

PORSUK BARAJINDA BULUNAN
“ CARASSIUS GIBELIO ” TÜRÜ BALIKTAN
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE İZOLASYONU

Nazmiye ALTINMEŞE

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Ağustos - 2011

PORSUK BARAJINDA BULUNAN
“*CARASSIUS GIBELIO*” TÜRÜ BALIKTAN
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE İZOLASYONU

Nazmiye ALTINMEŞE

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

Danışman: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Ağustos - 2011

KABUL VE ONAY SAYFASI

Nazmiye ALTINMEŞE' nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı ‘Porsuk Barajında Bulunan “*Carassius Gibelio*” Türü Balıktan Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve İzolasyonu” başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğın ilgili maddeleri uyarınca değeriendirilerek kabul edilmiştir.

/ 08 / 2011

İmza:

Üye : Doç. Dr. Metin BÜLBÜL
Üye : Yrd. Doç. Dr. Nurgün BÜYÜKKIDAN
Üye : Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2011 gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atalay KÜÇÜKBURSA
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**PORSUK BARAJINDA BULUNAN *CARASSIUS GIBELIO* TÜRÜ
BALIKTAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE İZOLASYONU**

Nazmiye ALTINMEŞE

Kimya, Yüksek Lisans Tezi, 2011

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1 karbonat hidroliyaz,) Zn^{+2} iyonu bulunduran bir metaloenzimdir. İnsan eritrositlerinde karbonik anhidraz enzimi, hücrelerde CO_2 'in hidrasyonu veya HCO_3 'ın dehidrasyonu reaksiyonlarını katalizler. Karbonik anhidraz böbrek, gastrik mukoza ve göz merceği, tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometrium dokularında da aktivite gösterir. Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve bitkilerin fotosentetik kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri olduğu bilinen bir gerçektir.

Bu çalışmada kullanılan canlı *Carassius gibelio* sağlıklı ve olgundur. İsrail sazının boyu 35 cm ve ortalama ağırlığı 3000 g dır. Tatlı suların dipleri çamurlu olan kısımlarında yaşamaktadır. Oksijen miktarı çok düşük olan sularda dahi yaşayabilmektedir. Ortalama su sıcaklığı 10–20 °C arasında olduğu tespit edilmiştir. İsrail sazanı istilacı bir tür olup aynı zamanda ekonomik değeri de bulunmamaktadır. Bu balıktan elde edilen homojenatın optimum pH, stabil pH, optimum sıcaklık ve iyonik şiddeti belirlenmiştir. *Carassius gibelio* 'nun optimum sıcaklığı 25 °C; optimum pH' ı 8,7; iyonik şiddeti ise 1 M olarak bulunmuştur. Daha sonra solungaçlarındaki karbonik anhidraz enzimi afinite jeli kullanılarak (Sephadex-4B-L-tirozin-sülfonilamid) saflaştırılmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler : *Carassius gibelio*, Sephadex-4B-L-tirozin-sülfonilamid, optimum pH, iyonik şiddet, stabil pH.

**IN THE PORSUK DAM OF FISH SPECIES CARASSIUS GIBELIO
OF THE ENZYME CARBONIC ANHYDRASE
PURIFICATION AND ISOLATION**

Nazmiye ALTINMEŞE

Chemistry, M.S. Thesis , 2011

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

Carbonic anhydrase (E.C.4.2.1.1) is a metalloenzyme contains Zn^{+2} ion. In human erythrocyte carbonic anhydrase enzyme catalyzes the reactions of CO_2 hydration in cells or the dehydration reactions of HCO_3^- 's. Carbonic anhydrase shows activity in kidney, gastric mucosa and the lens of the eye, salivary glands, brain, nerve myelin sheath, pancreas, prostate, uterus and endometrial tissues. In addition, it is well known that this enzyme has an important role on endocrine organs and gills of fish, some insects and bacteria, making the shell of crustaceans and the formation of the egg shell, algae and photosynthetic chloroplast of plants.

The *Carassius gibelio* used in this study is healthy and mature. The length of *Carassius gibelio* is 35 cm and the average weight is 3000 grams. They live in parts of the muddy bottoms of fresh water. They can survive even in water contains very low amount of oxygen. The average water temperature has been established between 10-20 °C. *Carassius gibelio* is invasive species and also they do not have economic value. It has been tried to determine that optimum pH, stable pH, optimum temperature and ionic strength of homogenates which gained from this fish. The optimum temperature, pH and ionic strength of *Carassius gibelio* has been found as 25 °C, 8,7 and 1 M respectively. The optimum pH, ionic strength. Afterwards, carbonic anhydrase enzyme in gills has been tried to be purified by using affinity chromatography (Sephacryl- 4B-tyrosine-sulfonilamid).

Key words : *Carassius gibelio*, Sepharose-4B-L-tyrosine-sulfonilamid, optimum pH, stable pH, ionic strength.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana bu çalışma olanağını sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr.Yunus ERDOĞAN' a, bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi süresince desteğini ve ilgisini esirgemeyen, danışman hocam Sayın Doç. Dr.Metin BÜLBÜL' e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamda yardımcı olan yüksek lisans arkadaşlarıma ve Kimya Bölümü' nün değerli öğretim elemanlarına teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca yanımda olan ve desteklerini hiç esirgemeyen sevgili aileme minnettarım.

Saygılarımla.

Nazmiye ALTINMEŞE

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	.xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Sazan Balığının Sistematigi	1
1.2. Ekolojik Özellikleri.....	2
1.3. Biyolojik Özellikleri.....	2
1.4. Üreme.....	3
1.5. Carassius Gibelio	3
1.6. Enzimler	4
1.7. Karbonik Anhidraz.....	7
1.7.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	7
1.7.2. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri	8
1.7.3. Karbonik Anhidrazın Enziminin Katalitik Mekanizması.....	9
1.7.4. Karbonik Anhidraz Aktivitesi	10
1.7.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	11
2. MATERYAL VE YÖNTEM	12
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	12
2.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	12
2.3. Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	12
2.4. Yöntemler.....	13
2.4.1. Protein Tayini.....	13
2.4.2. Kalitatif protein tayini	13
2.4.3. Bradford (coomasie blue) yöntemi ile ilgili protein tayini.....	14
2.4.4. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini	14
2.4.4.1. CO ₂ - Hidrataz aktivitesi tayini	14
2.4.4.2. Esteraz aktivitesi tayini	15
2.4.5. Carassius Gibelio Türü Balıktan Karbonik anhidraz Enzimlerinin Saflaştırılması.....	15
2.4.5.1. Sepharose -4B matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanışı.....	15

