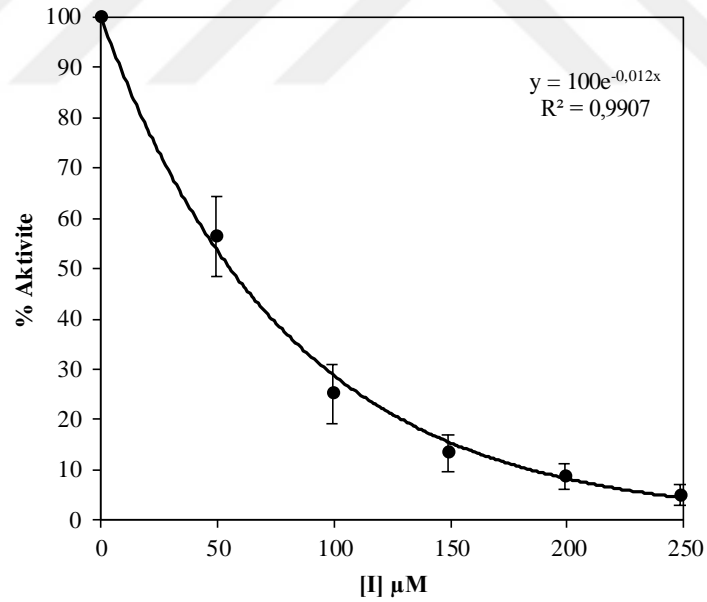


Şekil 5.11. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.8. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK4** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	49,686	57,447	47,917	63,768	56,377±7,980
PTK 4	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	99,372	25,532	18,982	30,830	25,115±5,935
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	149,057	13,564	9,722	16,880	13,389±3,582
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	198,743	8,815	6,250	11,067	8,711±2,410
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	248,429	3,590	4,167	7,407	5,055±2,058

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

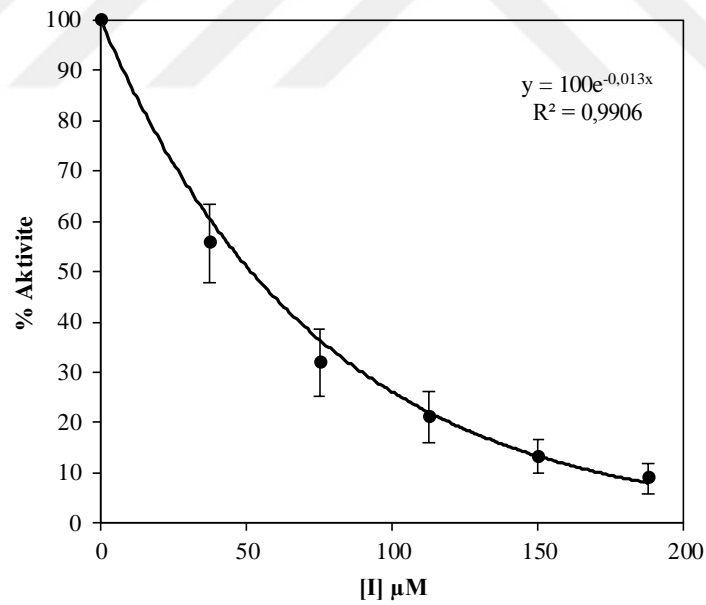


Şekil 5.12. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK4** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.9. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK5** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	37,522	56,757	47,368	62,963	55,696±7,851
PTK5	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	75,043	32,432	24,812	38,272	31,839±6,749
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	112,565	21,376	15,790	25,926	21,030±5,077
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	150,087	13,514	9,774	16,667	13,318±3,450
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	187,609	7,336	7,121	12,281	8,913±2,919

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

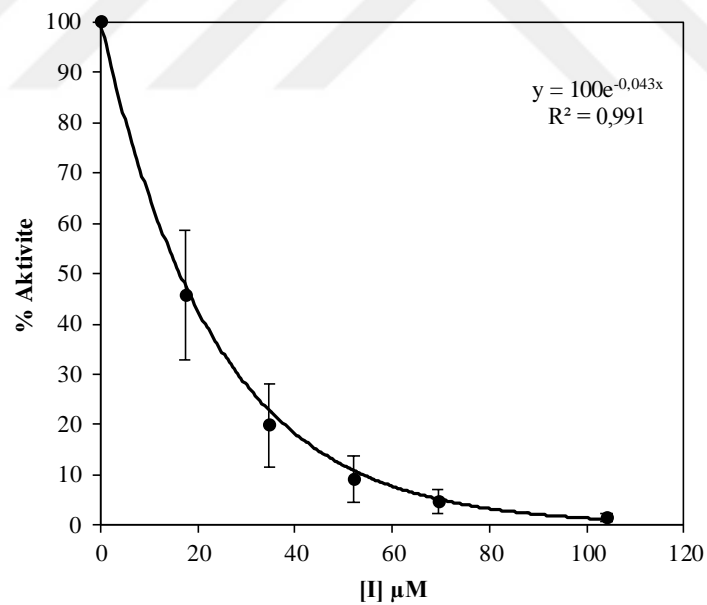


Şekil 5.13. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK5** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.10. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK6** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	17,358	48,235	31,818	57,143	45,732±12,847
PTK6	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	34,715	18,656	12,338	28,571	19,855±8,183
	100,0	10,0	15,0	35,0	250,0	52,073	7,563	5,595	14,286	9,148±4,557
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	69,431	3,866	2,841	7,468	4,725±2,430
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	104,146	1,176	0,923	2,311	1,470±0,739

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)



Şekil 5.14. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK6** bileşiğinin etkisi.

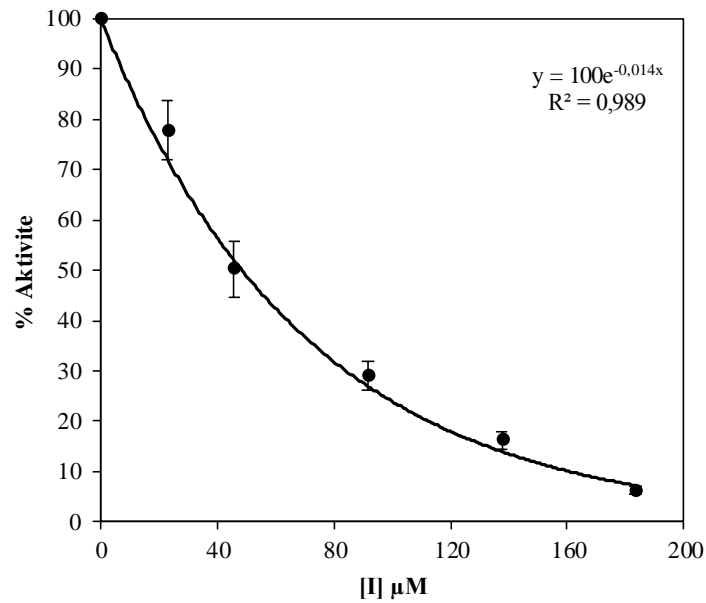
5.2.2. Bileşiklerin hCA II hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi

hCA II izoenzimi üzerinde inhibitör etki gösteren bileşiklere ait deneysel verileri içeren çizelgeler ve bu çizelgelerdeki sonuçlardan elde edilen grafikler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 5.11. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK1** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	Inh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	22,927	72,222	84,066	77,037	77,775±5,956
BK1	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	45,854	44,444	55,385	50,794	50,208±5,494
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	91,708	25,926	30,289	31,111	29,109±2,787
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	137,562	14,530	16,346	17,989	16,289±1,731
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	183,416	5,556	6,073	7,055	6,228±0,762

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

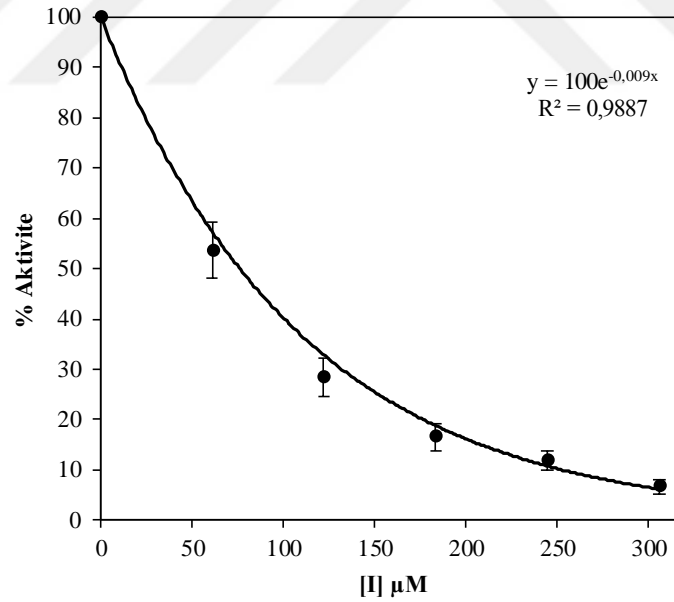


Şekil 5.15. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK1** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.12. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK2** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	61,294	56,757	47,297	56,842	56,632±5,486
BK2	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	122,589	32,432	24,710	28,070	28,404±3,872
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	183,883	18,919	13,759	17,004	16,561±2,608
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	245,177	13,514	9,652	12,336	11,834±1,979
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	306,472	5,405	6,306	8,289	6,667±1,475

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

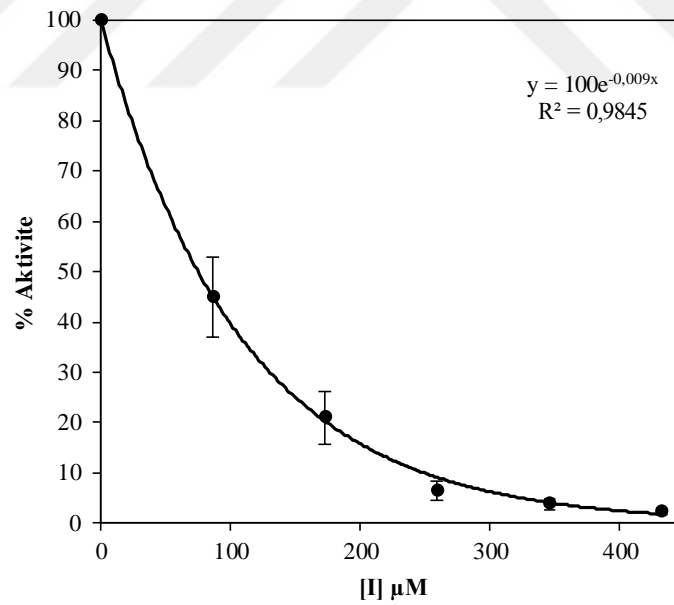


Şekil 5.16. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK2** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.13. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK3** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	86,564	45,946	36,757	52,510	45,071±7,913
BK3	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	173,128	21,376	15,676	26,126	21,059±5,232
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	259,692	6,634	4,633	8,461	6,576±1,914
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	346,256	3,904	2,703	5,019	3,875±1,159
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	432,820	2,354	1,622	3,041	2,339±0,710

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

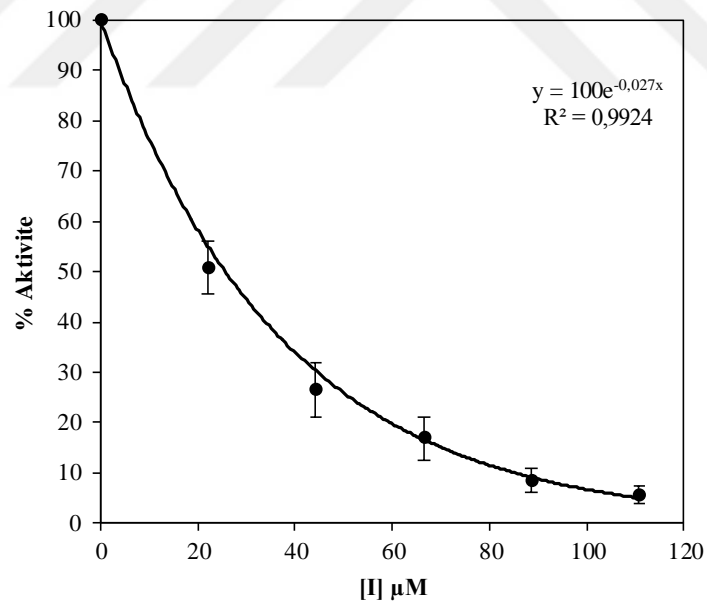


Şekil 5.17. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.14. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK6** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	22,164	47,368	48,000	56,842	50,737±5,297
BK6	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	44,327	24,812	22,000	32,566	26,459±5,472
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	66,490	15,789	13,333	21,531	16,885±4,207
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	88,654	7,895	6,400	11,146	8,480±2,426
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	110,817	5,263	4,211	7,519	5,664±1,690

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

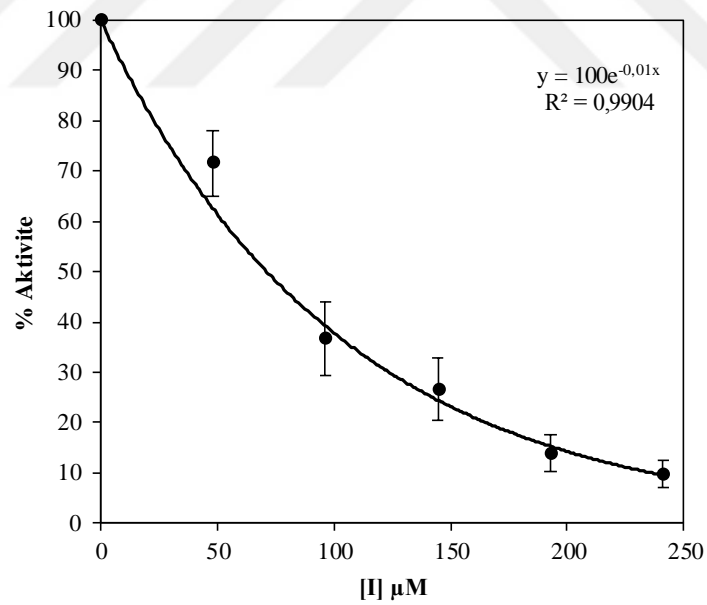


Şekil 5.18. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK6** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.15. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK7** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	48,209	72,656	64,583	77,500	71,580±6,525
BK7	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	96,418	37,500	29,167	43,750	36,806±7,316
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	144,626	27,083	20,313	32,500	26,632±6,106
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	192,835	14,063	10,096	17,500	13,886±3,705
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	241,044	9,927	7,031	12,500	9,819±2,736

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

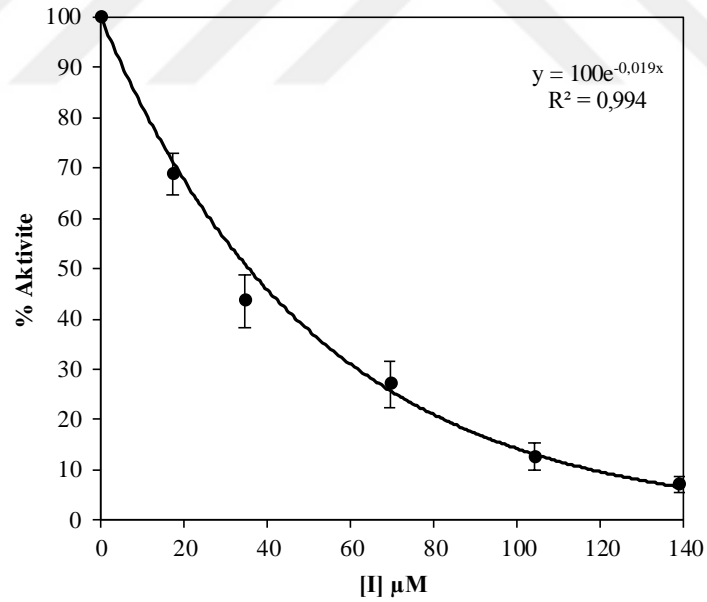


Şekil 5.19. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK7** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.16. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK1** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	17,358	73,404	65,248	67,790	68,814±4,173
PTK1	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	34,715	46,809	37,447	46,316	43,524±5,269
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	69,431	29,078	21,809	30,211	27,032±4,559
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	104,146	13,564	9,645	14,737	12,649±2,666
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	138,861	7,493	5,222	8,289	7,002±1,592

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

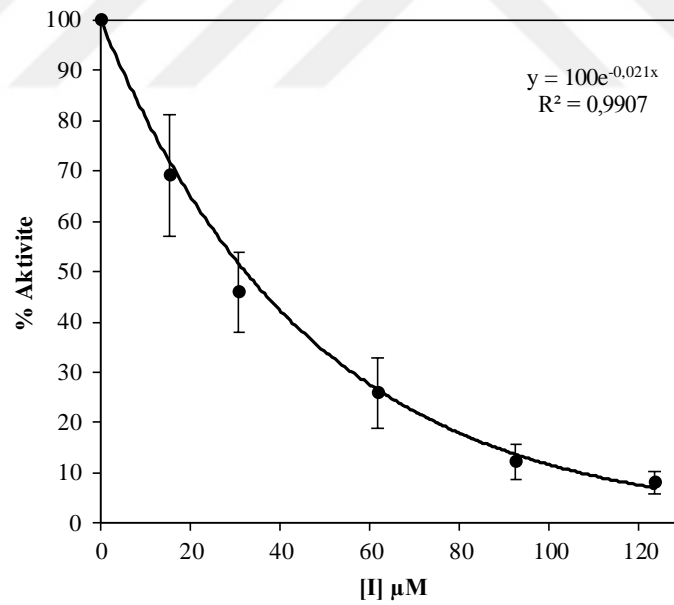


Şekil 5.20. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK1** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.17. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK2** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	15,433	73,404	55,319	78,298	69,007±12,104
PTK 2	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	30,866	46,809	37,447	53,495	45,917±8,061
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	61,733	25,532	18,913	32,827	25,757±6,960
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	92,599	12,391	8,777	15,603	12,257±3,415
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	123,465	8,124	5,674	10,361	8,053±2,344