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	16
3.1. Balık Bakımı ve Temini	16
3.2. Homojenatın Hazırlanması.....	16
3.3. İsrail Sazanı Solungaçlarından Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromotoğrafisi ile Saflaştırılması	16
3.4. Protein Tayini.....	16
3.5. Optimum pH Tayini	16
3.6. Stabil pH Tayini	17
3.7. Optimum İyonik Şiddet Tayini	17
3.8. Optimum Sıcaklık Belirleme.....	17
3.9. FCA Enziminin Afinite Kromotoğrafisi ile Saflaştırılması	18
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	19
KAYNAKLAR DİZİNİ	20

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Adi sazan.....	2
Şekil 1.2 Carassious gibelio	3
Şekil 1.3 Uzak Doğu’da bulunan İsrail sazanı	4
Şekil 1.4 İnsan CA II’deki metal merkezin “ doğrudan ve dolaylı “ ligandları gösteren şematik görünümü.....	9
Şekil 1.5 Karbonik anhidrazın katalizlediği CO ₂ -hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi.	10
Şekil 3.1 Stabil pH ile aktivite arasındaki grafik	17
Şekil 3.2 Optimum sıcaklık ile aktivite arasındaki grafik.....	18

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Sazan balığının sistematığı.	1

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

L	Litre
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
M	Molar

Kısaltmalar

Açıklama

CA	Karbonik anhidraz enzimi
FCA-I	Balık karbonik anhidraz enzimi I
E. C	Enzim kod numarası
E. U	Enzim ünitesi
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
ES	Enzim substrat bileşiği
Tris	Trihidroksimetilaminometan

1. GİRİŞ

Tarihsel olarak sazanın (*Cyprinus carpio*) insanlarla ilişkisinin M.S. yaklaşık 2. yüzyılda Çin’ de ortaya çıktığı görüşü hâkimdir, daha sonra Asya, Avrupa ve diğer kıtalara da yayılmıştır [1]. Bir tatlı su balığı olan Sazan’ ın latince ismi *Cyprinus carpio*’ dur. Ülkemizde balıklandırma ve yetiştiricilikte yaygın olarak kullanılan tür aynalı sazandır. Aynalı sazan, doğal sazanının kültüre alınmış formudur.

Araştırmalar sazanın bir buz kalıbının ortasında çok az donmamış su varsa bile yaşayabileceğini göstermiştir [2]. Düşük sıcaklıkta hayatta kalabilmesinin nedeni kas yapılarını ve yüzme performansını birkaç hafta devam eden sıcaklık adaptasyonuna modifiye etme yeteneğinden kaynaklanır [3]. Soğuk kış aylarında genelde dibe yakın olarak yaşar. Kurak mevsimde, hatta bazı suyu çekilen yerlerde kendilerini çamura gömerek birkaç hafta hayatta kalabilirler. Düşük oksijenli sulara, durgun hareketsiz sulara, çok çamurlu, değişik ısı farklılıkları gösteren sulara, ya da orta derece tuzlu sulara veya insan faktörü sebebiyle endüstriyel ve tarımsal toksinlerin karıştığı nehir ve sulara dahi çok yoğun değilse yaşama şansı diğer balıklardan çok daha fazladır. Suyun sürekli sabit olduğu sulara cinsel olgunluk sazanda çok erken yaşlarda başlar. Ama genellikle bir erkek için bu 2, dişi içinse 3 yaş civarındır. Bu yaşlarda yaklaşık 30 cm boyda ve 400 gr ağırlıkta olurlar [4].

1.1. Sazan Balığının Sistematığı

Sazan balığının bilimsel olarak sınıflandırılması çizelge 1’ deki gibidir:

Çizelge 1.1 Sazan balığının sistematığı.

ÂLEM	ANİMALİA	ALT SINIF	OSTEİCHTHYES
Alt âlem	Metazoa	Takım	Teleostei
Şube	Chordata	Aile	Cyprinidae
Alt şube	Vertebrata	Cins	Cyprinus
Sınıf	Pisces	Tür	Cyprinus carpio (Adi sazan)

1.2. Ekolojik Özellikleri

Dünyadaki balık aileleri içinde en fazla türe sahip olan aile sazangiller (cyprinidae) ailesidir. Ilıman iklim bölgelerinin ekonomik öneme sahip türü olan sazan balıkları, hem sıcaklığa hem de soğuğa dayanıklı bir balık türüdür. Sazan geniş bir ısı toleransına sahiptir. Az miktarda oksijene gereksinim duyarlar. 20 °C' nin üzerinde iyi gelişme gösterirler. 1 °C su sıcaklığına ve ani sıcaklık değişikliklerine maruz kaldığında da yaşayabilirler. Sazan balıkları %5 tuzlulukta ve 5- 9 arasındaki pH' larda büyümektedir.

Yetiştiricilik sırasında 4 - 30 °C arasındaki su sıcaklığı değişimlerine kısa sürede uyum sağlar. Sazan dipten beslenen omnivor (hem bitkisel hem de hayvansal organizmalar üzerinden) bir balıktır. Besinlerini bentik su hayvanları, planktonlar, bitki parçaları ve bitkisel artıklar oluşturur. Dipteki küçük su canlılarını çamurla birlikte alıp çamuru geri atar. Bu yüzden çamur içinde oyuklar açar. Büyük sazanların bazı küçük balıkları yedikleri de gözlenmiştir. En iyi yem alımı ve değerlendirmesi, 16- 25 °C su sıcaklıklarında ve özellikle 23- 24 °C' de olur. Aynalı sazan olarak da adlandırılan kültür sazanı, doğal sazanının kültüre alınmış formudur [5].



Şekil 1.1 Adi sazan

1.3. Biyolojik Özellikleri

Sazan balıklarında vücut füze şeklinde, bazı melezleme türlerinde enli olabildiği gibi, yanlardan hafif yassılaşmış şekildedir. Genellikle vücut düzgün ve iri pullarla kaplıdır. Adi sazandan (cyprinus carpio) melezleme sonucu elde edilmiş olan türlerde pullar azalmış veya yoktur. Baş kısmı pulsuzdur. Hava keseleri iki odacıklıdır. Sırt yüzgeçleri uzundur [5]. Aynalı sazan olarak da adlandırılan kültür sazanı, doğal sazanının kültüre alınmış formudur. Doğal sazana göre daha yüksek sırtlı, tıknaz, vücudunun büyük kısmı pulsuz, pulları vücudunun değişik bölgelerine dağılmış ve yuvarlak, hızlı gelişen ve yapay yetiştiricilik şartlarına iyi uyum gösteren ve yem değerlendirmesi yüksek olan bir türdür. Ağız kenarında bir çifti kalın, diğer çifti ince olmak üzere iki çift bıyık bulunur. Baş ve sırt kısımları esmer-yeşil, yanlar ise yeşilimsi-sarı renktedir. Ağızda diş bulunmaz, sadece yutak dişleri vardır. Türkiye'de 1970 yılından beri yetiştiriciliği yapılmaktadır. Doğal hayat

alanı havuzlar, göller ve nehirlerdir. Su sıcaklığı ve yem durumuna bağlı olarak hızlı büyüyen bir balıktır. 20- 25 yıl hatta 35- 40 yıl yaşadıkları ve boylarının 1 m' nin üzerine çıktığı ağırlıklarının ise 25-30 kg' a ulaştığı bildirilmektedir [6].

1.4. Üreme

Doğal ortamda gruplar halinde, göller ve yavaş akan nehirlerde su sıcaklığı 18 -22 °C olduğunda sazanlar yumurtlar. Bitkilere yapışan yumurtalardan 3 -4 günde larva çıkar. Yumurtlama Mayıs-Haziran ayları arasında su sıcaklığı 18 -20 °C' ye ulaştığında sığ ve bol bitkili su kesimlerinde olur [6]. Cinsel olgunluk yaşı; erkeklerde 3- 4, dişilerde 4-5 dir.

Sazanın üremesinde en önemli faktör su sıcaklığı olduğundan, kuzey ülkelerinde nadiren ürer veya hiç üremez. Yumurtlama bir haftada tamamlanır. 1 kg vücut ağırlığına 300- 400 bin yumurta bırakır. Yumurtaları şeffaf ve yapışkan olup yaklaşık 1 mm çapındadır. Şişmiş yumurtanın çapı 1,6 mm kadardır. Su bitkilerinin üzerine bırakılan yumurtalar 3 - 4 günde açılır. Yumurtadan çıkan larvaların boyu, 5 mm' dir. Yumurtadan çıkan larvalar 1- 3 gün süreyle tutunma organları ile su bitkilerine tutunurlar. Bu süre sonunda, su yüzeyine çıkarak yüzme keselerini hava ile doldurup yüzmeye ve yem almaya başlarlar. Önceleri bitkisel ve hayvansal planktonlarla (algler, rotiferler, küçük kabuklular) beslenirler. Boyları 18 mm olduğunda bentik organizmalarla beslenmeye başlarlar [7].

1.5. *Carassius Gibelio*

Carassius gibelio (İsrail sazanı) başlıca Rusya, Avrupa, Kore ve Kuzeydoğu Çin' de yayılım göstermektedir [8]. Bu balığın doğal yayılım alanı hala tartışma konusudur ve yalnızca Kuzey Avrupa için doğal olabilir [9]. Orta ve Doğu Avrupa' da ve Balkanlarda da geniş bir yayılım göstermektedir [10]. İsrail sazanı 1988 de ilk olarak Trakya bölgesinde Gala Gölü'nden rapor edilmiştir [11]. Daha sonra bu balık Marmara Bölgesi' nin genelinde ve Anadolu' da görülmüştür [12].



Şekil 1.2 Carassious gibelio

İsrail sazanı istilacı bir balık türüdür [12] ve doğal balık türleri için zararlı bir balık türü olarak bilinir [13]. Bu balık durgun ve akış hızı yavaş olan sularda kolaylıkla baskın bir balık türü olabilir ve bütün ekosistemdeki besin akışını değiştirebilir [14]. Ayrıca İsrail sazanı diğer bazı doğal balık türleri (örneğin kızkıkanat, *Scardinius erythrophthalmus* ve eğrez *Vimba vimba*) için kuvvetli bir rekabetçi olabilir [15].

Havuz balığı olarakta bilinen bu tür; gerek vücut şekli, gerekse dorsal ve anal yüzgeçlerin 3. basit ışınının testere dişli olması nedeniyle *Cyprinus Carpio*'ya benzerlik göstermektedir. Ancak ağızda bıyık olmaması, yutak dişlerinin tek sıralı olmasıyla sazandan kolayca ayırt edilir. Sazanlar gibi, durgun sularda ve küçük göletlerde yaşarlar. Bitkilerin yoğun olduğu kıyıları tercih ederler. Soğuk zamanlarda yumuşak çamura gömülerek kışı geçirirler. Başlıca besinlerini; bitkiler, mayıs böcekleri, dipter larvaları ile küçük zooplanktonik organizmalar oluşturmaktadır. Mayıs - Haziran aylarında üreme faaliyetini gerçekleştirirler [16]. Havuz balığının (*carassius gibelio*) sindirim sisteminin en dolu olduğu dönem $3,78 \text{ cm}^3$ ile yaz dönemidir. Bu dönem balığın üreme dönemidir ve oldukça fazla besin ve enerji ihtiyacı vardır. Bu nedenle balık bu dönemde daha fazla beslenme göstermiştir. Yaz dönemini ilkbahar $2,31 \text{ cm}^3$ ile takip eder. Bu dönem, üremeye hazırlık dönemidir ve ihtiyaç duyulan enerji karşılanmaya çalışılmıştır. Kışın ise sindirim sisteminin en az dolu olduğu dönemdir. Bu dönemde hem su sıcaklığının azalması ve hem de balığın daha az hareketli olması, besin ihtiyacının da azalmasına neden olmuştur. Bunların yanında göl suyunun da hem fiziksel, hem de kimyasal özelliklerinin mevsimlere göre değiştiği ve buna bağlı olarak da göldeki besinlerin sayısal olarak artma veya azalma gösterdiği de göz önünde bulundurulmalıdır.



Şekil 1.3 Uzak Doğu'da bulunan İsrail sazanı

1.6. Enzimler

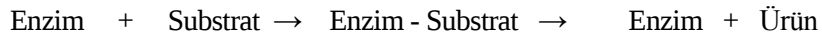
Enzimler canlı hücreler tarafından genetik kontrol altında hücre içinde sentez edilen organik katalizörlerdir. Kataliz deyimi, Yunanca' da, kimyasal reaksiyonlarda etkili olan, reaksiyonu hızlandıran ve kolaylaştıran anlamında kullanılmaktadır. Biyolojik olaylarda ise katalizör olma

özelliğinde olan maddelere enzim adı verilmiştir. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize eder [17].