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

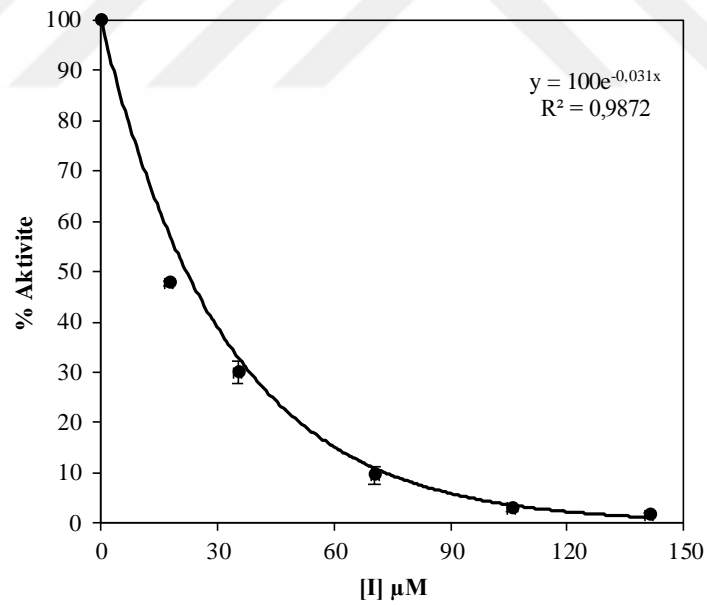


Şekil 5.21. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK2** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.18. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK3** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	17,633	47,674	48,235	47,126	47,679±0,554
PTK3	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	35,266	30,233	27,529	32,200	29,927±2,261
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	70,532	10,299	7,563	10,776	9,546±1,734
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	105,798	3,399	2,222	3,369	2,997±0,671
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	141,064	1,329	1,324	2,029	1,560±0,405

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

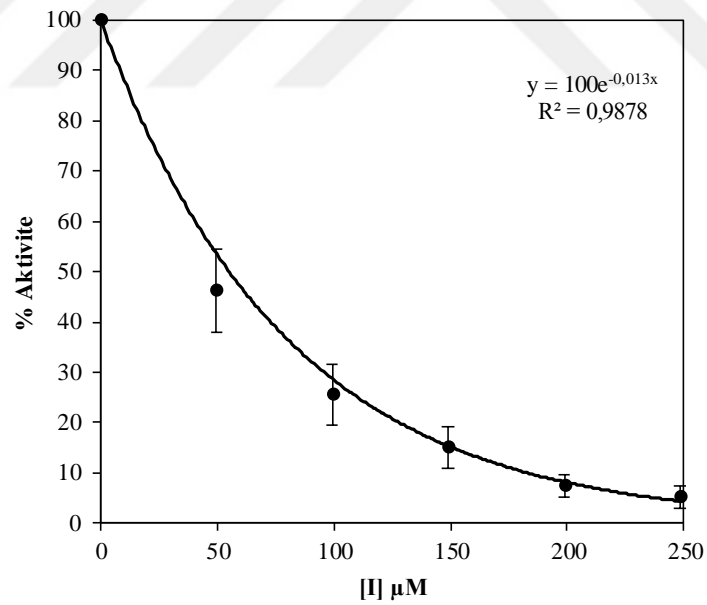


Şekil 5.22. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.19. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK4** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	49,686	47,115	37,692	53,846	46,218±8,114
PTK4	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	99,372	25,962	19,231	31,469	25,554±6,129
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	149,057	15,385	10,989	19,231	15,201±4,124
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	198,743	7,452	5,184	9,539	7,391±2,178
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	248,429	3,846	4,142	7,692	5,227±2,140

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

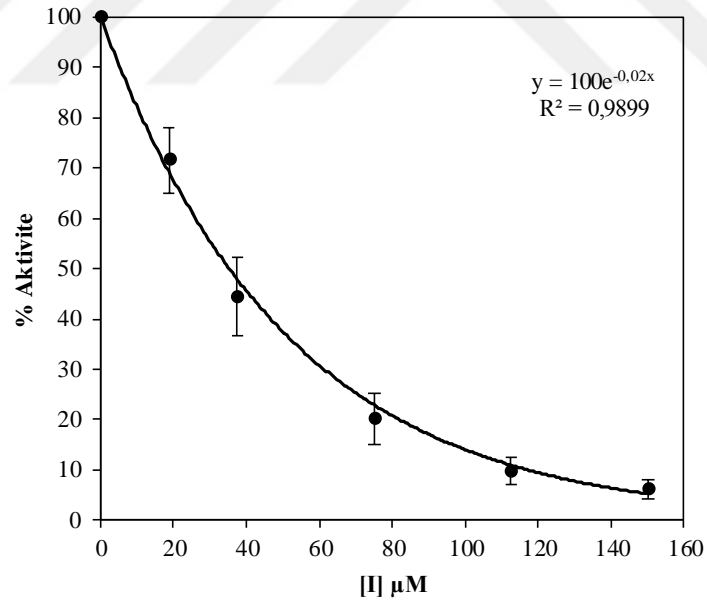


Şekil 5.23. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK4** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.20. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK5** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	18,761	72,656	64,583	77,500	71,580±6,525
PTK5	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	37,522	45,313	36,250	51,786	44,449±7,804
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	75,043	20,455	15,000	25,000	20,152±5,007
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	112,565	9,926	7,031	12,500	9,819±2,736
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	150,087	6,250	4,375	7,955	6,193±1,791

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

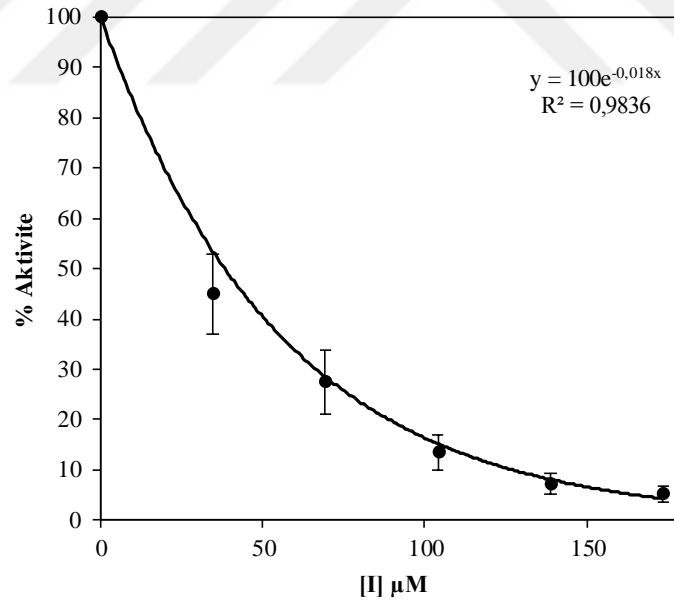


Şekil 5.24. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK5** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.21. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK6** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	34,715	45,946	36,757	52,510	45,071±7,913
PTK6	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	69,431	27,928	20,946	33,514	27,463±6,297
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	104,146	13,514	9,953	16,892	13,453±3,470
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	138,861	7,336	5,135	9,337	7,269±2,102
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	173,576	5,405	3,760	6,919	5,362±1,580

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)



Şekil 5.25. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK6** bileşiğinin etkisi.

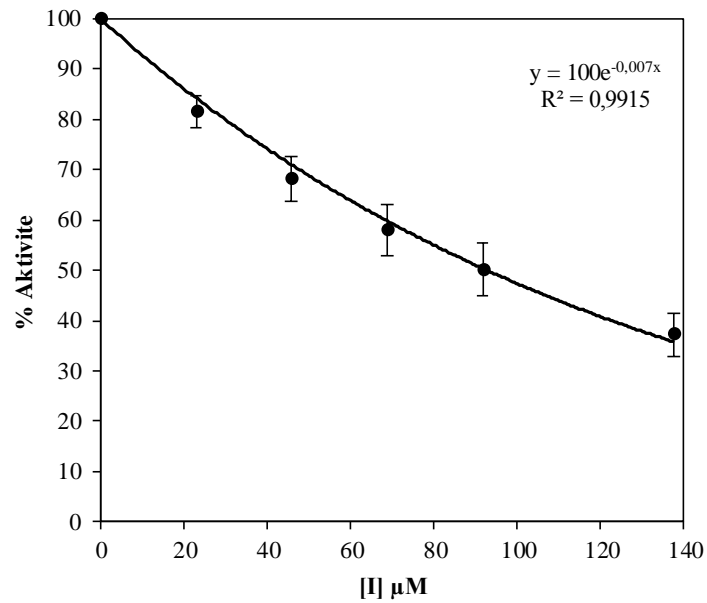
5.2.3. Bileşiklerin CA IX hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi

CA IX izoenzimi üzerinde inhibitör etki gösteren bileşiklere ait deneysel verileri içeren çizelgeler ve bu çizelgelerdeki sonuçlardan elde edilen grafikler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 5.22. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK1** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	Inh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	40,0	250,0	22,927	83,265	77,714	83,265	81,415±3,205
BK1	100,0	10,0	10,0	30,0	250,0	45,854	70,714	62,857	70,714	68,095±4,536
	100,0	10,0	15,0	20,0	250,0	68,781	60,952	52,245	60,952	58,050±5,027
	100,0	10,0	20,0	50,0	250,0	91,708	53,143	44,286	53,143	50,190±5,114
	100,0	10,0	30,0	0,0	250,0	137,562	36,923	33,143	41,429	37,165±4,148

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

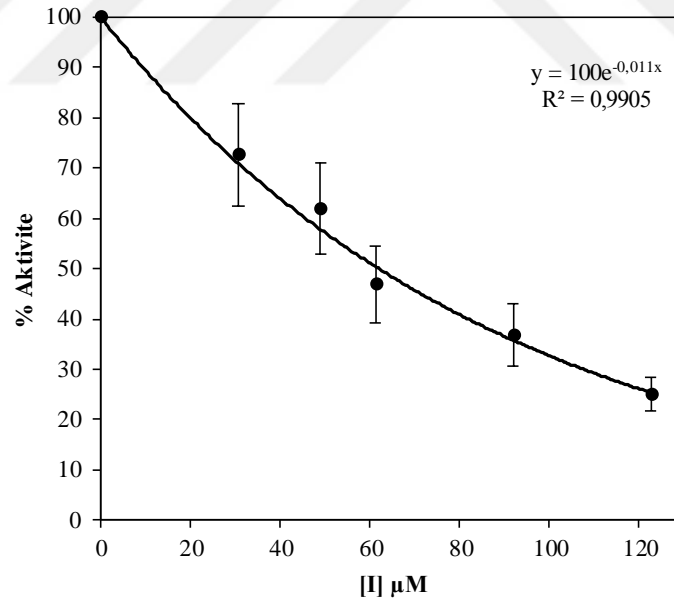


Şekil 5.26. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK1** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.23. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK2** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	30,647	83,517	63,333	71,250	72,700±10,169
BK 2	100,0	10,0	8,0	42,0	250,0	49,036	71,154	52,857	61,667	61,893±9,150
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	61,294	53,846	38,889	47,727	46,821±7,520
	100,0	10,0	15,0	35,0	250,0	91,942	42,308	30,000	38,077	36,795±6,253
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	122,589	25,339	21,429	28,125	24,964±3,364

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

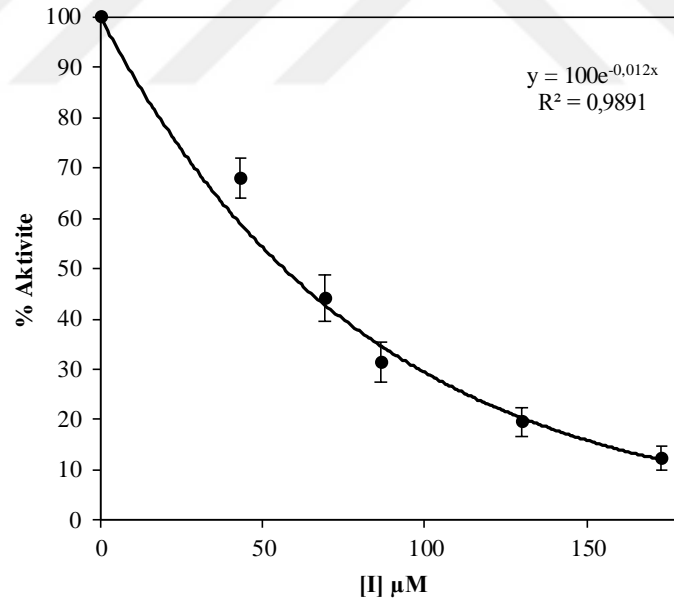


Şekil 5.27. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK2** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.24. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK3** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	Inh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	43,282	68,254	63,704	71,667	67,875±3,995
BK3	100,0	10,0	8,0	42,0	250,0	69,251	44,444	39,506	48,485	44,145±4,497
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	86,564	31,624	27,407	35,238	31,423±3,919
	100,0	10,0	15,0	35,0	250,0	129,846	19,753	16,732	22,456	19,647±2,864
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	173,128	11,111	10,909	15,000	12,340±2,306

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

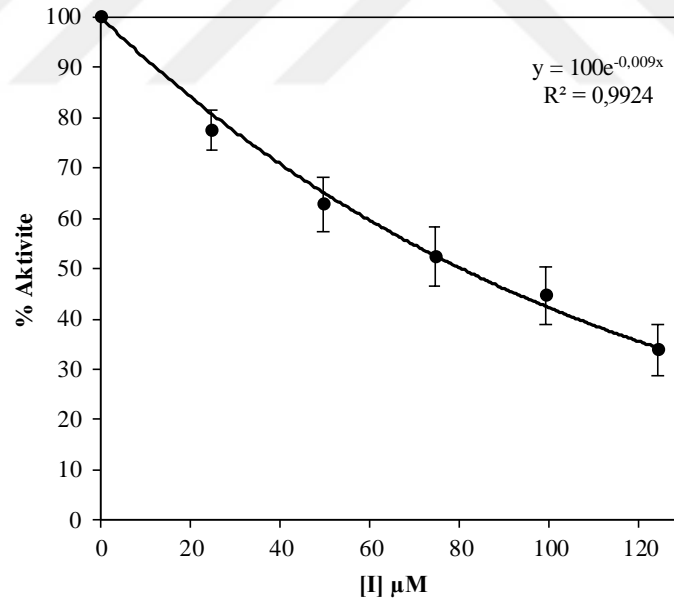


Şekil 5.28. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.25. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK4** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

Inh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	Inh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
.	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	24,823	78,049	73,171	81,301	77,507±4,092
BK 4	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	49,645	63,415	57,073	67,944	62,811±5,461
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	74,468	52,962	46,342	57,927	52,410±5,812
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	99,291	45,122	38,676	50,136	44,645±5,745
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	124,113	34,146	28,455	38,803	33,801±5,182

(Inh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

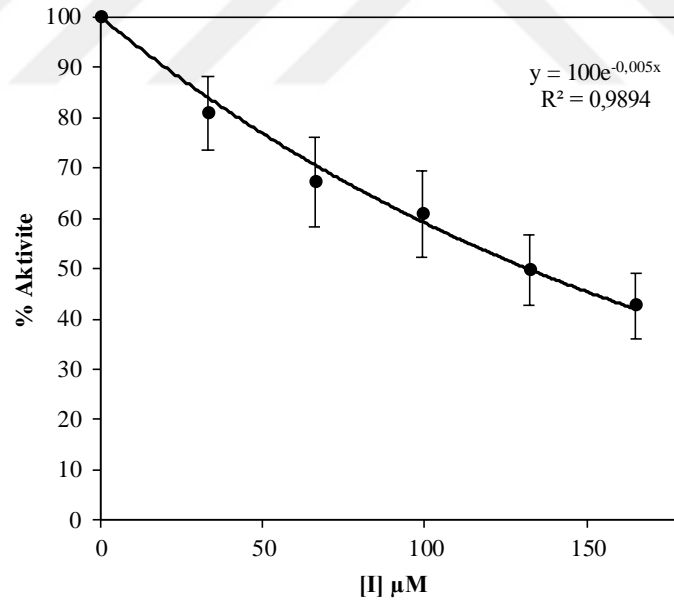


Şekil 5.29. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK4** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.26. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK5** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	33,046	87,805	73,171	81,301	80,759±7,332
BK5	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	66,091	70,067	57,073	74,109	67,083±8,901
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	99,137	63,415	51,220	67,944	60,860±8,650
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	132,182	45,122	46,342	57,927	49,797±7,067
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	165,228	39,024	38,676	50,136	42,612±6,518

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

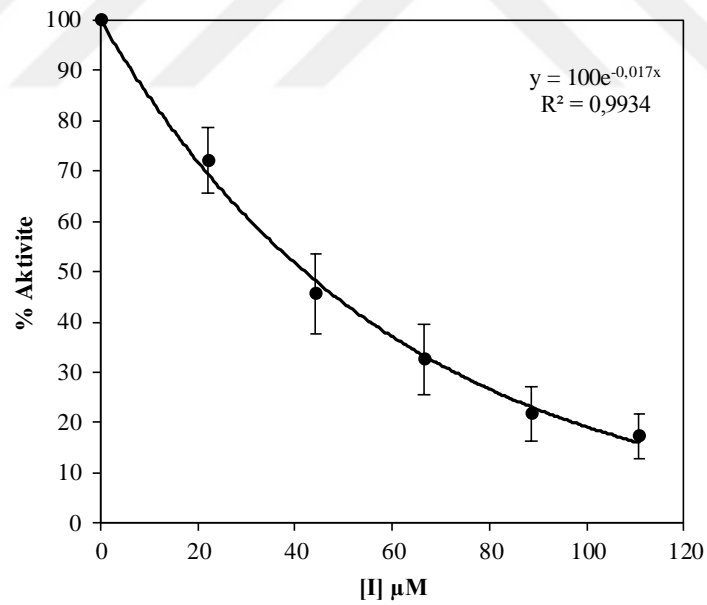


Şekil 5.30. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK5** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.27. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK6** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	22,164	73,214	65,079	78,095	72,130±6,575
BK6	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	44,327	46,429	37,143	53,061	45,544±7,996
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	66,490	33,036	25,170	39,153	32,453±7,010
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	88,654	22,078	16,191	26,984	21,751±5,404
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	110,817	17,582	12,698	21,769	17,350±4,540