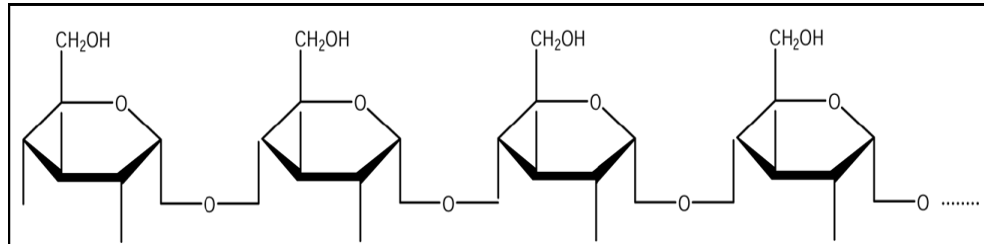
Besin öğeleri vücutta enzimlerin yardımıyla kullanılır ve tepkimeler sonucu vücut yapısına dönüşür. Yaşamsal olayların tümünde enzim gerekir. Enzimler nükleik asitlerden DNA (deoksiribonükleik asit) denetiminde sentezlenir. DNA yapısındaki küçük bir değişiklik bazı enzimlerin sentezlenmemesine veya yanlış sentezlenmesine neden olur. Yanlış sentezlenen enzim ise etkinlik gösteremez ve vücut çalışmasında çeşitli sorunlara neden olur. Enzimler olmazsa vücut canlılığını sürdüremez. Sindirim, solunum, büyüme, kas kasılması, fotosentez vb. daha birçok fiziksel ve kimyasal olayların oluşumunda enzimler rol oynar.

Bazı enzimler yalnız proteinden oluşmuştur. Fakat çoğunluğunda yapı ve görev bakımından farklı olan apoenzim ve koenzim grupları bulunur. Apoenzim, enzimin spesifikliğini sağlayan kısımdır. Protein yapısındadır. Isı ile kolayca “denatüre” olur [17]. Koenzim ise enzimin yardımcı ve etkin şeklidir. Tek başına etkili değildir. Etkinlik gösterebilmesi için apoenzime ihtiyaç duyar. Organik ya da inorganik maddelerden meydana gelmiştir. En önemli yardımcı enzimler vitaminlerdir. Eğer bir koenzim apoenzime kolay ayrılmayacak bir şekilde sıkıca bağlı ise; o koenzime “prostetik grup” adı verilir [18]. Apoenzim ile koenzimin birlikte oluşturduğu gruba tam enzim anlamına gelen holoenzim (aktif enzim) denir.

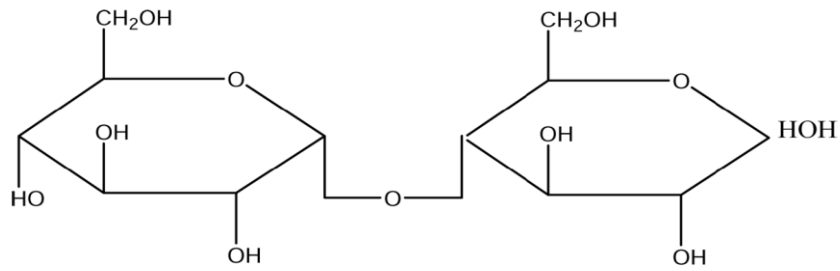
Enzimler genellikle renksizdir ve suda çözülür. Enzimlerin etki ettiği maddelere “ substrat” denir. Reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise “ürün “ adı verilir. Enzim substrat ilişkisi anahtar ile kilidin uyumuna benzer. Enzim molekülünde aktif bölge denilen özel bir bölüm vardır. Enzim substratına geçici olarak aktif bölgeden bağlanır ve enzim-substrat bileşiği (ES) oluşur. Daha sonra substrat ürüne veya ürünlere dönüşür. Enzimler ise reaksiyondan değişmeden çıktıkları için tekrar tekrar kullanılabilir.



Enzimler genellikle çift yönlü çalışır yani geri dönüşümlüdür. Örnek; lipazın yağı parçalaması. Ayrıca enzimler çok hızlı çalışır. Örneğin üre, enzim olmadan yüzyılda parçalanırken üreaz enziminin varlığında ise saniyede 30 000 üre molekülü parçalanabilir [18]. Her hücrede tepkime çeşidi kadar enzim çeşidi vardır ve takım halinde çalışırlar. Bir enzimin etki ettiği tepkimenin ürünü, kendinden sonra gelecek enzimin substratını yapar.

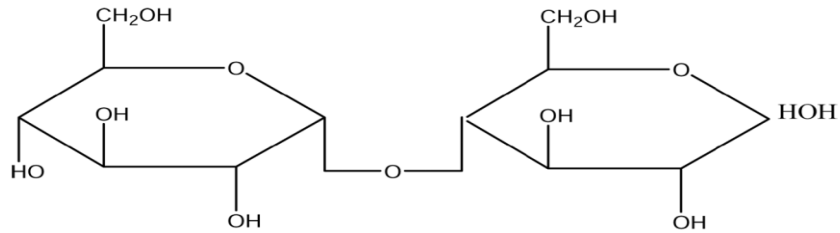


Nişasta



Maltoz (β -formu)
O- α -D-glukopiranozil (1 $\longrightarrow$ 4)- β -D-glukopiranoz

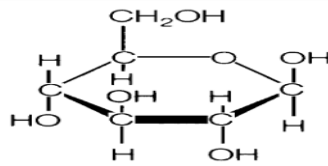
Örneğin, nişasta parçalanırken amilaz enzimi ürünü olan maltoz, maltaz enziminin substratını oluşturur.



Maltoz (β -formu)
O- α -D-glukopiranozil (1 $\longrightarrow$ 4)- β -D-glukopiranoz



2



Glukoz

Enzimlerin bazıları tek substrata etki eder yani spesifiktir. Örneğin, L-laktat dehidrogenaz enzimi laktik asidin yalnızca L-izomerine etki etmekte, D-laktik asidi substrat olarak kullanmamaktadır. Bazı enzimler ise çeşitli substratlara etki eder yani daha az özgüdür. Örneğin, heksokinaz enzimi hem glikoza etki eder hem de mannoza etki ederek ürüne dönüştürür.

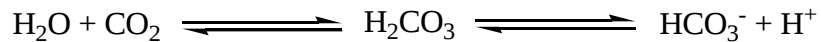
1.7. Karbonik Anhidraz

1.7.1. Dağılımı ve fizyolojik önemi

Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1 karbonat hidrolizaz, karbonat hidrataz) Zn^{+2} iyonu ihtiva eden bir metaloenzimdir. Memeli eritrositlerinde karbonik anhidraz, hücrelerde CO_2 ' in hidrasyonu veya HCO_3^- ' in dehidrasyonu reaksiyonlarını katalizler. Karbonik anhidraz böbrek, gastrik mukoza ve göz merceği, tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometrium dokularında da aktivite gösterir. Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve bitkilerin fotosentetik kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri olduğu bilinen bir gerçektir. Karbonik anhidraz enzimi, sitoplazmada çözünmüş, bazende hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak bulunur [23,24].