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

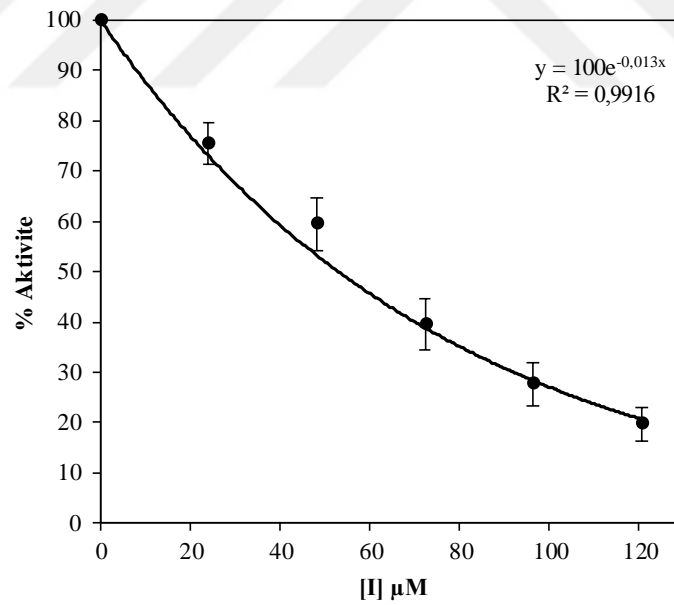


Şekil 5.31. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK6** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.28. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK7** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	24,104	76,000	71,250	79,167	75,472±3,985
BK7	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	48,209	60,000	54,000	64,286	59,429±5,167
	100,0	10,0	15,0	35,0	250,0	72,313	40,000	34,286	44,444	39,577±5,093
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	96,418	28,000	23,333	31,818	27,717±4,250
	100,0	10,0	25,0	25,0	250,0	120,522	20,000	16,364	23,077	19,814±3,361

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

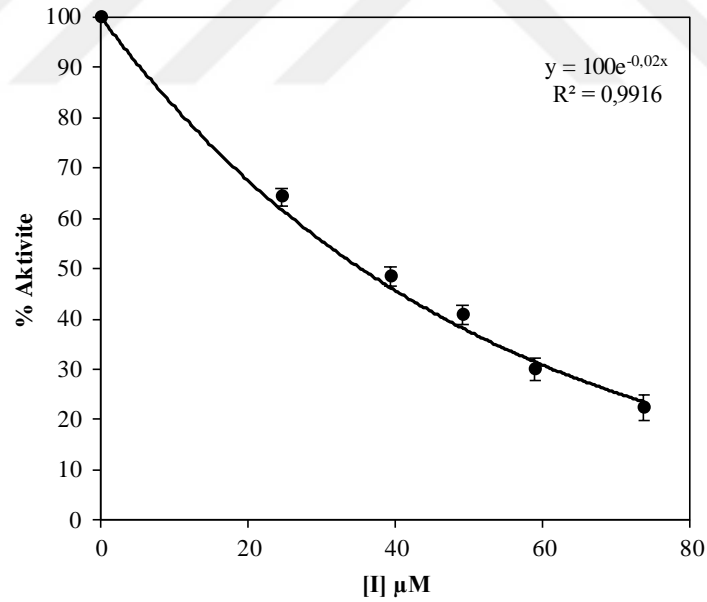


Şekil 5.32. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK7** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.29. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK1** bileşiminin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	24,587	64,286	62,308	66,000	64,198±1,848
PTK1	100,0	10,0	8,0	42,0	250,0	39,339	48,529	46,406	50,417	48,451±2,006
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	49,174	40,790	38,750	42,625	40,721±1,938
	100,0	10,0	12,0	38,0	250,0	59,009	31,818	27,614	30,938	30,123±2,217
	100,0	10,0	15,0	35,0	250,0	73,761	25,000	19,904	22,589	22,498±2,549

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

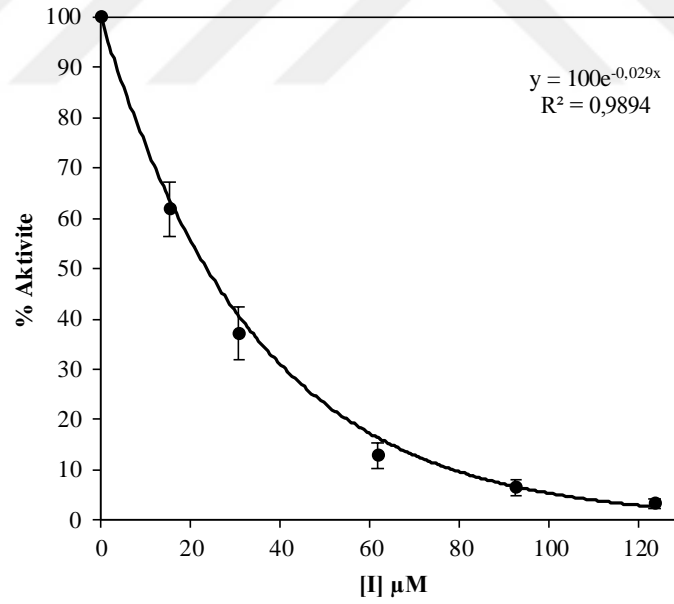


Şekil 5.33. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK1** bileşiminin etkisi.

Çizelge 5.30. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK2** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	15,433	62,500	56,250	66,964	61,905±5,382
PTK2	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	30,866	37,500	31,641	42,188	37,109±5,284
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	61,733	13,971	9,927	14,803	12,890±2,609
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	92,599	5,500	5,540	8,464	6,501±1,700
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	123,465	2,500	2,778	4,310	3,196±0,975

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

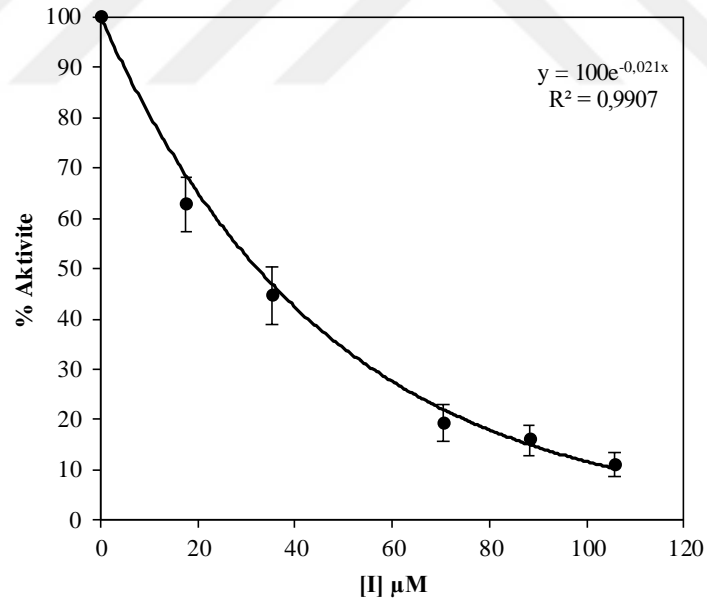


Şekil 5.34. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK2** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.31. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK3** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	17,633	63,415	57,073	67,944	62,811±5,461
PTK3	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	35,266	45,122	38,676	50,136	44,645±5,745
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	70,532	19,512	15,679	22,866	19,353±3,596
	100,0	10,0	25,0	25,0	250,0	88,165	16,069	12,805	18,970	15,948±3,084
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	105,798	11,150	8,781	13,304	11,078±2,262

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

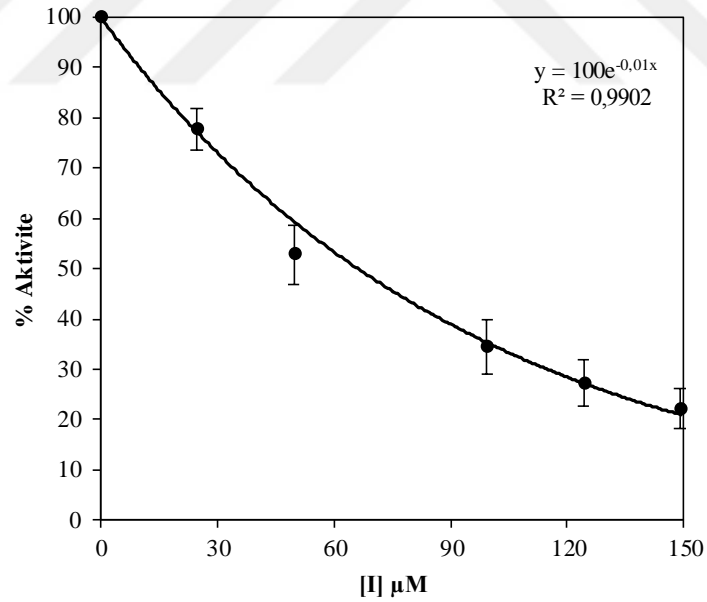


Şekil 5.35. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.32. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK4** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	24,843	78,261	73,370	81,522	77,717±4,103
PTK 4	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	49,686	53,416	46,739	58,424	52,860±5,862
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	99,372	34,783	28,986	39,526	34,431±5,279
	100,0	10,0	25,0	25,0	250,0	124,214	27,536	22,530	31,773	27,280±4,627
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	149,057	22,360	18,060	26,087	22,169±4,017

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

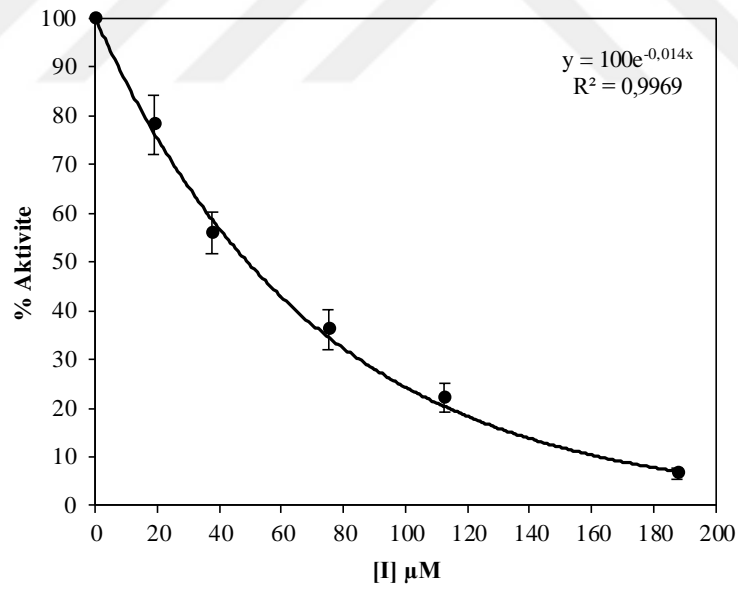


Şekil 5.36. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK4** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.33. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK5** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	Inh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	18,761	80,556	71,333	82,857	78,249±6,098
PTK 5	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	37,522	56,250	51,429	60,000	55,893±4,297
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	75,043	36,364	32,000	40,000	36,121±4,006
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	112,565	22,222	19,048	25,000	22,090±2,978
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	187,609	6,667	5,556	7,692	6,638±1,069

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

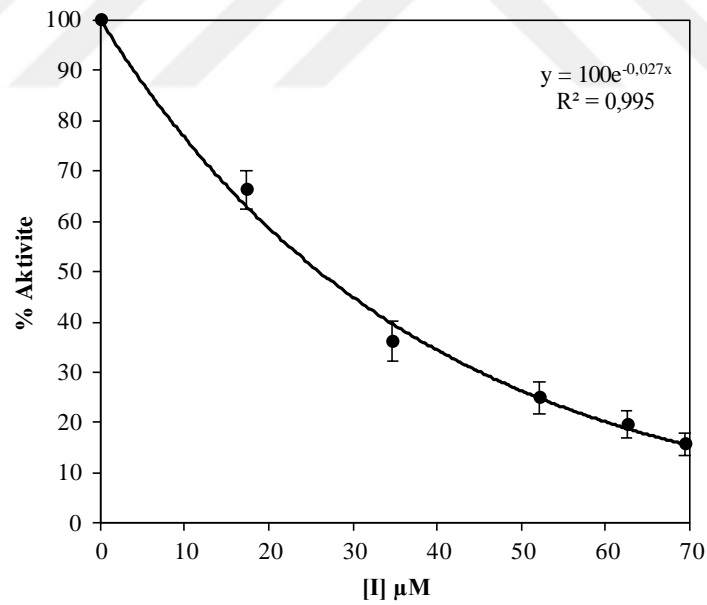


Şekil 5.37. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK5** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.34. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK6** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	17,358	66,667	62,222	70,000	66,296±3,902
PTK6	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	34,715	36,364	32,000	40,000	36,121±4,006
	100,0	10,0	15,0	35,0	250,0	52,073	25,000	21,539	28,000	24,846±3,234
	100,0	10,0	18,0	32,0	250,0	62,488	19,792	16,889	22,353	19,678±2,734
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	69,431	15,741	13,333	17,895	15,656±2,282

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)



Şekil 5.38. CA IX izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK6** bileşiğinin etkisi.

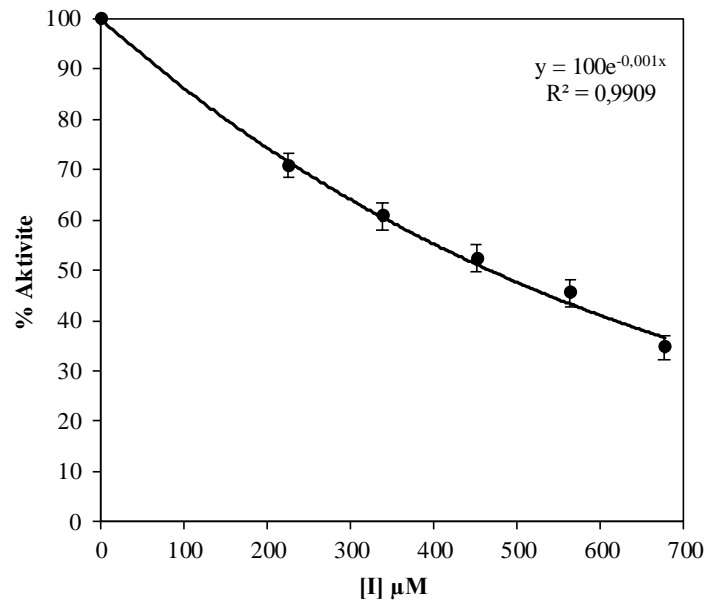
5.2.4. Bileşiklerin CA XII hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi

CA XII izoenzimi üzerinde inhibitör etki gösteren bileşiklere ait deneysel verileri içeren çizelgeler ve bu çizelgelerdeki sonuçlardan elde edilen grafikler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 5.35. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **B2** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	225,543	71,015	68,478	73,044	70,845±2,287
B2	100,0	10,0	15,0	35,0	250,0	338,315	60,870	57,971	63,241	60,694±2,639
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	451,086	52,569	49,565	55,073	52,402±2,757
	100,0	10,0	25,0	25,0	250,0	563,858	45,652	42,688	48,161	45,500±2,740
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	676,630	34,783	32,107	37,102	34,664±2,499

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

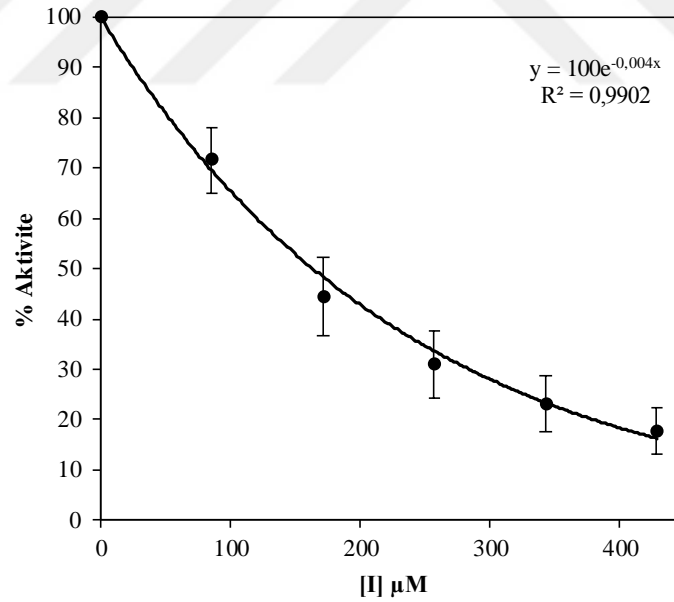


Şekil 5.39. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **B2** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.36. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **T1** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	85,842	72,656	64,583	77,500	71,580±6,525
T1	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	171,684	45,313	36,250	51,786	44,449±7,804
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	257,526	31,641	24,107	37,500	31,083±6,714
	100,0	10,0	40,0	10,0	250,0	343,367	23,438	17,361	28,409	23,069±5,533
	100,0	10,0	50,0	0,0	250,0	429,209	17,969	13,068	22,115	17,717±4,529

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

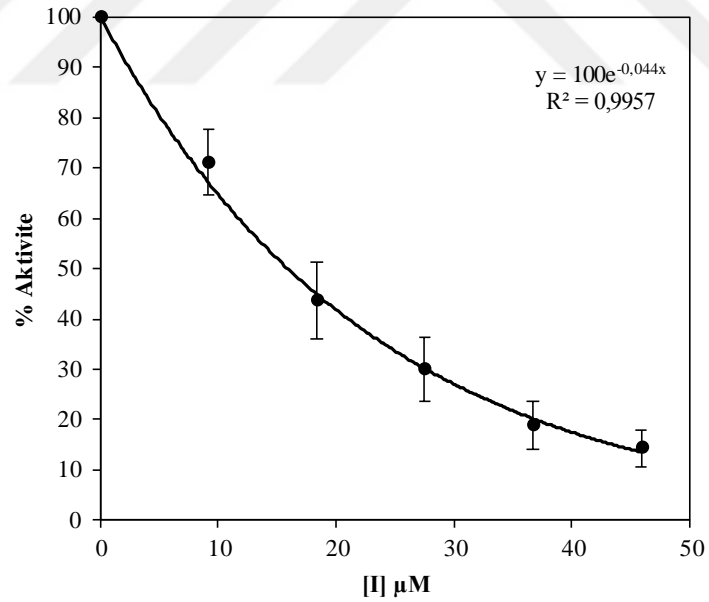


Şekil 5.40. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **T1** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.37. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK1** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	2,0	48,0	250,0	9,171	72,222	64,198	77,037	71,152±6,486
BK1	100,0	10,0	4,0	46,0	250,0	18,342	44,444	35,556	50,794	43,598±7,654
	100,0	10,0	6,0	44,0	250,0	27,513	30,556	23,280	36,214	30,017±6,484
	100,0	10,0	8,0	42,0	250,0	36,683	19,192	14,074	23,457	18,908±4,698
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	45,854	14,530	10,494	17,989	14,338±3,752