İnsan eritrosit CA' sının en önemli fonksiyonu ise, doku kılcal damarlarında, metabolizma ürünü olan CO_2 ' i H_2CO_3 ' e, akciğer pulmoner kapiler de ise H_2CO_3 'i CO_2 'e dönüştürmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer alır.

Katalizlenen reaksiyon;



Böbrek tubullerinde ise, aynı reaksiyonlarla Na^+ ve H_2O geri emilimini gerçekleştirir. Diğer dokularda da yukarıdaki reaksiyonla ya CO_2 transferini ya da H^+ iyonu birikimini sağlayarak hücre için gerekli ortamı meydana getirir. Çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması, CO_2 ve pH dengesinin sağlanması, akciğer ve dokular arasındaki CO_2/HCO_3^- transportu gibi önemli fizyolojik olaylarda rol oynadıkları gibi; kemik erimesi, kireçlenme, tümör oluşumu ve diğer patolojik ve fizyolojik proseslerde de rol aldıkları bilinmektedir [25].

Karbonik anhidraz enzimi balık solungaçlarında hidrominerallerinin ve asit-baz dengesinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Deniz balıklarında vücut sıvıları deniz suyuna göre hipotonik olup, solungaçları ile Na^+ ve Cl^- salgırlarlar [26]. $NaCl$ atımı tatlı su balığındaki benzer şekilde Na^+-K^+ a ATPaz enzimi ile sağlanır [27]. Deniz balıkları ise solungaçlarıyla Na^+ atılımına karşın H^+ (NH_4^+) iyon alır, bunun yanında Cl^- atımına karşın HCO_3^- alınır. Bu değişimin tek amacının asit-baz dengesini korumak olduğu düşünülmektedir [28]. Balık solungaçlarında karbonik anhidraz $NaCl$ regülasyonunda rol oynar [29].

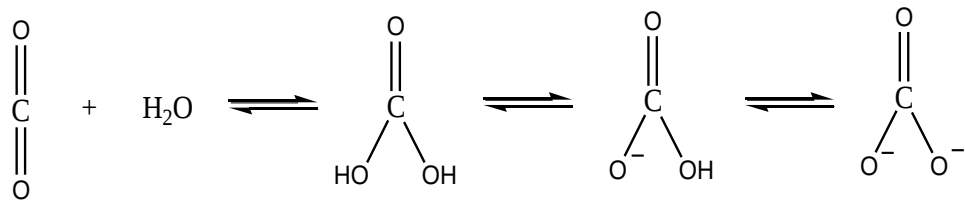
Tatlı su balıklarında karbonik anhidraz proton ve bikarbonat iyonları üretilen salgılar, bu salgılama sırasında Na^+ ve Cl^- iyonlarının tatlı sudan alınmasını sağladığı düşünülmektedir [30]. Sülfonamidlerden başka asetazolamid ve benzoamid' inde deniz canlılarının karbonik anhidraz aktivitesine inhibisyon etkisi gösterdiği bilinmektedir [31,32]. Sığır karbonik anhidrazı ile yapılan esteraz aktivitesi deneylerinde artan etkinliğe inhibe edici anyonlar; F^- , Cl^- , CH_3COO^- , Br^- , NO_3^- , HSO_3^- , HCO_3^- , ClO_4^- , I^- , N_3^- , SCN^- , CNO^- , HS^- , CN^- şeklindedir [33,36].

Son olarak karbonik anhidrazın CO_2 , HCO_3^- ve H_2O arasındaki dönüşümleri gerçekleştirmesi ile birçok dokularda hayati öneme sahip olduğunu söylemek mümkündür.

1.7.2. Fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri

Karbonik anhidraz, son derece önemli rol oynamasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kayıp olmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir [34].

Karbonik anhidraz, CO_2 ve H_2CO_3 veya ortamın pH' sına göre HCO_3^- ve CO_3 iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlem bir molekül olan CO_2 'in farklı açılara sahip piramidal yapıda H_2CO_3 ' e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır.



Karbonik anhidrazın bilinen on altı izoenziminden üçü olan CA I, CA II ve CA III kristallendirilmiş ve yapıları hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir. Üç izoenzim de sitoplazmada çözünmüş halde bulunur. Molekül ağırlıkları 28000 dalton olup, 259 veya 260 aminoasitten ibaret tek bir polipeptid zincir halindedir. Her bir enzim molekülünün aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş Zn^{+2} iyonu ihtiva etmektedir Zn^{+2} iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA' lar tam manasıyla aktiveden yoksundurlar [35,37].

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin izoelektrik pH' ları türden türe farklılık göstermekte ve aktivitesi ile bir korelasyona rastlanmamaktadır. Aminoasit bileşimleri yönünden benzerlik gösteren memeli, bakteri ve balık CA' ları ise bunlara nispeten daha yüksek seviyede sistein taşırlar [38,39].

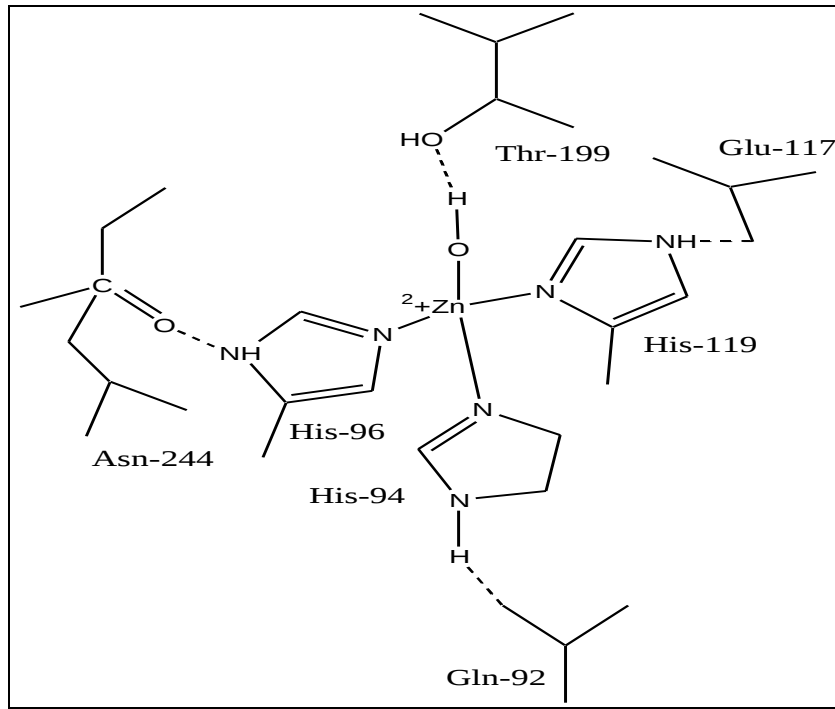
Karbonik anhidraz izoenzimlerinin, CO_2 , HCO_3^- ve H_2O arasındaki dönüşüm reaksiyonlarının katalizlemesinin yanı sıra, elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, bazı reaksiyonları da katalizlediği bilinmektedir. Bu reaksiyonlar, aldehit, piruvat ve alkil piruvatların

hidratasyonu, ayrıca piruvik , sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizini içeren dönüşümlerdir [40].