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

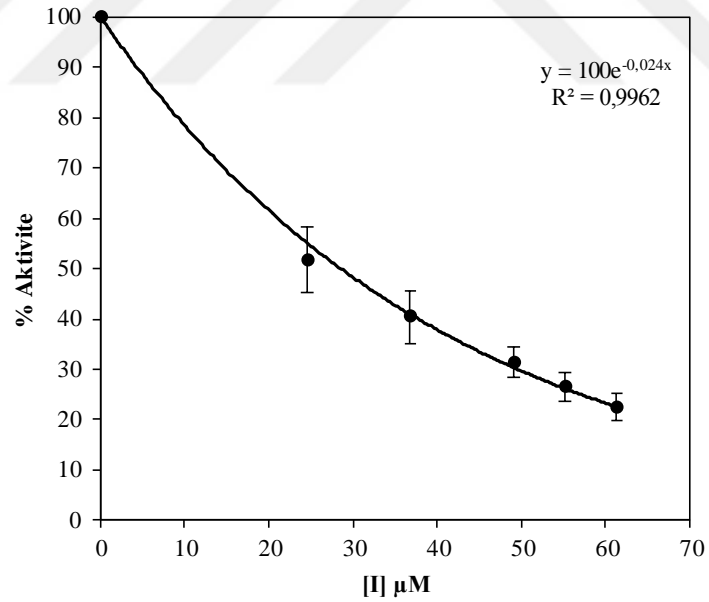


Şekil 5.41. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK1** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.38. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK2** bileşiminin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	4,0	46,0	250,0	24,518	56,250	44,186	54,546	51,661±6,529
BK2	100,0	10,0	6,0	44,0	250,0	36,777	45,313	34,883	40,909	40,368±5,235
	100,0	10,0	8,0	42,0	250,0	49,035	31,641	28,239	34,343	31,408±3,059
	100,0	10,0	9,0	41,0	250,0	55,165	27,083	23,256	29,091	26,477±2,965
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	61,294	23,438	19,380	24,793	22,537±2,817

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

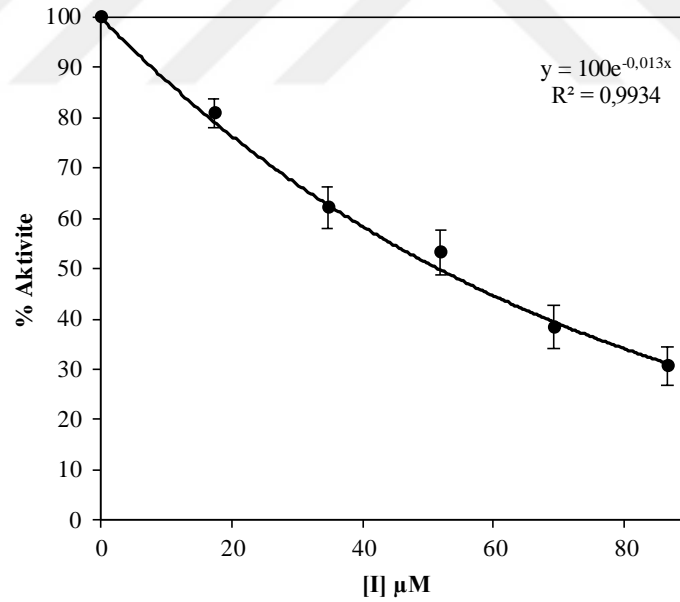


Şekil 5.42. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK2** bileşiminin etkisi.

Çizelge 5.39. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK3** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	Inh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	2,0	48,0	250,0	17,313	81,250	78,000	83,571	80,941±2,799
BK3	100,0	10,0	4,0	46,0	250,0	34,626	62,500	57,692	66,177	62,123±4,255
	100,0	10,0	6,0	44,0	250,0	51,938	53,677	48,667	57,632	53,325±4,493
	100,0	10,0	8,0	42,0	250,0	69,251	38,636	34,000	42,500	38,379±4,256
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	86,564	30,769	26,667	34,286	30,574±3,813

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

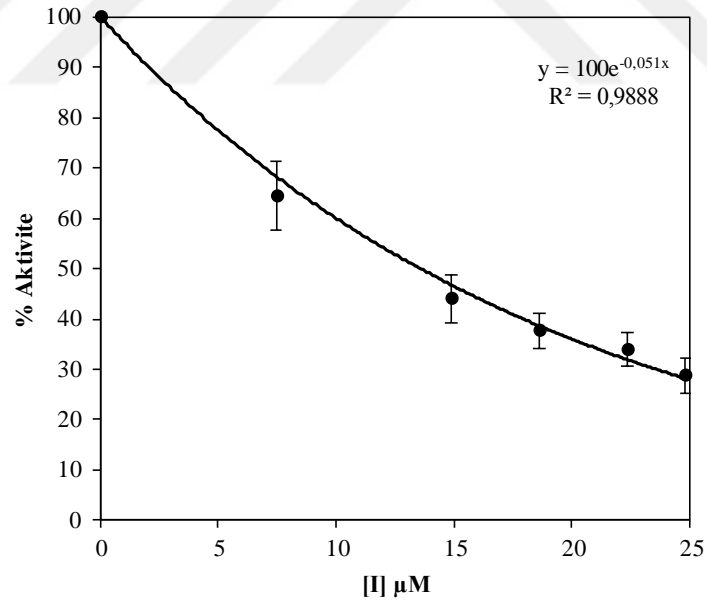


Şekil 5.43. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.40. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK4** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	3,0	47,0	250,0	7,447	71,154	57,692	64,615	64,487±6,732
BK4	100,0	10,0	6,0	44,0	250,0	14,894	47,553	38,462	45,562	43,859±4,779
	100,0	10,0	7,5	42,5	250,0	18,617	37,870	34,188	41,026	37,695±3,422
	100,0	10,0	9,0	41,0	250,0	22,340	34,066	30,572	37,094	33,911±3,264
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	24,823	30,769	24,786	30,618	28,725±3,412

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

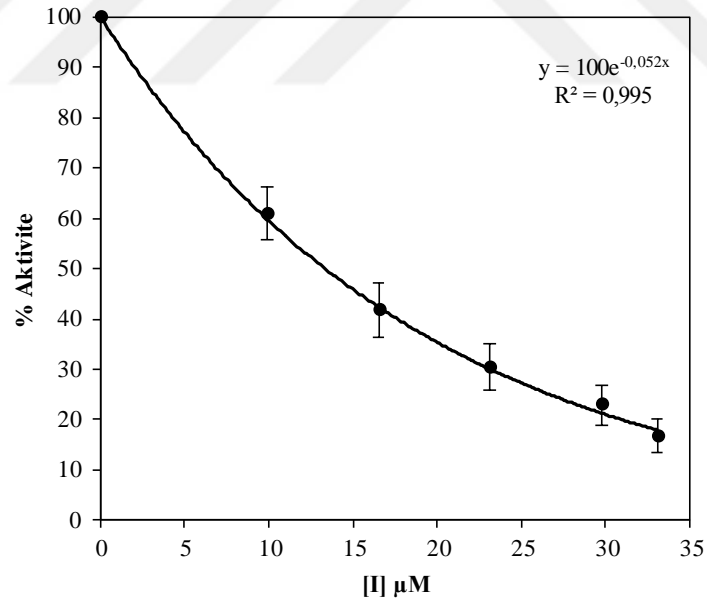


Şekil 5.44. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK4** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.41. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK5** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	3,0	47,0	250,0	9,914	61,539	55,385	65,934	60,952±5,299
BK5	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	16,523	42,308	36,264	47,009	41,860±5,386
	100,0	10,0	7,0	43,0	250,0	23,132	30,769	25,641	34,965	30,458±4,670
	100,0	10,0	9,0	41,0	250,0	29,741	23,077	18,881	26,627	22,862±3,878
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	33,046	15,385	14,201	20,513	16,700±3,355

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

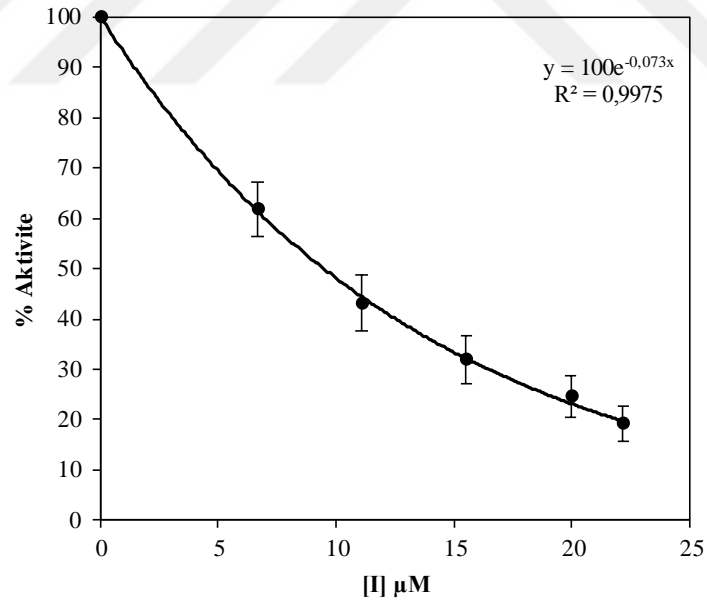


Şekil 5.45. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK5** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.42. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK6** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	3,0	47,0	250,0	6,649	62,366	56,129	66,820	61,772±5,370
BK6	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	11,082	43,548	37,327	48,387	43,088±5,544
	100,0	10,0	7,0	43,0	250,0	15,514	32,258	26,882	36,657	31,932±4,896
	100,0	10,0	9,0	41,0	250,0	19,947	24,731	20,235	28,536	24,501±4,156
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	22,164	19,355	15,633	22,581	19,189±3,477

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

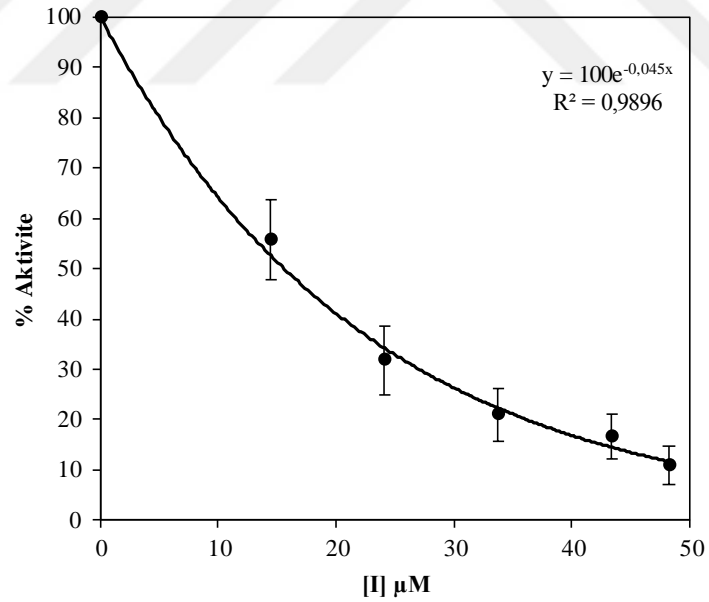


Şekil 5.46. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK6** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.43. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK7** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	3,0	47,0	250,0	14,463	56,757	47,297	63,063	55,706±7,935
BK7	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	24,104	32,432	24,710	38,438	31,860±6,882
	100,0	10,0	7,0	43,0	250,0	33,746	21,376	15,676	26,126	21,059±5,232
	100,0	10,0	9,0	41,0	250,0	43,388	16,840	12,162	20,849	16,617±4,348
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	48,209	8,962	8,649	15,262	10,958±3,731

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

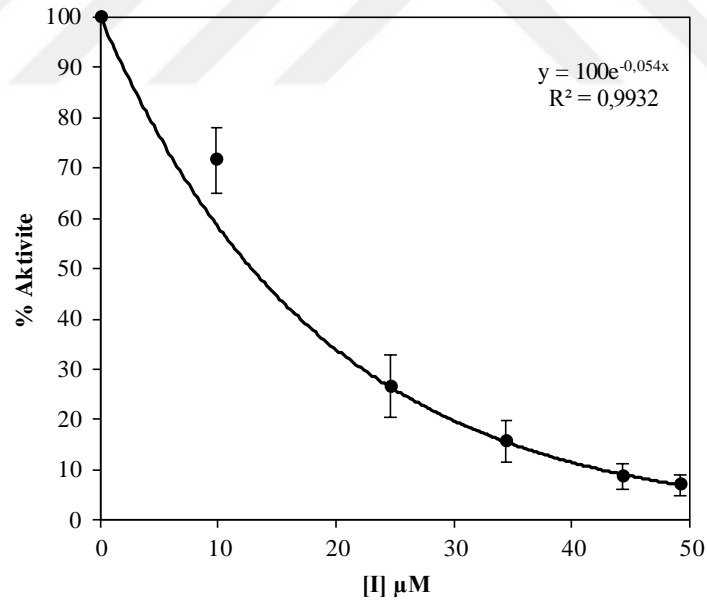


Şekil 5.47 CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **BK7** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.44. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK1** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	2,0	48,0	250,0	9,835	72,656	64,583	77,500	71,580±6,525
PTK 1	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	24,587	27,083	20,313	32,500	26,632±6,106
	100,0	10,0	7,0	43,0	250,0	34,422	15,865	11,458	19,643	15,656±4,096
	100,0	10,0	9,0	41,0	250,0	44,257	8,854	6,250	11,184	8,763±2,468
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	49,174	7,031	4,934	8,929	6,965±1,998

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

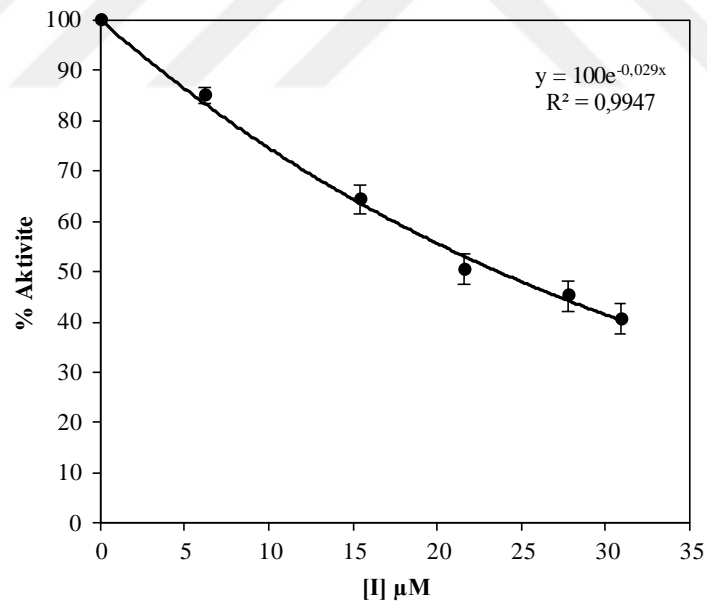


Şekil 5.48. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK1** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.45. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK2** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	2,0	48,0	250,0	6,173	85,197	83,459	86,550	85,069±1,550
PTK 2	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	15,433	64,474	61,404	66,986	64,288±2,796
	100,0	10,0	7,0	43,0	250,0	21,606	50,658	47,368	53,441	50,489±3,040
	100,0	10,0	9,0	41,0	250,0	27,780	45,344	42,105	48,120	45,190±3,011
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	30,866	40,790	37,652	43,509	40,650±2,931

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

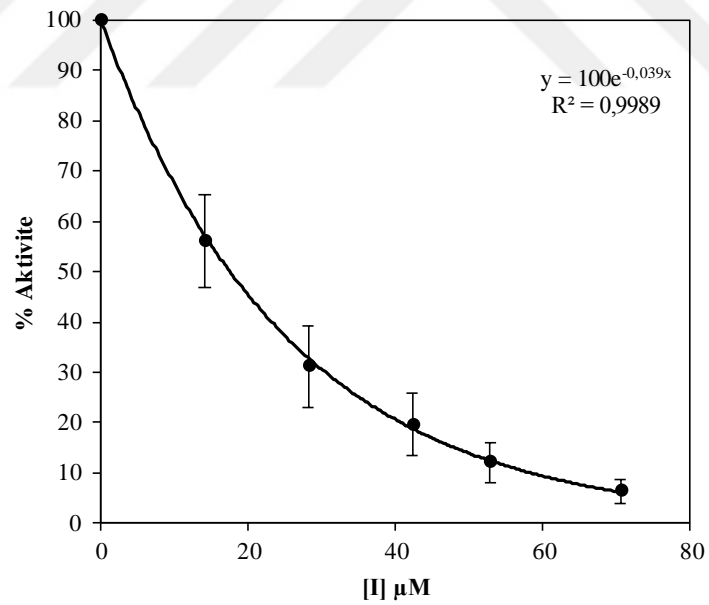


Şekil 5.49. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK2** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.46. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK3** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (μL)	Enz. (μL)	İnh. (μL)	Su (μL)	Sub. (μL)	[I] μM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. \pm Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000 \pm 0,000
	100,0	10,0	4,0	46,0	250,0	14,106	62,366	45,455	60,606	56,142 \pm 9,297
PTK 3	100,0	10,0	8,0	42,0	250,0	28,213	37,276	22,078	34,343	31,232 \pm 8,063
	100,0	10,0	12,0	38,0	250,0	42,319	24,731	12,727	21,212	19,557 \pm 6,171
	100,0	10,0	15,0	35,0	250,0	52,899	15,323	7,692	13,333	12,116 \pm 3,958
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	70,532	8,602	3,743	6,699	6,348 \pm 2,448