Karbonik anhidrazın esteraaz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir [41]. Ayrıca, tavşan CA III izoenziminin ise hem asit hem de alkalen fosfataz etkisi olduğu bildirilmiştir [42].

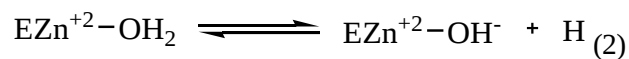
1.7.3. Karbonik anhidrazın enziminin katalitik mekanizması

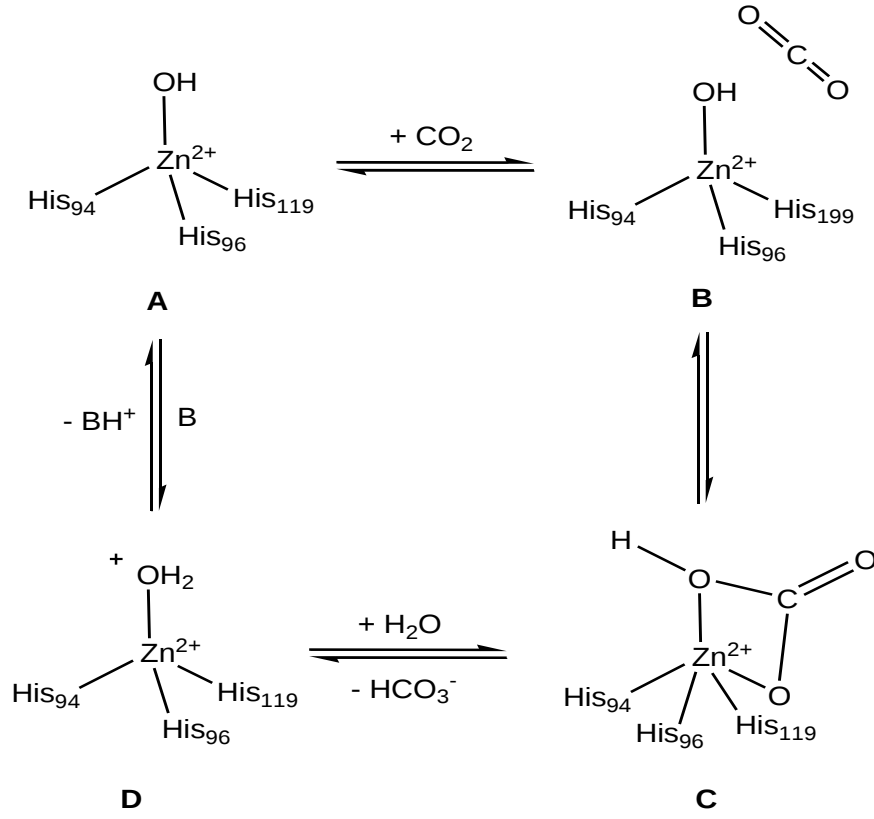
Son 60 yıldır yapılan çalışmaların neticesinde aydınlatılmaya çalışılmıştır. Buna göre CA enzimi, tetrahedral yapıdadır [34].



Şekil 1.4 İnsan CA II'deki metal merkezin “doğrudan ve dolaylı” ligandları gösteren şematik görünümü.

Katalitik olarak bu form inaktiftir. Tekrar temel A formunu oluşturmak için aktif bölgeden çevresine proton transferi olur [43]. İşlem şematik olarak şöyle gösterilebilir.



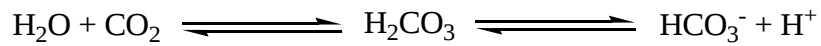


Şekil 1.5 Karbonik anhidrazın katalizlediği CO₂-hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi.

Katalizdeki hızı sınırlayan basamak ikinci reaksiyondur. CA II, CA IV, CA V, CA VII ve CA IX gibi katalitik olarak çok aktif olan izoenzimlerde, bu işlem aktif bölgede yerleşmiş histidin (His-64) rezidüsü yardımıyla çok etkili bir proton transfer işlemi gerçekleştirir [44].

1.7.4. Karbonik anhidraz aktivitesi

Karbonik anhidrazın aktivitesi; enzimin CO₂' in hidrasyonu bikarbonatın dehidrasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir.



Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, ortama göre CO₂ gazı çıkmakta veya harcanmaktadır. Aynı zamanda H⁺ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya azalan CO₂ gazı, kantitatif olarak manometrik yolla tespit edilebilir. Fakat, manometrik metodun reaksiyon pH'ının değişken olması, CO₂' in suda sınırlı çözülmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır [45].

İkinci olarak; ortamdaki H⁺ konsantrasyonu pH'ının yükselmesi veya düşmesi için geçen süre potansiyometrik yolla ya da inhibitörle belirlenebilir. Fakat, bu metodun kısa zaman alması gibi

bir avantajının yanı sıra, reaksiyon sırasında pH' nın değişken olması, CO₂' in suda sınırlı çözünmesi ve kullanılan indikatörün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da vardır [45]. Bu dezavantajları en aza indirmek için sabit pH' da titrasyon veya 0,02- 0,05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış metotlar aktivite tayininde kullanılmaktadır [44,45].

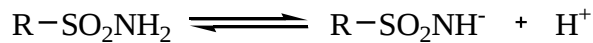
Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; CO₂ hidratasyonunda pH' nın 8,2' den 6,3' e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulunmaktadır. Enzim birimi ise, enzimsiz CO₂ hidratasyon süre (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi(t_c) arasındaki farkın, t_c' ye bölünmesi ile belirlenmektedir [46].

Enzimin esterase aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm' de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir [46,47].

1.7.5. Karbonik anhidraz inhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri iki sınıfta incelenmektedir ve bunlardan birincisi metallerle kompleks yapmış anyonlardır. Diğer grup ise, ya proteinsiz çinko ligandı tarafından süstitüe edilmesiyle enzimin Zn (II) iyonuna bağlanan veya genellikle trigonal-bipiramidal yapıda olan metal koordinasyon halkasına katılan inhibitörlerdir. Sülfonamidlerin, CA-I izoenziminin Zn (II) iyonunun tetrahedral yapısına bağlanması çok önemlidir.

Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.



Sülfonamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfonamid ligand olarak kullanılmaktadır [48,49].

Sülfonamidler, süstitüe olmamış bir -SO₂NH₂ grubu veya bir -SO₂NH(OH) grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun azot atomu aracılığıyla ilk olarak; enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde (R- SO₂NH⁻ veya R- SO₂N- OH⁻) iyonik olarak bağlanırlar. İkinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzime güçlü bir şekilde bağlanması; bu iki etkinin toplamının bir sonucudur [50,51].

Karbonik anhidraz inhibitörlerini yapılarına ve etki mekanizmalarına göre ayırmak mümkündür. Sülfonamidlerden elde edilen bu ilaçlar sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri ve topikal karbonik anhidraz inhibitörleri olarak iki sınıfta incelenir.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan Sepharose-4B, p-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), L-tirozin, trihidroksi metil aminometan (Tris), siyanojen bromür, sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum fosfat, hidroklorik asit, fosforik asit, aseton, etanol, sülfürik asit, akrilamid, tiyonil klorür, piridin, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250 ve R-250 E, sodyum hidroksit ve karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

2.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır. Kullanılan aletler ve cihazlar DPÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde bulunmaktadır.

Santrifüj: Nüve NF800

- Soğutmalı santrifüj: Sigma K30
- Spektrofotometre: UV-1700 Mod. Shimadzu Mar. + AKS
- pH metre: Schott Instruments/ Lab850
- Peristaltik pompa: Ismater MS- 4/8 Reglo digital 4 kanallı 8 tekerli
- Karıştırıcı: Vortex- Genie, Heidolp
- Hassas terazi: Ohaus- Adventurer
- Kronometre: Hanhard, Electronische Digital- Stoppuhr Germany
- Otomatik Pipetler : Biohit Proline
- Magnet karıştırıcı: Heidolp MR 3001
- Çalkalayıcı: GFL

2.3. Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

- 1) 0,05M Tris-SO₄, pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon): 6,055g (0,05 mol) Tris, 950 mL destile suda çözüldü. 1N H₂SO₄ ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.
- 2) 0,2 M NaHCO₃, pH=8,8 (Sepharose- 4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g (0,02 mol) NaHCO₃, 950 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

- 3) 0,0025 M Veronal tamponu; 5,15 g sodyum barbitalin 900 mL suda çözülüp, pH= 8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.
- 4) 25 mM Tris-HCl/ 0,1 M Na₂SO₄, pH= 8,7 (afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon): 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 14,2 g (0,1 mol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözülür. 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.
- 5) 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄, pH=8,7 (hemolizatin tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon): 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 3,124 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözülüp, 1N HCl ile pH= 8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.
- 6) 0,1 M NaCH₃COO/ 0,5 M NaClO₄, pH= 5,6 (kolona tutunmuş HCA-II izoenzimi ve CA enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g (0,075 mol) NaClO₄ ve 2,09 g (0,15 mol) NaCH₃COO.H₂O, 120 mL destile su ile çözülür. 1 N HCl ile pH'sı 5,6'ya getirildikten sonra, hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.
- 7) CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0 °C ' de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.
- 8) Coomasie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg Coomasie brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözülür. Bu çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.
- 9) Boyama çözeltisi (jelin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- 10) Yıkama çözeltisi (jelin yıkanması için kullanılan çözelti): %10 asetik asit olacak şekilde metanol ve su karıştırılarak yeterli miktarda hazırlandı.
- 11) Sabitleştirme çözeltisi (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- 12) İnhibitör stok çözeltileri: CA inhibitörü olarak temin edilen bileşiklerin %1'lik çözeltilerini hazırlamak için; her bir bileşikten 5'er mg alınıp 1 mL etil alkolde çözüldükten sonra, hacimleri 5'er mL'ye tamamlandı.

2.4. Yöntemler

2.4.1. Protein tayini

2.4.2. Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası; 280 nm' de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin

maksimum absorbans göstermesine dayanmaktadır. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre (ilgili tampon çözeltiye) karşı okundu.

2.4.3. Bradford (coomasie blue) yöntemi ile ilgili protein tayini

Bu yöntemle, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisinde ve hemolizatta protein tayini yapıldı. Bu yöntem, coomasie brilliant blue G-250' nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm' de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [52].

Tayin işlemlerinde ; 1 mL' sinde 1 mg protein ihtiva eden standart hemolizattan tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı ve saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL' ye tamamlandı. 5 mL coomasie reaktifi tüplere ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm' de 3 mL' lik küvetlere köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomasie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri standart grafik halinde verildi.

2.4.4. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini

2.4.4.1. CO₂ Hidrataz aktivitesi tayini

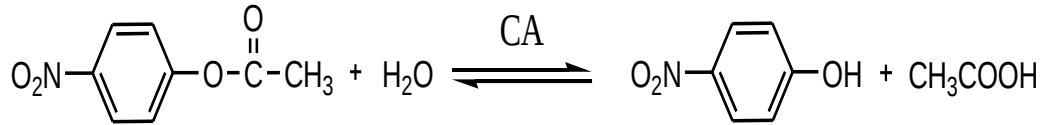
Aktivite tayini Wilbur Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO₂' in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle 8,2' den 6,3' e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulundu. Tampon olarak da, pH' sı 10 olan karbonat tamponundan (0,15 M Na₂CO₃ + 0,1 M NaHCO₃) yararlanıldı. Enzim birimi ise; enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, t_c' ye bölünmesi ile belirlendi.

Deneyde reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu, 0,6 mL su, 0,1 mL enzim ve 2,5 mL doygun CO₂ çözeltileri konuldu. pH' metreden pH' nın 6,3 civarına düşmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi (t_c). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine saf su konularak yapıldı (t₀). İnhibitörlü çalışmalarda ise; suyun hacmi, kullanılan inhibitör hacmi, kadar azaltılarak yerine inhibitör eklendi. Böylece aktivite ölçüm ortamının hacmi sabit tutulmuş oldu (4,2 mL). Bu yönteme göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini, yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Yani; $EU = (t_0 - t_c) / t_c$ formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için, enzim ünitesi hesaplanmıştır.

2.4.4.2. Esteraz aktivitesi tayini

İnhibitörlerin CA enzimi üzerindeki etkisini araştırmak için bu yöntem kullanıldı. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensip olarak karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan p-nitro fenil asetatı, 348 nm’ de absorbans veren p-nitro fenol veya p-nitro fenolat’ a hidroliz etmektedir .