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

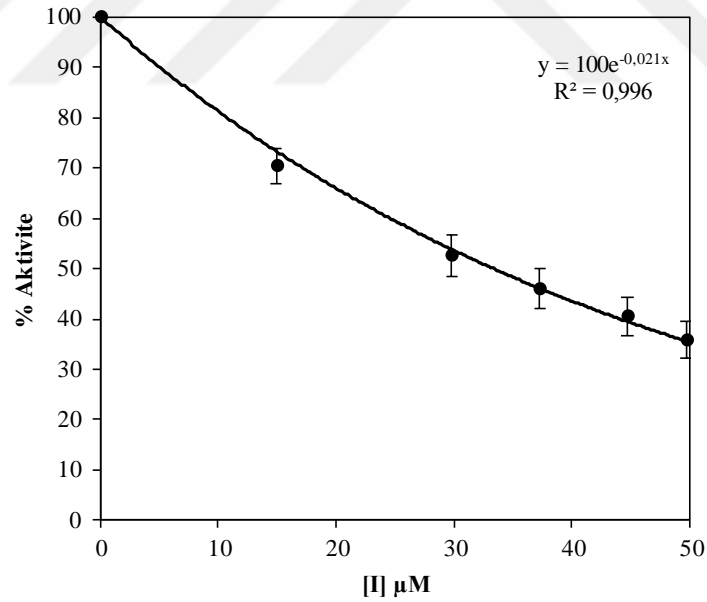


Şekil 5.50. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.47. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK4** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (µL)	Enz. (µL)	İnh. (µL)	Su (µL)	Sub. (µL)	[I] µM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. ±Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000±0,000
	100,0	10,0	3,0	47,0	250,0	14,906	72,414	66,503	72,414	70,443±3,413
PTK4	100,0	10,0	6,0	44,0	250,0	29,812	54,859	47,893	54,859	52,537±4,022
	100,0	10,0	7,5	42,5	250,0	37,264	48,276	41,379	48,276	45,977±3,982
	100,0	10,0	9,0	41,0	250,0	44,717	42,706	36,050	42,706	40,487±3,843
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	49,686	37,931	31,609	37,931	35,824±3,650

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

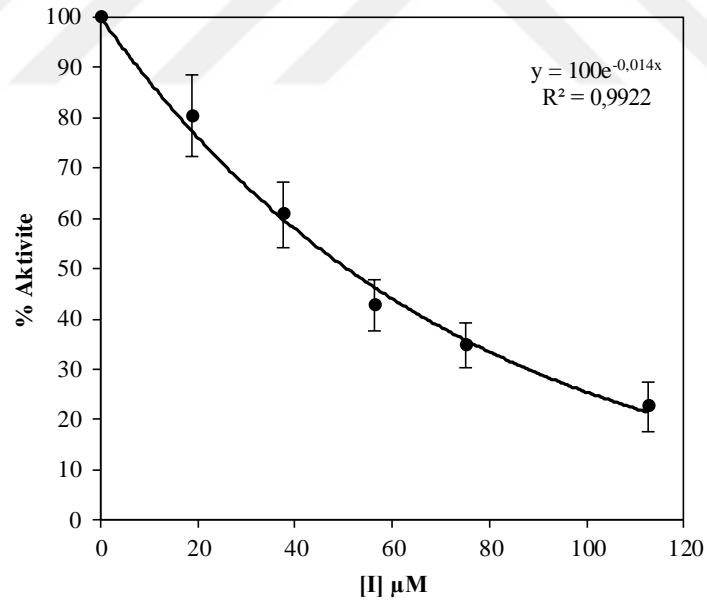


Şekil 5.51. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK4** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.48. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK5** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (μL)	Enz. (μL)	İnh. (μL)	Su (μL)	Sub. (μL)	[I] μM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. \pm Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000 \pm 0,000
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	18,761	71,154	83,459	86,550	80,387 \pm 8,145
PTK 5	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	37,522	53,846	61,404	66,986	60,745 \pm 6,594
	100,0	10,0	15,0	35,0	250,0	56,283	37,870	42,105	48,120	42,699 \pm 5,151
	100,0	10,0	20,0	30,0	250,0	75,043	30,769	33,835	39,474	34,693 \pm 4,415
	100,0	10,0	30,0	20,0	250,0	112,565	17,582	22,807	27,368	22,586 \pm 4,897

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)

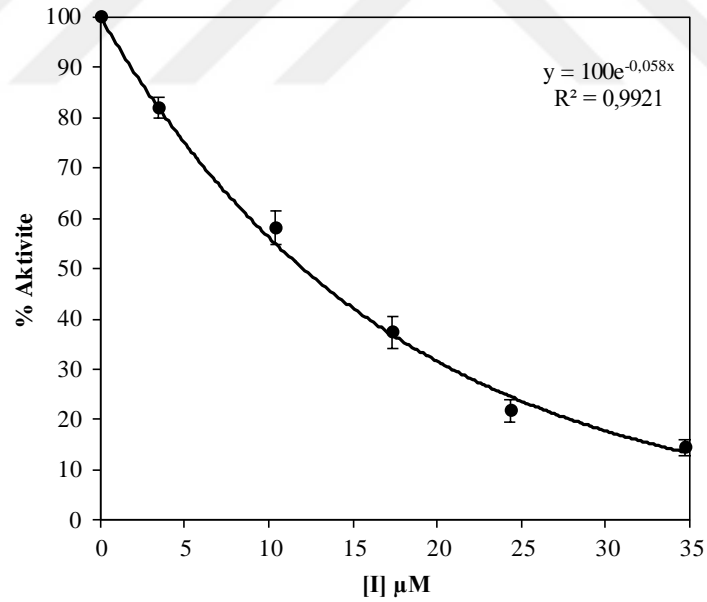


Şekil 5.52. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK5** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.49. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK6** bileşiğinin etkisinin incelenmesi üzerine yapılan ölçümler ve elde edilen sonuçlar.

İnh.	Tampon (μL)	Enz. (μL)	İnh. (μL)	Su (μL)	Sub. (μL)	[I] μM	% Akt. (1. Ölç.)	% Akt. (2. Ölç.)	% Akt. (3. Ölç.)	% Akt. \pm Std. sp.
	100,0	-	-	60,0	250,0	-	-	-	-	-
	100,0	10,0	-	50,0	250,0	0,000	100,000	100,000	100,000	100,000 \pm 0,000
	100,0	10,0	1,0	49,0	250,0	3,472	82,143	79,861	83,854	81,953 \pm 2,003
PTK 6	100,0	10,0	3,0	47,0	250,0	10,415	58,333	54,688	61,250	58,090 \pm 3,288
	100,0	10,0	5,0	45,0	250,0	17,358	37,500	34,091	40,385	37,325 \pm 3,151
	100,0	10,0	7,0	43,0	250,0	24,301	21,875	19,444	24,020	21,780 \pm 2,289
	100,0	10,0	10,0	40,0	250,0	34,715	14,474	12,732	16,042	14,416 \pm 1,656

(İnh.: İnhibitör, Enz.: Enzim, Sub.: Substrat, Akt.: Aktivite, Ölç.: Ölçüm, Std. sp.: Standart sapma)



Şekil 5.53. CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **PTK6** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.50. Bileşiklerin hidrataz IC₅₀ değerleri.

Bileşik	Hidrataz IC ₅₀ (µM)*			
	hCA I	hCA II	CA IX	CA XII
B2	-	-	-	693,147
T1	-	-	-	173,287
BK1	49,511	49,510	99,021	17,753
BK2	-	77,016	63,012	28,881
BK3	99,020	77,025	57,761	53,317
BK4	-	-	77,014	13,591
BK5	-	-	138,629	13,330
BK6	21,005	25,672	40,773	9,495
BK7	-	69,315	53,320	15,403
PTK1	63,013	36,481	34,658	12,836
PTK2	38,508	33,007	23,902	23,901
PTK3	34,657	22,360	33,008	17,773
PTK4	57,762	53,318	69,314	33,005
PTK5	53,319	34,656	49,511	49,512
PTK6	15,068	38,507	25,671	11,951

*Üç farklı aktivite ölçümü sonucu elde edilen grafiğin denklemi baz alınarak hesaplanmıştır.

5.3. Sentezlenen Bileşiklerin hCA I, hCA II, CA IX ve CA XII İzoenzimlerinin Esteraz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerine İlişkin Sonuçlar

Bileşiklerin esteraz aktiviteleri insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerinde incelenmiş ve proton transfer tuzları (**PT1–PT6**) ile proton transfer tuzu komplekslerinin (**PTK1–PTK6**) bu iki izoenzim üzerinde inhibisyon etkisine sahip oldukları gözlenmiştir. Benzer şekilde CA IX ve CA XII izoenzimleri ile de esteraz aktivitesi çalışılmak istenmiş, ancak bu iki izoenzim çok zayıf oranda esteraz aktivitesi göstermiştir. Bu durum inhibisyon kinetiği çalışması için uygun olmadığından bileşiklerin CA IX ve CA XII izoenzimleri ile olan esteraz çalışması yapılamamıştır. Tez çalışmasının asıl amacı olan CA IX ve CA XII üzerindeki inhibisyon, bu iki izoenzimin esteraz aktivitesi açısından incelenemediğinden hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitelerinin inhibisyon değerleri burada belirtilmemiştir.

6. TARTIŞMA

Karbonik anhidrazlar (EC 4.2.1.1) karbon dioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizleyen ve özellikle α sınıfına ait olanları oldukça iyi karakterize edilmiş olan metaloenzimlerdir. Katalizledikleri reaksiyon itibariyle pek çok fizyolojik süreçte rol alan CA enzimlerinin çeşitli metabolik bozukluklar veya hastalıklar ile de ilişkili olması beklenen bir durumdur (Alterio vd., 2012). Kanser ise kontrolsüz hücre bölünmesi sonucu ortaya çıkan ve sebep olduğu ölüm oranı nedeniyle yeni tedavi stratejilerinin, yeni ilaçların geliştirilmesi için üzerinde bilim insanlarının yoğun olarak çalıştığı bir hastalıktır.

Bu çalışmada insan eritrosit karbonik anhidraz enzimleri olan hCA I ve hCA II Sepharose[®]4B-L-tirozin-p-aminobenzensülfonamit afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. İnsan rekombinant CA IX ve CA XII izoenzimi ise hazır olarak temin edildi. Daha sonra sentezlenen bileşiklerin bu dört izoenzim üzerindeki inhibisyon etkileri in vitro olarak incelendi.

Afinite jeli ise CNBr aktifleştirilmiş Sepharose[®]4B kullanılarak sentezlendi. Öncelikle CNBr aktifleştirilmiş Sepharose[®]4B matrisine L-tirozin uzantı kolu bağlandı. Daha sonra dizolanmış sülfanilamit tirozine kenetlendirildi. Sülfanilamit CA inhibitörü olduğundan burada ligant olarak kullanıldı. Tirozin ise enzimin ligant olarak kullanılan sülfanilamitle daha iyi etkileşimini sağlayabilmek için uzantı kolu olarak seçildi (O'Connor ve Maslen, 1965; Mostad ve Rømming, 1973). Çünkü enzimin aktif bölgesinin yüzeyden yaklaşık 13 Å derinlikte olduğu X-ışını analizleri ile belirlenmiştir (Alterio vd., 2012). Dolayısıyla afinite jeli ile enzimin iyi etkileşmesi uygun bir uzantı kolunun varlığına bağlıdır.

hCA I ve hCA II izoenzimlerinin elüsyonu sırasıyla 0,025 M Na₂HPO₄/1,0 M NaCl (pH 6,3) çözeltisi ve 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Saflaştırılan enzimlerin SDS-PAGE ile saflıkları kontrol edildi ve tek bant gözlemlendi (Şekil 5.3). hCA I izoenziminin spesifik aktivitesi 1565,12 EU/mg protein olup %45,02 verimle saflaştırıldı. hCA II izoenzimi ise %62,72 verimle saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 3706,30 EU/mg protein olarak belirlendi (Çizelge 5.1).

Afinite kolonundan elüsyonu takip etmek amacıyla yapılan kalitatif protein tayinini takiben elüatlardaki protein miktarını belirlemek için kantitatif protein tayini yapıldı. Kantitatif protein tayini için Bradford metodu kullanıldı. Bu metodun seçilmesinin nedeni hassasiyeti, çok kısa sürede uygulanabilirliği ve protein-boya kompleksinin stabil olmasıdır (Bradford, 1976).

hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla farklı substrat konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. hCA I izoenzimi için K_m değeri 5,380 mM, V_{max} değeri 108,00 $\mu\text{mol.dk}^{-1}$ olarak, hCA II izoenzimi için ise K_m değeri 5,660 mM, V_{max} değeri 189,00 $\mu\text{mol.dk}^{-1}$ olarak hesaplandı (Şekil 5.4 ve Şekil 5.5).

Enzim aktivite tayini için ise hidrataz ve esteraz aktivitesi ölçüm yöntemleri kullanıldı. Wilbur ve Anderson (1948) tarafından geliştirilen ve Maren tarafından (1960) modifiye edilen CO_2 hidrataz aktivitesi metodu, hidrasyon reaksiyonu sonucu açığa çıkan H^+ iyonları sebebiyle pH' ın 8,2 den 6,3 e düşmesi için geçen sürenin ölçümüne dayanan bir yöntemdir (Wilbur ve Anderson, 1948; Maren, 1960). Bu aktivite, CA izoenzimlerinin fizyolojik olarak katalizledikleri bir reaksiyonun ölçümüne dayandığından önemlidir.

Esteraz aktivitesi ölçümü ise bir diğer metottur. Verpoorte vd., (1967) tarafından geliştirilen bu metot karbonik anhidrazın ester bağlarını parçalamasına dayanmaktadır (Verpoorte vd., 1967). Bu metot, CA' nın fizyolojik olarak katalizlediği bir reaksiyona dayanmamaktadır. Ancak hassasiyeti nedeniyle tercih edilmektedir. Fizyolojik açıdan hidrataz aktivitesi metodu daha önemlidir. Karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan 4-nitrofenil asetatı, 348 nm de absorpsiyon veren 4-nitrofenol veya 4-nitrofenolat'a hidroliz etmektedir. 4-nitrofenil asetat suda çözünmediğinden öncelikle az miktar asetonda çözüldü, daha sonra suya yavaş yavaş ilave edildi. Asetonun seçilme nedeni ise ester hidrolizi reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olmasıdır. Bu çalışmada sentezlenen bileşiklerin hCA I ve hCA II esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. CA IX ve CA XII izoenzimleri ise inhibisyon çalışması yapılabilecek düzeyde esteraz aktivitesi göstermemişlerdir. Bu nedenle bu iki izoform üzerinde esteraz aktivitesi çalışması yapılamamıştır. Literatürde yapılan araştırma sonucunda CA IX ve CA XII izoenzimlerinin esteraz aktivitesinin incelendiği sadece bir çalışmaya rastlanmıştır. Uda vd., (2015) tarafından yapılan bu çalışma detaylı incelendiğinde bu izoenzimlerin esteraz aktivitelerinin oldukça düşük olduğu ve yüksek enzim konsantrasyonu gerektirdiği görülmektedir (Uda vd., 2015). Uda vd., (2015) tarafından yapılan çalışma bizim araştırmamızda yeterli düzeyde CA IX ve CA XII esteraz aktivitesi gözleyememiş olmamızı desteklemektedir.

Sentezlenen bileşiklerin, izoenzimlerin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerini ölçmek için, %1,0'lik olarak hazırlanan inhibitör stok çözeltileri, uygun konsantrasyonlarda seyreltilerek kullanıldı. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri ile rekombinant olarak temin edilen CA IX ve CA XII izoenzimleri için beş farklı

inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivitesi ölçümleri yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 5.50).

Bileşiklerin hCA I, hCA II, CA IX ve CA XII izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendiğinde, başlangıç maddelerinin (**B1–B7**), basit tuzların (**T1–T7**) ve proton transfer tuzlarının (**PT1–PT6**) inhibisyon etkisi göstermedikleri, başlangıç kompleksleri (**BK1–BK7**) ile proton transfer tuzu komplekslerinin (**PTK1–PTK6**) ise bu izoenzimler üzerinde inhibisyon potansiyeline sahip oldukları görülmüştür. Ancak ilginç bir şekilde başlangıç maddelerinden **B2** bileşiği ile basit tuzlardan **T1** bileşiği CA XII izoenziminin hidrataz aktivitesini inhibe etmişlerdir. Çizelge 5.50’ deki IC_{50} değerleri incelendiğinde inhibisyon derecesinin mikromolar seviyesinde olduğu ve bileşiklerin oldukça güçlü inhibitörler oldukları göze çarpmaktadır. Ayrıca Çizelge 5.50’ deki değerler, inhibitörlerin CA XII izoenzimine karşı daha seçici davrandıklarını açıkça göstermektedir. Çalışılan enzimler, her ne kadar karbonik anhidraz ailesinin üyesi olsalar da izoenzimlerin amino asit sekanslarındaki farklılıklar (Şekil 2.6 ve Çizelge 6.1) bileşikler ile izoenzimler arasındaki etkileşimin kuvvetini belirleyeceğinden her izoenzim için inhibitörlerden farklı şekilde etkilenmesine neden olurlar.

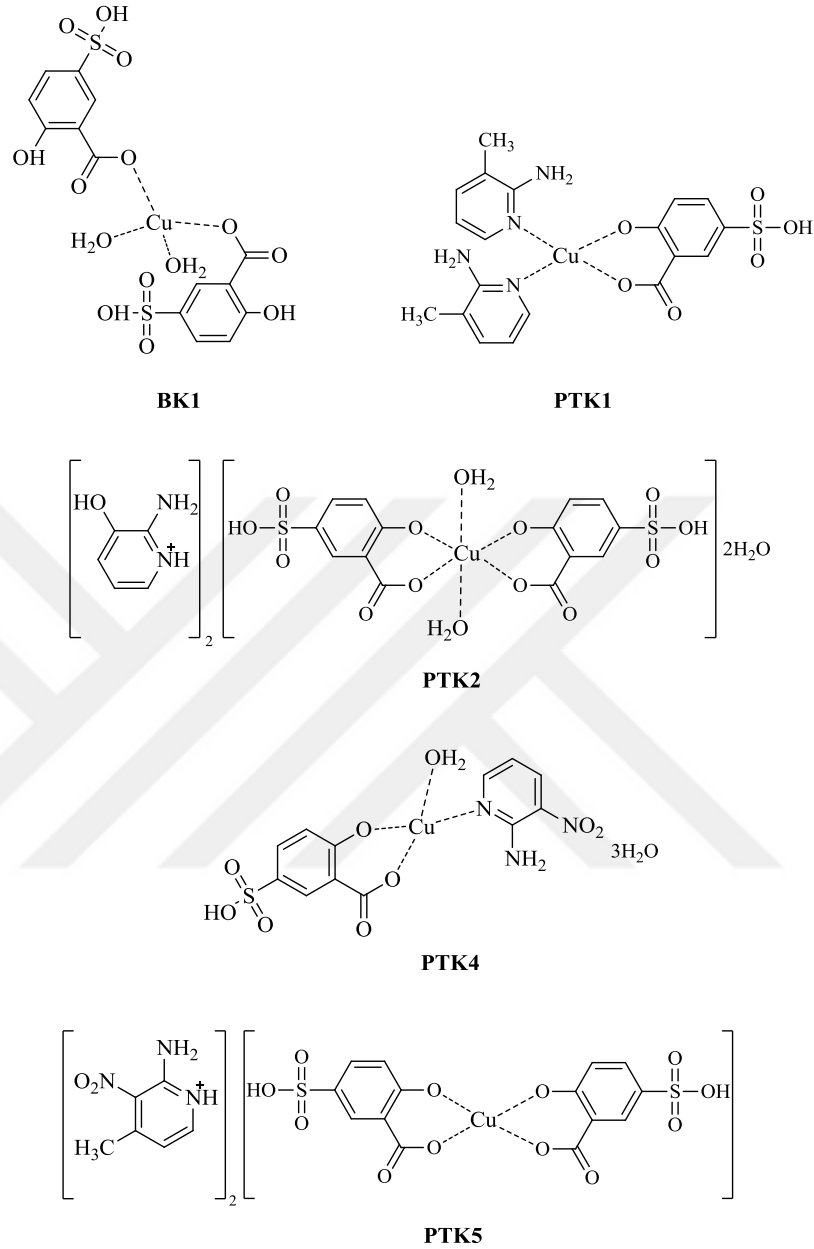
Çizelge 6.1. CA izoenzimlerinin aktif bölge amino asitlerinin kıyaslanması (Bhatt vd., 2017).

Kalıntı Numarası	CA I	CA II	CA IX	CA XII
7	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
62	Val	Asn	Asn	Asn
64	His	His	His	His
65	Ser	Ala	Ser	Ser
67	His	Asn	Gln	Lys
69	Asn	Glu	Thr	Asn
91	Phe	Ile	Leu	Thr
92	Gln	Gln	Gln	Gln
94	His	His	His	His
96	His	His	His	His
119	His	His	His	His
121	Ala	Val	Val	Val
131	Leu	Phe	Val	Ala
135	Ala	Val	Leu	Ser
141	Leu	Leu	Leu	Leu
143	Val	Val	Val	Val
170	Lys	Lys	Glu	Lys
198	Leu	Leu	Leu	Leu
199	Thr	Thr	Thr	Thr
200	His	Thr	Thr	Thr
202	Pro	Pro	Pro	Pro
204	Tyr	Leu	Ala	Asn
207	Val	Val	Val	Val
209	Trp	Trp	Trp	Trp

Buradan hareketle, çeşitli araştırma grupları tarafından özellikle kanser ilişkili CA izoformları olan CA XI ve CA XII' ye karşı seçici inhibisyon özelliğine sahip bileşiklerin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Bazı çalışmalarda klasik CA inhibitörleri olan sülfonamitlerin çeşitli türevlerinin inhibisyon özellikleri incelenmiştir (Supuran, 2008a; Neri ve Supuran, 2011; Supuran, 2012; Alterio vd., 2012), bazılarında ise daha yeni inhibitör türleri olan kumarin, sülfokumarin, poliamin ve fenol türevlerinin inhibisyon özellikleri ve izoenzim seçicilikleri incelenmiştir (Supuran, 2016a, Carta vd., 2010, Tars vd., 2013, Maresca vd., 2009, Touisni vd., 2011).

Proton transfer tuzları ve bu tuzlar ile hazırlanan karışık ligantlı metal komplekslerinin hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki etkileri grubumuz tarafından uzun bir süredir incelenmektedir. Sülfosalisilik asit bileşiğinin ve türevlerinin CA izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğine dair çalışmalar mevcuttur (Bayram vd., 2008, Yenikaya vd., 2011). Ayrıca sülfonik asitlerin CA I ve CA II izoenzimlerini zayıf oranda inhibe ederken, CA IX ve CA XII izoenzimlerini güçlü bir şekilde inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Tars vd., 2013). Bütün bu nedenlerden yola çıkılarak bu tez çalışmasında sülfosalisilik asit proton transfer tuzlarının karışık ligantlı kompleksleri sentezlenmiş ve CA izoenzimleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çizelge 5.50 daha detaylı incelenecek olursa;

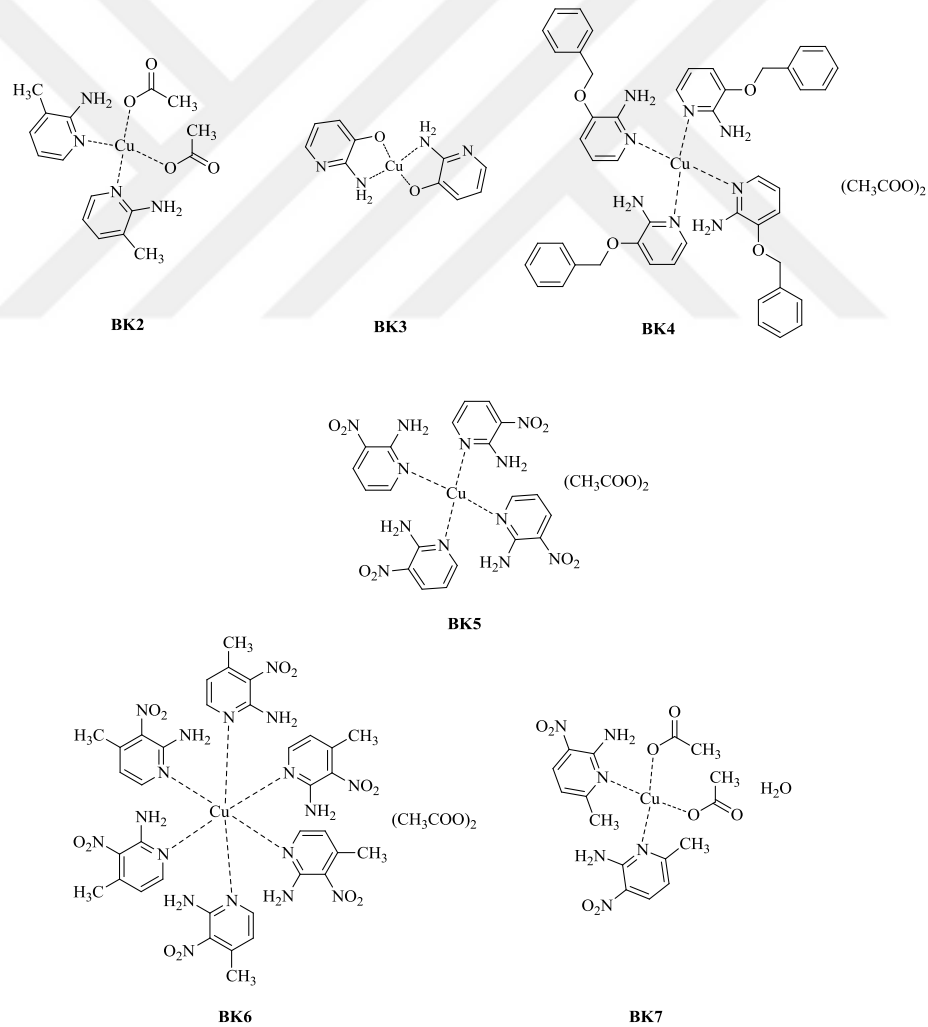
Sülfonik asit (-SO₃H) grubu içeren bileşikler ikinci CA inhibisyon mekanizması olan metal iyonuna koordine olmuş su molekülü/hidroksit iyonu üzerine bağlanma şeklinde etkilerini gösterirler (Şekil 2.5B) (Tars vd., 2013). Bu bileşikler özellikle CA XII izoenzimini diğer izoenzimlere göre daha yüksek oranda inhibe etmişlerdir. **BK1** bileşiği CA XII izoenzimini hCA I ve hCA II' den yaklaşık üç kat, CA IX' dan ise yaklaşık altı kat daha güçlü oranda inhibe etmiştir. **PTK1** bileşiği CA XII izoenzimini hCA I' den yaklaşık beş kat, hCA II ve CA IX' dan yaklaşık üç kat daha güçlü oranda inhibe etmiştir. Ayrıca **PTK1** bileşiği CA IX izoenzimini hCA I' den yaklaşık iki kat daha güçlü oranda inhibe etmiştir. **PTK2** bileşiği CA IX ve CA XII izoenzimlerini aynı oranda, hCA I ve hCA II' den ise nispeten daha güçlü bir şekilde inhibe etmiştir. Benzer şekilde **PTK4** bileşiği de CA XII izoenzimini diğer izoformlardan daha güçlü oranda inhibe etmiştir. **PTK5** bileşiği ise CA IX ve CA XII izoenzimlerini aynı oranda inhibe etmiş, hCA I izoenziminden nispeten daha fazla inhibisyon etkisi göstermiştir. Ancak aynı bileşik hCA II izoenzimini en güçlü oranda inhibe etmiştir. Bununla birlikte sülfonik asit türevlerinin kanser ilişkili izoformlara, özellikle de CA XII' ye olan ilgisi sülfokumarinlerden oldukça farklı bileşikleri bünyesinde barındıran bu çalışmada da gösterilmiştir. Tars vd., (2013) tarafından sülfokumarin türevleri ile yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlar bu tez çalışmasını doğrular niteliktedir (Tars vd., 2013).



Şekil 6.1. Çalışmada kullanılan ve serbest $-\text{SO}_3\text{H}$ grubu içeren bileşikler.

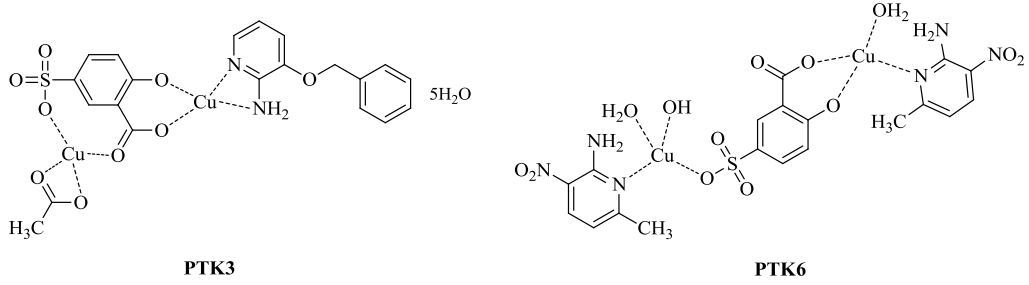
Poliamin bileşiklerinin de sülfonik asit grubu içeren bileşikler gibi çinko iyonuna bağlı su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanma şeklinde CA izoformlarını inhibe ettikleri Carta vd., (2010) tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Carta vd., 2010). Çalışmamızdaki başlangıç kompleksleri de (**BK2–BK7**) amin grubu içeren ligantlar kullanılarak sentezlenen Cu(II) kompleksleridir. Bu komplekslerin yapıları incelendiğinde merkez atoma en az iki amin ligantının bağlandığı görülmektedir. Dolayısıyla **BK2–BK7** bileşikleri de poliamin bileşikleri gibi değerlendirilebilir. Çizelge 5.50 incelendiğinde **BK2–BK7** bileşiklerinin tamamının CA IX

ve CA XII izoenzimlerini inhibe ettiği, hCA I ve hCA II izoenzimlerini ise bu bileşiklerin bir kısmının inhibe ettiği göze çarpmaktadır. hCA I izoenzimini sadece **BK3** ve **BK6** bileşiği inhibe ederken, hCA II izoenzimini **BK2**, **BK3**, **BK6** ve **BK7** bileşikleri inhibe etmiştir. Bu durum **BK4** ve **BK5** bileşiklerinin CA IX ve CA XII' ye karşı seçici davrandıklarını ortaya koymaktadır. Ayrıca **BK2–BK7** bileşiklerinin tamamı CA XII izoenzimini diğer izoenzimlerden daha yüksek oranda inhibe etmiştir. Özellikle **BK5** bileşiği CA XII izoenzimini CA IX' dan yaklaşık on kat daha yüksek oranda inhibe etmiştir. **BK2**, **BK3** ve **BK7** bileşikleri de hCA I ve hCA II' ye nazaran CA IX izoformuna karşı daha seçici davranmışlardır. Bütün sentezlenen maddeler içerisinde en yüksek inhibisyon etkisini **BK6** bileşiği CA XII izoenzimi üzerinde göstermiştir (9,495 μ M).



Şekil 6.2. Çalışmada kullanılan ve çoklu $-\text{NH}_2$ grubu içeren bileşikler.

Yapısında çift Cu(II) bulunduran **PTK3** ve **PTK6** bileşikleri de diğer bileşiklere benzer olarak özellikle CA XII izoenzimini güçlü bir şekilde inhibe etmişlerdir.



Şekil 6.3. Çalışmada kullanılan ve çift merkez atom içeren bileşikler.

Scozzafava vd. (2000) ve Casey vd. (2004) tarafından yapılan çalışmalarda iyonik sülfonamid türevlerinin hücre membranından geçemedikleri kanıtlanmıştır (Scozzafava vd., 2000; Casey vd., 2004). Benzer şekilde bu çalışma kapsamında incelenen **BK4**, **BK5**, **BK6**, **PTK2** ve **PTK5** bileşikleri de iyonik yapıdadırlar. Yani bu bileşiklerin de membrandan geçememe potansiyelleri söz konusu edilebilir. Bu durum, membrana bağlı olan CA IX ve CA XII' nin sitozolik olan CA I ve CA II' ye göre fizyolojik şartlarda daha seçici olarak inhibe edilmesi açısından önem arz etmektedir.

Sonuç olarak sentezlenen bileşikler CA izoformları üzerinde inhibisyon etkisine sahiptirler. Özellikle kanser ilişkili izoformlardan biri olan CA XII' nin diğer izoenzimlere nazaran daha kuvvetli bir şekilde inhibe edilmesi, kanser hücrelerine karşı seçici ilaç etken maddeleri geliştirilmesi açısından umut vericidir. Bu kısımda ifade edilen yapı-aktivite ilişkileri literatürdeki benzer çalışmalarla desteklenerek açıklanmıştır. Daha kesin ifadeler için enzim-inhibitör etkileşimini net bir şekilde açıklayan X-ışını kırınımı analizleri gereklidir.

7. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların geliştirilmesi için daha sonraki çalışmalarda aşağıdaki adımlar uygulanabilir.

- ✓ Sentezlenen bileşikler modifiye edilerek inhibisyon potansiyelleri ve izoenzim seçicilikleri artırılabilir.
- ✓ Bu çalışmada elde edilen *in vitro* sonuçlara ilaveten, bileşiklerin antitümör özellikleri kanser hücre kültürlerinde ve kanserli canlılar üzerinde araştırılabilir.
- ✓ Bileşiklerin enzime hangi konumdan bağlandıklarını kesin olarak açıklayabilmek için enzim ile inhibitör birlikte kristallendirilip X-ışını kırınımı analizi yapılabilir. Böylelikle bileşiklerin izoenzim seçiciliklerinin nasıl artırılacağı konusunda daha kesin adımlar atılabilir.
- ✓ İyonik olan bileşiklerin hücre membranından geçebilme potansiyelleri incelenerek daha somut veriler elde edilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahlskog, J.K., Dumelin, C.E., Trussel, S., Marlind, J., Neri, D. (2009). In vivo targeting of tumor-associated carbonic anhydrases using acetazolamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 4851-4856.
- Alkaya, Z.A., İlkimen, H., Yenikaya, C., Kaygısız, Y., Bülbül, M., Tunç, T., Sarı, M. (2017). A novel proton transfer salt of 2-amino-6-sulfamoylbenzothiazole and its metal complexes: the evaluation of their inhibition effects on human cytosolic carbonic anhydrases. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 32, 231-239.
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C.T., De Simone, G. (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrase: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem. Rev.*, 112, 4421-4468.
- Alterio, V., Hilvo, M., Di Fiore, A., Supuran, C.T., Pan, P., Parkkila, S., Scaloni, A., Pastorek, J., Pastorekova, S., Pedone, C., Scozzafava, A., Monti, S.M., De Simone, G. (2009). Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *PNAS*, 106, 16233-16238.
- Alyar, S., Adem, Ş. (2014). Synthesis, characterization, antimicrobial activity and carbonic anhydrase enzyme inhibitor effects of salicylaldehyde-N-methyl-p-toluenesulfonylhydrazide and its Palladium(II), Cobalt(II) complexes. *Spectrochim. Acta A*, 131, 294-302.
- Arechederra, R.L., Waheed, A., Sly, W.S., Supuran, C.T., Minter, S.D. (2013). Effect of sulfonamides as carbonic anhydrase VA and VB inhibitors on mitochondrial metabolic energy conversion. *Bioorgan. Med. Chem.*, 21, 1544-1548.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ. (1996). A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turk. J. Med. Sci.*, 26, 163-166.
- Aspatwar, A., Tolvanen, M.E., Parkkila, S. (2010). Phylogeny and expression of carbonic anhydrase-related proteins. *BMC Mol. Biol.*, 11, 25, 1-19.
- Axén, R., Porath, J., Ernback, S. (1967). Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, 214, 1302-1304.
- Ayvaz, S., Çankaya, M., Atasever, A., Altuntas, A. (2013). 2-amino-3-cyanopyridine derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 28, 305-310.
- Bayram, E., Senturk, M., Küfrevioğlu, O.I., Supuran, C.T. (2008). In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II. *Bioorgan. Med. Chem.*, 16, 9101-9105.
- Becker, H.M., Deitmer, J.W. (2007). Carbonic anhydrase II increases the activity of the human electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter. *J. Biol. Chem.*, 282, 13508-13521.
- Bhatt, A., Mahon, B.P., Cruzeiro, V.W.D., Cornelio, B., Laronze-Cochard, M., Ceruso, M., Sapi, J., Rance, G.A., Khlobystov, A.N., Fontana, A., Roitberg, A., Supuran, C.T., McKenna, R. (2017). Structure-activity relationships of benzenesulfonamide-based inhibitors towards carbonic anhydrase isoform specificity. *ChemBioChem.*, 18, 213-222.
- Biswas, U.K., Kumar, A. (2012). Study on the changes of carbonic anhydrase activity in insulin resistance and the effect of methylglyoxal. *J. Pak. Med. Assoc.*, 62, 417-421.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Brahimi-Horn, M.C., Bellot, G., Pouyssegur, J. (2011). Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 21, 67-72.
- Brockton, N.T., Klimowicz, A.C., Bose, P., Petrillo, S.K., Konno, M., Rudmik, L., Dean, M., Nakoneshny, S.C., Matthews, T.W., Chandarana, S., Lau, H.Y., Magliocco, A.M., Dort, J.C. (2012). High stromal carbonic anhydrase IX expression is associated with nodal metastasis and decreased survival in patients with surgically-treated oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, 48, 615-622.
- Buanne, P., Renzone, G., Monteleone, F., Vitale, M., Monti, S.M., Sandomenico, A., Garbi, C., Montanaro, D., Accardo, M., Troncone, G., Zatovicova, M., Csaderova, L., Supuran, C.T., Pastorekova, S., Scaloni, A., De Simone, G., Zambrano, N. (2013). Characterization of carbonic anhydrase IX interactome reveals proteins assisting its nuclear localization in hypoxic cells. *J. Proteome Res.*, 12, 282-292.
- Bülbül, M., Saraçoğlu, N., Küfrevioğlu, Ö.İ., Çiftçi, M. (2002). Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and investigation of inhibition effects. *Bioorgan. Med. Chem.*, 10, 2561-2567.
- Büyükkıdan, N., Bülbül, M., Kasımoğulları, R., Büyükkıdan, B. (2013b). Synthesis and characterization of metal complexes of heterocyclic sulfonamide as carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 28, 311-315.
- Büyükkıdan, N., Büyükkıdan, B., Bülbül, M., Kasımoğulları, R., Mert, S. (2017). Synthesis, characterization and in vitro inhibition of metal complexes of pyrazole based sulfonamide on human erythrocyte carbonic anhydrase isozymes I and II. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 32, 208-213.
- Büyükkıdan, N., Büyükkıdan, B., Bülbül, M., Kasımoğulları, R., Serdar, M., Mert, S. (2013a). Synthesis and characterisation of novel Co(II) complexes of pyrazole carboxylate derivated of sulfonamide as carbonic anhydrase inhibitors. *J. Pharm. Pharmacol.*, 65, 363-369.
- Capasso, C., Supuran, C.T. (2015). An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases from bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria? *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 30, 325-332.
- Carta, F., Aggarwal, M., Maresca, A., Scozzafava, A., McKenna, R., Masini, E., Supuran, C.T. (2012). Dithiocarbamates strongly inhibit carbonic anhydrases and show antiglaucoma action in vivo. *J. Med. Chem.*, 55, 1721-1730.
- Carta, F., Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., Kaila, K., Supuran, C.T. (2010). Polyamines inhibit carbonic anhydrases by anchoring to the zinc-coordinated water molecule. *J. Med. Chem.*, 53, 5511-5522.
- Casey, J.R., Morgan, P.E., Vullo, D., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T. (2004). Carbonic anhydrase inhibitors. Design of selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the human tumor-associated isozyme IX. *J. Med. Chem.*, 47, 2337-2347.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cecchi, A., Hulikova, A., Pastorek, J., Pastorekova, S., Scozzafava, A., Winum, J.Y., Montero, J.L., Supuran, C.T. (2005). Carbonic anhydrase inhibitors. Design of fluorescent sulfonamides as probes of tumor-associated carbonic anhydrase IX that inhibit isozyme IX-mediated acidification of hypoxic tumors. *J. Med. Chem.*, 48, 4834-4841.
- Chaput, C.D., Dangott, L.J., Rahm, M.D., Hitt, K.D., Stewart, D.S., Wayne Sampson, H. (2012). A proteomic study of protein variation between osteopenic and age-matched control bone tissue. *Exp. Biol. Med.*, 237, 491-498.
- Chiang, W.L., Lai, J.C., Yang, S.F., Chiou, H.L., Hsieh, Y.S. (2001). Alternations in quantity and activities of erythrocyte cytosolic carbonic anhydrase isoenzymes in glucose-6-phosphate dehydrogenase individuals. *Clin. Chim. Acta*, 314, 195-201.
- Clare, B.W., Supuran, C.T. (2006). A perspective on quantitative structure-activity relationships and carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opin. Drug Met.*, 2, 113-137.
- Colditz, G.A. (2011). Cancer Causes and Control. In M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 610-616.
- Çağlar, S., Aydemir, İ.E., Çankaya, M., Kuzucu, M., Temel, E., Büyükgüngör, O. (2014). Four diclofenac complexes with cobalt(II) and nickel(II) ions: synthesis, spectroscopic properties, thermal decompositions, crystal structures, and carbonic anhydrase activities. *J. Coord. Chem.*, 67, 969-985.
- Çağlar, S., Dilek, E., Çağlar, B., Adıgüzel, E., Temel, E., Büyükgüngör, O., Tabak, A. (2016). New metal complexes with diclofenac containing 2-pyridineethanol or 2-pyridinepropanol: synthesis, structural, spectroscopic, thermal properties, catechol oxidase and carbonic anhydrase activities. *J. Coord. Chem.*, 69, 3321-3335.
- D'Ambrosio, K., Carradori, S., Monti, S.M., Buonanno, M., Secci, D., Vullo, D., Supuran, C.T., De Simone, G. (2015). Out of the active site binding pocket for carbonic anhydrase inhibitors. *Chem. Commun.*, 51, 302-305.
- D'Ambrosio, K., De Simone, G., Supuran, C.T. (2015). Human carbonic anhydrases: Catalytic properties, structural features, and tissue distribution. In C.T. Supuran and G. De Simone (Eds.), *Carbonic Anhydrases As Biocatalysts*. Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 17-30.
- Davis, R.A., Hofmann, A., Osman, A., Hall, R.A., Mühlischlegel, F.A., Vullo, D., Innocenti, A., Supuran, C.T., Poulsen, S.A. (2011). Natural product-based phenols as novel probes for mycobacterial and fungal carbonic anhydrases. *J. Med. Chem.*, 54, 1682-1692.
- De Simone, G., Alterio, V., Supuran, C.T. (2013). Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opin. Drug Dis.*, 8, 793-810.
- Del Prete, S., Vullo, D., De Luca, V., Supuran, C.T., Capasso, C. (2014a). Biochemical characterization of the δ - carbonic anhydrase from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*, TweCA. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 29, 906-911.
- Del Prete, S., Vullo, D., Fisher, G.M., Andrews, K.T., Poulsen, S.A., Capasso, C., Supuran, C.T. (2014b). Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum* – the η -carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 4389-4396.
- Dewhirst, M.W., Cao, Y., Moeller, B. (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer*, 8, 425-437.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Di Fiore, A., Maresca, A., Supuran, C.T., De Simone, G. (2012). Hydroxamate represents a versatile zinc binding group for the development of new carbonic anhydrase inhibitors. *Chem. Commun.*, 48, 8838-8840.
- Diaz, J.R.A., Camí, G.E., Liu-González, M., Vega, D.R., Vullo, D., Juárez, A., Pedregosa, J.C., Supuran, C.T. (2016). Salts of 5-amino-2-sulfonamide-1,3,4-thiadiazole, a structural and analog of acetazolamide, show interesting carbonic anhydrase inhibitory properties, diuretic, and anticonvulsant action. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 31, 1102-1110.
- Ditte, P., Dequiedt, F., Svastova, E., Hulikova, A., Ohradanova-Repic, A., Zatovicova, M., Csaderova, L., Kopacek, J., Supuran, C.T., Pastorekova, S., Pastorek, J. (2011). Phosphorylation of carbonic anhydrase IX controls its ability to mediate extracellular acidification in hypoxic tumors. *Cancer Res.*, 71, 7558-7567.
- Domsic, J.F., Avvaru, B.S., Kim, C.U., Gruner S.M., Agbandje-McKenna, M., Silverman, D.N., McKenna, R. (2008). Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase II. *J. Biol. Chem.*, 283, 30766-30771.
- Dorai, T., Sawczuk, I.S., Pastorek, J., Wiernik, P.H., Dutcher, J.P. (2005). The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. *Eur. J. Cancer*, 41, 2935-2947.
- Dubois, L., Peeters, S., Lieuwes, N.G., Geusens, N., Thiry, A., Wigfield, S., Carta, F., McIntyre, A., Scozzafava, A., Dogné, J.M., Supuran, C.T., Harris, A.L., Masereel, B., Lambin, P. (2011). Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the *in vivo* therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother. Oncol.*, 99, 424-431.
- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 6, 1948-1954.
- Falkbring, S.O., Göthe, P.O., Nyman, P.O., Sundberg, L., Porath, J. (1972). Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *FEBS Lett.*, 24, 229-235.
- Fiaschi T, Giannoni E, Taddei ML, Cirri P, Marini A, Pintus G, Nativi, C., Richichi, B., Scozzafava, A., Carta, F., Torre, E., Supuran, C.T., Chiarugi, P. (2013). Carbonic anhydrase IX from cancer-associated fibroblasts drives epithelial-mesenchymal transition in prostate carcinoma cells. *Cell Cycle*, 12, 1791-1801.
- Forman, D., Ferlay, J. (2014). The global and regional burden of cancer. In B.W. Stewart and C.P. Wild (Eds.), *World Cancer Report 2014*. WHO International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 16-53.
- Frost, C.S. (2014). Physiological functions of alpha class of carbonic anhydrases. In S.C. Frost and R. McKenna (Eds.), *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*, Springer Science+Business Media, Dordrecht, pp. 9-30.
- Fukumura, D., Jain, R.K. (2007). Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc. Res.*, 74, 72-84.
- Gatenby, R.A., Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer*, 4, 891-899.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Grabmaier, K., Vissers, J.L., De Weijert, M.C., Oosterwijk-Wakka, J.C., Van Bokhoven, A., Brakenhoff, R.H., Noessner, E., Mulders, P.A., Merkx, G., Figdor, C.G., Adema, G.J., Oosterwijk, E. (2000). Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Int. J. Cancer*, 85, 865-870.

Gut, M.O., Parkkila, S., Vernerova, Z., Rohde, E., Zavada, J., Hocker, M., Pastorek, J., Karttunen, T., Gibadulinova, A., Zavadova, Z. (2002). Gastric hyperplasia in mice with targeted disruption of the carbonic anhydrase gene Car9. *Gastroenterology*, 123, 1889-1903.

Haapasalo, J., Hilvo, M., Nordfors, K., Haapasalo, H., Parkkila, S., Hyrskyluoto, A., Rantala, I., Waheed, A., Sly, W.S., Pastorekova, S., Pastorek, J., Parkkila, A.K. (2008). Identification of an alternatively spliced isoform of carbonic anhydrase XII in diffusely infiltrating astrocytic gliomas. *Neuro-oncology*, 10, 131-138.

Harris, A.L. (2002). Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 38-47.

Helminger, G., Sckell, A., Dellian, M., Forbes, N.S., Jain, R.K. (2002). Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin. Cancer Res.*, 8, 1284-1291.

Hilvo M, Baranauskiene L, Salzano AM, Scaloni A, Matulis D, Innocenti A, Scozzafava A, Monti, S.M., Di Fiore, A., De Simone, G., Lindfors, M., Jänis, J., Valjakka, J., Pastorekova, S., Pastorek, J., Kulomaa, M.S., Nordlund, H.R., Supuran, C.T., Parkkila, S. (2008). Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J. Biol. Chem.*, 283, 27799-27809.

Hock, L.M., Lynch, J., Balaji, K.C. (2002). Increasing incidence of all stages of kidney cancer in the last two decades in the United States: an analysis of surveillance, epidemiology and end results program data. *J. Urology*, 167, 57-60.

<http://gco.iarc.fr/today/home>

<http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/therapeutic-area/12/oncology>

Huang, L.E., Bunn, H.F. (2003). Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J. Biol. Chem.*, 278, 19575-19578.

Hulikova, A., Zatovicova, M., Svastova, E., Ditte, P., Brasseur, R., Kettmann, R., Supuran, C.T., Kopacek, J., Pastorek, J., Pastorekova, S. (2009). Intact intracellular tail is critical for proper functioning of the tumor-associated, hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX. *FEBS Lett.*, 583, 3563-3568.

Innocenti, A., Pastorekova, S., Pastorek, J., Scozzafava, A., De Simone, G., Supuran, C.T. (2009). The proteoglycan region of the tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX acts as an intrinsic buffer optimizing CO₂ hydration at acidic pH values characteristic of solid tumors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 5825-5828.

Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrase inhibitors. Interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I–XIV). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 1583-1587.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ivanov, S., Liao, S.Y., Ivanova, A., Danilkovitch-Miagkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., Merrill, M.J., Prosecholdt, M.A., Oldfield, E.H., Lee, J., Zavada, J., Waheed, A., Sly, W., Lerman, M.I., Stanbridge, E.J. (2001). Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am. J. Pathol.*, 158, 905-919.

Ivanov, S.V., Kuzmin, I., Wei, M.H., Pack, S., Geil, L., Johnsons, B.E., Stanbridge, E.J., Lerman, M.I. (1998). Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *PNAS*, 95, 12596-12601.

İlkimen, H., Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., Aslan, M., Süzen, Y. (2014a). Synthesis and characterization of some metal complexes of a proton transfer salt, and their inhibition studies on carbonic anhydrase isozymes and the evaluation of the results by statistical analysis. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 29, 695-701.

İlkimen, H., Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., Tunca, E., Dal, H., Baş, M. (2015). Synthesis and characterization of complexes of novel proton transfer salt and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 30, 195-203.

İlkimen, H., Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., Tunca, E., Dal, H. (2014b). Synthesis and characterization of a proton transfer salt between 2,6-pyridinedicarboxylic acid and 2-aminobenzothiazole, and its complexes and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 29, 353-361.

İlkimen, H., Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., Tunca, E., Süzen, Y. (2013). Synthesis and characterization of a proton transfer salt between dipicolinic acid and 2-amino-6-methylbenzothiazole and its complexes, and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes. *Polyhedron*, 61, 56-64.

Joffre, C., Barrow, R., Menard, L., Calleja, V., Hart, I.R., Kermorgant, S. (2011). A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.*, 13, 827-837.

Juel, C., Lundby, C., Sander, M., Calbet, J.A., Hall, G. (2003). Human skeletal muscle and erythrocyte proteins involved in acid-base homeostasis: adaptations to chronic hypoxia. *J. Physiol.*, 548, 639-648.

Karhumaa, P., Parkkila, S., Tureci, O., Waheed, A., Grubb, J.H., Shah, G., Parkkila, A.K., Kaunisto, K., Tapanainen, J., Sly, W.S., Rajaniemi, H. (2000). Identification of carbonic anhydrase XII as the membrane isozyme expressed in the normal human endometrial epithelium. *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 68-74.

Kaya, A.A., Kaya, E.Ç., Sarıkaya, S.B.Ö., Onaran, A. (2015). Synthesis, antifungal activity and carbonic anhydrase inhibitory properties of Cu(II) bis(3,4-dimethoxybenzoate)bis(nicotinamide) dihydrate. *Curr. Enz. Inh.*, 11, 32-38.

Keilin, D., Mann, T. (1940). Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.*, 34, 1163-1176.

Kikutani, S., Nakajima, K., Nagasato, C., Tsuji, Y., Miyatake, A., Matsuda, Y. (2016). Thylakoid luminal θ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PNAS*, 113, 9828-9833.

Kim, J.W., Dang, C.V. (2006). Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res.*, 66, 8927-8930.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kivela, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T.J., Kivela, J., Parkkila, A.K., Waheed, A., Sly, W.S., Grubb, J.H., Shah, G., Türeci, Ö., Rajaniemi, H. (2000). Expression of a novel trans-membrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *Am. J. Pathol.*, 156, 577-584.
- Kopacek, J., Barathova, M., Dequiedt, F., Sepelakova, J., Kettmann, R., Pastorek, J., Pastorekova, S. (2005). MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX. *Biochim. Biophys. Acta*, 1729, 41-49.
- Krishnamurthy, V.M., Kaufman, G.K., Urbach, A.R., Gitlin, I., Gudiksen, K.L., Weibel, D.B., Whitesides, G.M. (2008). Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein-Ligand Binding. *Chem. Rev.*, 108, 946-1051.
- Kroemer, G., Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13, 472-482.
- Kummola, L., Hamalainen, J.M., Kivela, J., Kivela, A.J., Saarnio, J., Karttunen, T., Parkkila, S. (2005). Expression of a novel carbonic anhydrase, CA XIII, in normal and neoplastic colorectal mucosa. *BMC Cancer*, 4, 1-7.
- Kuo, W.H., Yang, S.F., Hsieh, Y.S., Tsai, C.S., Hwang, W.L., Chu, S.C. (2005). Differential expression of carbonic anhydrase isoenzymes in various types of anemia. *Clin. Chim. Acta*, 351, 79-86.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A., Saarnio, J., Kivela, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S. (2004). Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J. Biol. Chem.*, 279, 2719-2727.
- Li, X., Alvarez, B., Casey, J.R., Reithmeier, R.A., Fliegel, L. (2002). Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.*, 277, 36085-36091.
- Li, Y., Wang, H., Tu, C., Shiverick, K.T., Silverman, D.N., Frost, S.C. (2011). Role of hypoxia and EGF expression, activity, localization and phosphorylation of carbonic anhydrase IX in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813, 159-167.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658-666.
- Lounnas N, Rosilio C, Nebout M, Mary D, Griessinger E, Neffati Z, Chiche, J., Spits, H., Hagenbeek, T.J., Asnafi, V., Poulsen, S.A., Supuran, C.T., Peyron, J.F., Imbert, V. (2013). Pharmacological inhibition of carbonic anhydrase XII interferes with cell proliferation and induces cell apoptosis in T-cell lymphomas. *Cancer Lett.*, 333, 76-88.
- Maren, T.H. (1960). A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 130, 26-29.
- Maresca, A., Temperini, C., Vu, H., Pham, N.B., Poulsen, S.A., Scozzafava, A., Quinn, R.J., Supuran, C.T. (2009). Non-zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: coumarins are a new class of suicide inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 3057-3062.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McMurtrie, H.L., Cleary, H.J., Alvarez, B.V., Loiselle, F.B., Sterling, D., Morgan, P.E., Johnson, D.E., Casey, J.R. (2004). The bicarbonate transport metabolon. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 19, 231-236.
- Mekhail, K., Gunaratnam, L., Boncalzi, M.E., Lee, S. (2004). HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nat. Cell Biol.*, 6, 642-647.
- Mikulski, R.L., Silverman, D.N. (2010). Proton transfer in catalysis and the role of proton shuttles in carbonic anhydrase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1804, 422-426.
- Milkovic, L., Zarkovic, N., Saso, L. (2017). Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.*, 12, 727-732.
- Monnard, F.W., Heinisch, T., Nogueira, E.S., Schirmer, T., Ward, T.R. (2011). Human carbonic anhydrase II as a host for piano-stool complexes bearing a sulfonamide anchor. *Chem. Commun.*, 47, 8238-8240.
- Monti, S.M., Supuran, C.T., De Simone, G. (2013). Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008–2013). *Expert Opin. Ther. Pat.*, 23, 737-749.
- Mori, M., Cau, Y., Vignaroli, G., Laurenzana, I., Caivano, A., Vullo, D., Supuran, C.T., Botta, M. (2015). Hit recycling: discovery of a potent carbonic anhydrase inhibitor by in silico target fishing. *ACS Chem. Biol.*, 10, 1964-1969.
- Mostad, A., Rømming, C. (1973). Crystal structure of DL-tyrosine. *Acta Chem. Scand.*, 27, 401-410.
- Neri, D., Supuran, C.T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10, 767-777.
- Nyman, P.O. (1961). Purification and properties of carbonic anhydrase from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 52, 1-12.
- O'Connor, B.H., Maslen, E.N. (1965). The crystal structure of α -sulphanilamide. *Acta Crystallogr.*, 18, 363-366.
- Ondriskova, E., Debreova, M., Pastorekova, S. (2015). Tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. In C.T. Supuran and G. De Simone (Eds.), *Carbonic Anhydrases As Biocatalysts*. Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 169-205.
- Özbek, N., Alyar, S., Memmi, B.K., Gündüzalp, A.B., Bahçeci, Z., Alyar, H. (2017). Synthesis, characterization, computational studies, antimicrobial activities and carbonic anhydrase inhibitor effects of 2-hydroxyacetophenone-N-methyl p-toluenesulfonylhydrazone and its Co(II), Pd(II), Pt(II) complexes. *J. Mol. Struct.*, 1127, 437-448.
- Özdemir, U.O., Özbek, N., Genç, Z.K., İlbiz, F., Gündüzalp, A.B. (2017). New bioactive silver(I) complexes: Synthesis, characterization, anticancer, antibacterial and anticarbonic anhydrase II activities. *J. Mol. Struct.*, 1138, 55-63.
- Özdemir, Ü.Ö., Aktan, E., İlbiz, F., Gündüzalp, A.B., Özbek, N., Sarı, M., Çelik, Ö., Saydam, S. (2014). Characterization, antibacterial, anticarbonic anhydrase II isoenzyme, anticancer, electrochemical and computational studies of sulfonic acid hydrazide derivative and its Cu(II) complex. *Inorg. Chim. Acta*, 423, 194-203.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pacchiano, F., Carta, F., McDonald, P.C., Lou, Y., Vullo, D., Scozzafava, A., Dedhar, S., Supuran, C.T. (2011). Ureido-substituted benzenesulfonamides potently inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis. *J. Med. Chem.*, 54, 1896-1902.
- Parkkila, S., Innocenti, A., Kallio, H., Hilvo, M., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2009). The protein tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib strongly inhibit several mammalian alpha carbonic anhydrase isoforms. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 4102-4106.
- Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H. (1995). Circadian periodicity in salivary carbonic anhydrase VI concentration. *Acta Physiol. Scand.*, 154, 205-211.
- Parks, S.K., Chiche, J., Pouyssegur, J. (2011). pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J. Cell Physiol.*, 226, 299-308.
- Pastorek, J., Pastorekova, S., Callebaut, I., Mornon, J.P., Zelnik, V., Opavsky, R., Zat'ovicova, M., Liao, S., Portetelle, D., Stanbridge, E.J. (1994). Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene*, 9, 2877-2888.
- Pastorekova, S., Parkkila, S., Zavada, J. (2006). Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv. Clin. Chem.*, 42, 167-216.
- Pastorekova, S., Zavadova, Z., Kostal, M., Babusikova, O., Zavada, J. (1992). A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology*, 187, 620-626.
- Proescholdt, M.A., Mayer, C., Kubitz, M., Schubert, T., Liao, S.Y., Stanbridge, E.J., Ivanov, S., Oldfield, E.H., Brawanski, A., Merrill, M. (2005). Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrases in brain tumors. *Neuro-oncology*, 7, 465-475.
- Qurrat-ul-Ain, Ashiq, U., Jamal, R.A., Saleem, M., Mahroof-Tahir, M. (2017). Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes. *Arab. J. Chem.*, 10, 488-499.
- Rafajova, M., Zatovicova, M., Kettmann, R., Pastorek, J., Pastorekova, S. (2004). Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 24, 995-1004.
- Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A.S., Gibbons, B.H., Edsall, J.T. (1964). Carbonic anhydrases from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 239, 1065-1078.
- Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., Glass, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Gene. Dev.*, 20, 1405-1428.
- Ruddon, W.R. (2007). *Cancer Biology*, Oxford University Press, New York.
- Ruusuvuori, E., Li, H., Huttu, K., Palva, J.M., Smirnov, S., Rivera, C., Kaila, K., Voipio, J. (2004). Carbonic anhydrase isoform VII acts as a molecular switch in the development of synchronous gamma-frequency firing of hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurosci.*, 24, 2699-2707.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J. (2005). Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 617-626.
- Scozzafava, A., Briganti, F., Ilies, M.A., Supuran, C.T. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis of membrane-impermeant low molecular weight sulfonamides possessing in vivo selectivity for the membrane-bound versus cytosolic isozymes. *J. Med. Chem.*, 43, 292-300.
- Semenza, G.L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, 29, 625-634.
- Shin, H.J., Rho, S.B., Jung, D.C., Han, I.O., Oh, E.S., Kim, J.Y. (2011). Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. *J. Cell Sci.*, 124, 1077-1087.
- Ship, J.A. (2003). Diabetes and oral health: an overview. *J. Am. Dent. Assoc.*, 134, 4S-10S.
- Sjöblom, B., Polentarutti, M., Djinović-Carugo, K. (2009). Structural study of X-ray induced activation of carbonic anhydrase. *PNAS*, 106, 10609-10613.
- Sterling, D., Alvarez, B.V., Casey, J.R. (2002). The extracellular component of a transport metabolon: extracellular loop 4 of the human AE1 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger binds carbonic anhydrase IV. *J. Biol. Chem.*, 277, 25239-25246.
- Stock, C., Schwab, A. (2009). Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflug. Arch.*, 458, 981-992.
- Stridh, M.H., Alt, M.D., Wittmann, S., Heidtmann, H., Aggarwal, M., Riederer, B., Seidler, U., Wennemuth, G., McKenna, R., Deitmer, J.W., Becker, H.M. (2012). Lactate flux in astrocytes is enhanced by a non-catalytic action of carbonic anhydrase II. *J. Physiol.*, 590, 2333-2351.
- Supuran, C.T. (2008a). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7, 168-181.
- Supuran, C.T. (2008b). Carbonic anhydrases—an overview. *Curr. Pharm. Design*, 14, 603-614.
- Supuran, C.T. (2011). Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: towards novel antibiotics? *Front. Pharmacol.*, 2, 34, 1-6.
- Supuran, C.T. (2012) Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 27, 759-772.
- Supuran, C.T. (2016a). Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem. J.*, 473, 2023-2032.
- Supuran, C.T. (2016b). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 31, 345-360.
- Supuran, C.T. (2017). Advances in structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opin. Drug Dis.*, 12, 61-88.
- Supuran, C.T., Capasso, C. (2015). The eta-class carbonic anhydrases as drug targets for antimalarial agents. *Expert Opin. Ther. Tar.*, 19, 551-563.
- Svastova, E., Witarski, W., Csaderova, L., Kosik, I., Skvarkova, L., Hulikova, A., Zatovicova, M., Barathova, M., Kopacek, J., Pastorek, J., Pastorekova, S. (2012). Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *J. Biol. Chem.*, 287, 3392-3402.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Svastova, E., Zilka, N., Zatovicova, M., Gibadulinova, A., Ciampor, F., Pastorek, J., Pastorekova, S. (2003). Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp. Cell Res.*, 290, 332-345.
- Swietach, P., Vaughan-Jones, R.D., Harris, A.L. (2007). Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metast. Rev.*, 26, 299-310.
- Takashima, H., Fukuda, M., Nakagaki, F., Ogata, T., Tsukahara, K. (2013). Photoinduced electron-transfer reactions of carbonic anhydrase inhibitor containing tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) analogue. *J. Phys. Chem. B*, 117, 2625-2635.
- Tars, K., Vullo, D., Kazaks, A., Leitans, J., Lends, A., Grandane, A., Zalubovskis, R., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2013). Sulfocoumarins (1,2-benzoxathiine-2,2-dioxides): a class of potent and isoform-selective inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrases. *J. Med. Chem.*, 56, 293-300.
- Thiry, A., Dogne, J.M., Supuran, C.T., Masereel, B. (2007). Carbonic anhydrase inhibitors as anticonvulsant agents. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 855-864.
- Thomas, J.A., Mallis, R.J. (2001). Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Exp. Gerontol.*, 36, 1519-1526.
- Touissni, N., Maresca, A., McDonald, P.C., Lou, Y., Scozzafava, A., Dedhar, S., Winum, J.Y., Supuran, C.T. (2011). Glycosylcoumarin carbonic anhydrase IX and XII inhibitors strongly attenuate the growth of primary breast tumors. *J. Med. Chem.*, 54, 8271-8277.
- Truppo, E., Supuran, C.T., Sandomenico, A., Vullo, D., Innocenti, A., Di Fiore, A., Alterio, V., De Simone, G., Monti, S.M. (2012). Carbonic anhydrase VII is S-glutathionylated without loss of catalytic activity and affinity for sulfonamide inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 1560-1564.
- Tureci, O., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Gottert, E., Seitz, G., Parkkila, A.K., Shah, G.N., Grubb, J.H., Pfreundschuh, M., Sly, W.S. (1998). Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *PNAS*, 95, 7608-7613.
- Uda, N.R., Seibert, V., Stenner-Liewen, F., Müller, P., Herzig, P., Gondi, G., Zeidler, R., van Dijck, M., Zippelius, A., Renner, C. (2015). Esterase activity of carbonic anhydrases serves as surrogate for selecting antibodies blocking hydratase activity. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 30, 955-960.
- Vargas, L.A., Alvarez, B.V. (2012). Carbonic anhydrase XIV in the normal and hypertrophic myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 52, 741-752.
- Vaupel, P., Kallinowski, F., Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.*, 49, 6449-6465.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T. (1967). Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *J. Biol. Chem.*, 242, 4221-4229.
- Vullo, D., Franchi, M., Gallori, E., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Supuran, C.T. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozymes I and II and transmembrane, cancer-associated isozyme IX with anions. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 18, 403-406.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Waheed, A., Sly, W.S. (2017). Carbonic anhydrase XII functions in health and disease. *Gene*, 623, 33-40.
- Whittington, D.A., Waheed, A., Ulmasov, B., Shah, G.N., Grubb, J.H., Sly, W.S., Christianson, D.W. (2001). Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells. *PNAS*, 98, 9545-9550.
- Wilbur, K.M., Anderson, N.G. (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 176, 147-154.
- Workman, P., Collins, I. (2014). Modern Cancer Drug Discovery: Integrating Targets, Technologies, and Treatments for Personalized Medicine. In S. Neidle (Ed.), *Cancer Drug Design and Discovery*. Elsevier Inc., London, pp. 3-53.
- Wykoff, C.C., Beasley, N., Watson, P.H., Campo, L., Chia, S.K., English, R., Pastorek, J., Sly, W.S., Ratcliffe, P., Harris, A.L. (2001). Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am. J. Pathol.*, 158, 1011-1019.
- Wykoff, C.C., Beasley, N.J.P., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Harris, A.L. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.*, 60, 7075-7083.
- Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P.D., Shi, Y., Morel, F.M.M. (2008). Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, 452, 56-61.
- Yang, Z., Alvarez, B., Chakarova, C., Jiang, L., Karan, G., Frederick, J.M., Zhao, Y., Sauve, Y., Zrenner, E., Wissinger, B., Den Hollander, A.I., Katz, B., Baehr, W., Cremers, F.P., Casey, J.R., Bhattacharya, S.S., Zhang, K. (2005). Mutant carbonic anhydrase 4 impairs pH regulation and causes retinal photoreceptor degeneration. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 255-265.
- Yenikaya, C., İlkimen, H., Demirel, M.M., Ceyhan, B., Bülbül, M., Tunca, E. (2016). Preparation of two maleic acid sulfonamide salts and their copper(II) complexes and antiglaucoma activity studies. *J. Brazil Chem. Soc.*, 27, 1706-1714.
- Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., İlkimen, H., Çelik, H., Büyükgüngör, O. (2010). Synthesis, characterization and antiglaucoma activity of a novel proton transfer compound and a mixed-ligand Zn(II) complex. *Bioorgan. Med. Chem.*, 18, 930-938.
- Yenikaya, C., Sarı, M., İlkimen, H., Bülbül, M., Büyükgüngör, O. (2011a). Synthesis and characterization of a novel amino salicylate salt and its Cu(II) complex and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes. *Polyhedron*, 30, 535-541.
- Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., İlkimen, H., Çınar, B., Büyükgüngör, O. (2011b). Synthesis and characterisation of two novel proton transfer compounds and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 26, 104-114.
- Zatovicova, M., Jelenska, L., Hulikova, A., Csaderova, L., Ditte, Z., Ditte, P., Galiasova, T., Pastorek, J., Pastorekova, S. (2010). Carbonic anhydrase IX as an anticancer therapy target: preclinical evaluation of internalizing monoclonal antibody directed to catalytic domain. *Curr. Pharm. Design*, 16, 3255-3263.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zatovicova, M., Pastorekova, S. (2013). Modulation of cell surface density of carbonic anhydrase IX by shedding of the ectodomain and endocytosis. *Acta Virol.*, 57, 257-264.

Zavada, J., Zavadova, Z., Pastorek, J., Biesova, Z., Jezek, K., Velek, J. (2000). Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Brit. J. Cancer*, 82, 1808-1813.

Zavada, J., Zavadova, Z., Pastorekova, S., Ciampor, F., Pastorek, J., Zelnik, V. (1993). Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens. *Int. J. Cancer*, 54, 268-274.

Zavadova, Z., Zavada, J. (2005). Carbonic anhydrase IX (CA IX) mediates tumor cell interactions with microenvironment. *Oncol. Rep.*, 13, 977-982.

Zheng, J., Avvaru, B.S., Tu, C., McKenna, R., Silverman, D.N. (2008). Role of hydrophilic residues in proton transfer during catalysis by human carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, 47, 12028-12036.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : TUNCA Ekrem
Doğum Tarihi ve Yeri : 04.05.1988 Eskişehir
e-mail : ekrem.tunca@dpu.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2018
Yüksek Lisans	Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2012
Lisans	Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi	2009

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2009 –	Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler (SCI, SSCI, AHCI)

1. Al-Dhrub, A.H.A., Şahin, S., Özmen, İ., Tunca, E., Bülbül, M., (2017), Immobilization and characterization of human carbonic anhydrase I on amine functionalized nanoparticles, *Process Biochemistry*, 57, 95-104.
2. Uysal, K., Yetek, İ., Bülbül, M., Tunca, E., Kavasoglu, M., (2017), Investigation of the effects of boron on some enzyme activities and lipid peroxidation of common carp (*Cyprinus carpio*), *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17, 245-249.
3. Ulus, R., Kaya, M., Demir, D., Tunca, E., Bülbül, M., (2016), Three-component synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel octahydroacridines incorporating sulfaguanidine scaffold, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 63-69.
4. Başar, E., Tunca, E., Bülbül, M., Kaya, M., (2016), Synthesis of novel sulfonamides under mild conditions with effective inhibitory activity against the carbonic anhydrase isoforms I and II, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 1356-1361.

5. Yenikaya, C., İlkimen, H., Demirel, M.M., Ceyhan, B., Bülbül, M., Tunca, E., (2016), Preparation of two maleic acid sulfonamide salts and their copper(II) complexes and antiglaucoma activity studies, Journal of the Brazilian Chemical Society, 27, 1706-1714.
6. İlkimen, H., Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., Tunca, E., Dal, H., Baş, M., (2015), Synthesis and characterization of complexes of a novel proton transfer salt and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 30, 195-203.
7. İlkimen, H., Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., Tunca, E., Dal, H., (2014), Synthesis and characterization of a proton transfer salt between 2,6-pyridinedicarboxylic acid and 2-aminobenzothiazole, and its complexes and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 29, 353-361.
8. İlkimen, H., Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., Tunca, E., Süzen, Y., (2013), Synthesis and characterization of a proton transfer salt between dipicolinic acid and 2-amino-6-methylbenzothiazole and its complexes, and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes, Polyhedron, 61, 56-64.
9. Kaya, M., Başar, E., Çakır, E., Tunca, E., Bülbül, M., (2012), Synthesis and characterization of novel dioxoacridine sulfonamide derivatives as new carbonic anhydrase inhibitors, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 27, 509-514.

Uluslararası Diğer Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Karaçam, H., Tunca, E., Kaygısız, Y., İmdat, G., Bülbül, M., (2015), Investigation of the effects of some edible mushroom extracts on human carbonic anhydrase isozymes, Hacettepe Journal of Biology & Chemistry, 43, 187-193.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler (TR Dizin)

1. İlkimen, H., Yenikaya, C., İmdat, G., Tunca, E., Bülbül, M., (2017), 2-aminopiridin türevleri ile sülfonamid içeren maleamik asit türevinin proton transfer tuzları ve Cu(II) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu ve insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 21, 480-494.
2. Yenikaya, C., İlkimen, H., Ceyhan, B., Demirel, M.M., Tunca, E., Bülbül, M., (2017), Benzimidazol ile (*E*)-3-(4-sülfamoyilfenilkarbamoyl)akrilik asitin proton transfer tuzunun sentezi, metal komplekslerinin hazırlanması ve inhibisyon özelliklerinin incelenmesi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 21, 454-462.
3. Yenikaya, C., İlkimen, H., Demirel, M.M., Ceyhan, B., Tunca, E., Bülbül, M., (2016), 2-aminopiridin ile (*E*)-4-okso-4-((4-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoik asitin proton transfer tuzunun sentezi, metal komplekslerinin hazırlanması ve hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon özelliklerinin incelenmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16, 41-53.