348 nm’ de p-nitro fenol ve p-nitro fenolat’ ın her ikisi de aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir [35,53]. Bu dalga boyundaki p-nitro fenil asetatın da çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. Tayin işlemlerinde kuvartz küvetlere 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim konulmasından 3 dakika sonra 25 °C’ de 348 nm’ de absorbansı okundu. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak, karışımın 3 dakika sonraki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Bu suretle, 3 dakika içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve p-nitro fenil asetatın absorpsiyonu için düzeltme yapıldı. İnhibitörlü çalışmalarda ise suyun hacmi azaltılarak, yerine o miktarda inhibitör eklenerek aktivite tayinleri yapıldı.

Bu deneyde kullanılan p-nitro fenil asetat substrat çözeltisi, taze olarak hazırlandı. Bunun için 27,2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözöldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş yavaş eklendi. Bu çözelti 3 mM’ lik olup, daha derişğini hazırlamak esterin sınırlı çözünörlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton ise diğör organik çözücölere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğı için seçildi [54]. Enzim çözeltilisinin tamponlanması 0,05M Tris-SO₄ (pH=7,4) çözeltilisiyle yapıldı [55].

2.4.5. Carassius gibelio türü balıktan karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması

2.4.5.1. Sepharose -4B matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanışı

Sepharose 4B’nin CNBr ile aktifleştirilmiş formuna , tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak, tirozine kenetlendi. Burada tirozin; afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmaktadır [55].

3. ARASTIRMA BULGULARI

3.1. Balık Bakımı ve Temini

İsrail sazanı (*carassius gibelio*), Kütahya' nın Porsuk Barajından temin edilmiş ve Dumlupınar Üniversitesi Kimya Bölümünün Biyokimya laboratuvarında incelenmiştir.

3.2. Homojenatın Hazırlanması

Solungaçlar % 0,9' luk NaCl izotonik çözeltisiyle üç kez yıkanır. Sonra sıvı azot ya da -80 °C deki dolaplarda bir gece bekletilir. Donmuş olan solungaçlar havan içerisinde parçalandıktan sonra 25 mM Tris-HCl + 0,1 M Na₂SO₄ (pH=8,7) tamponu içerisine alınır ve 45 dakika kadar inkübisyona bırakılır. Süzgeç ve iki katlı tülbentte homojenat süzülür, katı pislikler uzaklaştırılmış olur [57]. Geriye kalan süpernatant kısmı soğutmalı santrifüjde 20000 rpm de 1 saat santrifüj yapılır. Santrifüj işleminden sonra homojenatın pH' ı kontrol edilerek katı Tris ile pH 8,7 ye ayarlanır.

3.3. İsrail Sazanı Solungaçlarından Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatoğrafisi ile Saflaştırılması

Sepharose-4B' den yapılan afinite kolonu içerisine 25mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄ (pH=8,7) tamponu koyulur ve homojenat kolon içerisine yavaş yavaş ilave edildi. Homojenat ilavesi bittikten sonra afinite jeli 25mM Tris-HCl/22mM Na₂SO₄ (pH=8,7) ile yıkandı. İsrail sazanı solungaçlarındaki karbonik anhidraz enzimi 1M NaCl/ 25mM Na₂HPO₄ (pH=6,3) tamponu ile elue edildi. Tüm işlemler 4 °C de yapılır [58].

Saf enzim elde edilmeye çalışıldı. Fakat, homojenatı santrifüj edecek yüksek devirli (20000 rpm'den yüksek) santrifüj olmadığı ve homojenat afinite kolonunu tıkadığı için saf enzim elde edilemedi.

3.4. Protein Tayini

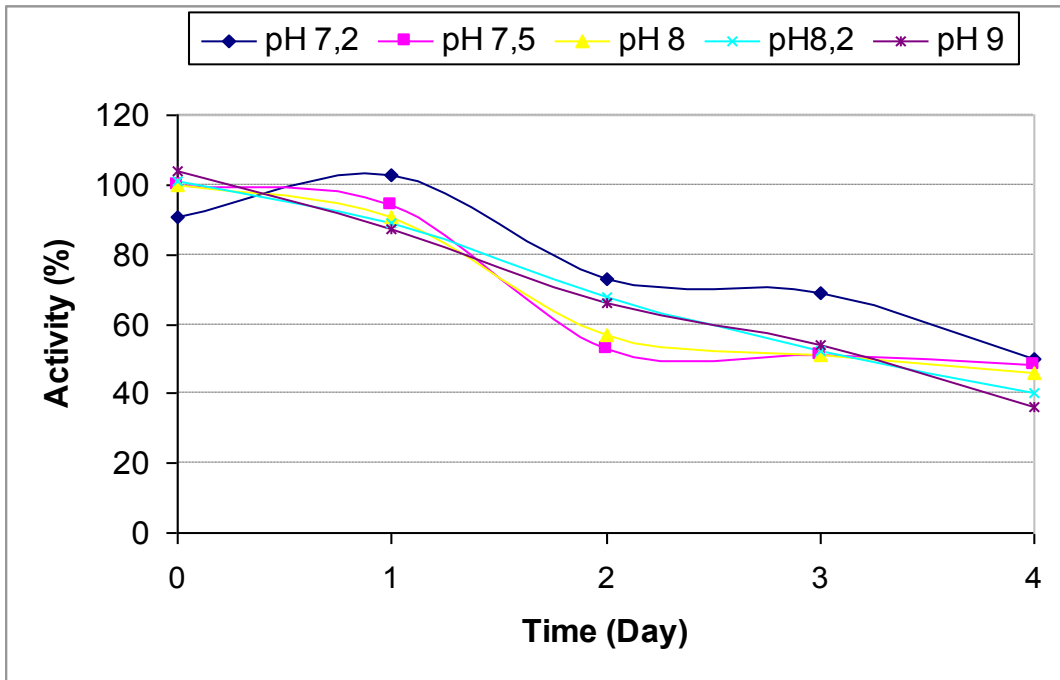
Saflaştırma adımları esnasında, protein miktarı sığır serum albumin standartında olduğu gibi 595 nm de Bradford metoduna göre tayin edildi [61].

3.5. Optimum pH Tayini

Optimum pH belirleme için; enzim esteraz aktivitesi 0,025M Tris-HCl, 0,025M fosfat ve 0,025M borik asit tamponları içerisinde pH (7,0-9,0), pH (5,0-7,5) ve pH (8,0-11,0) arasındaki pH değişimleri sırasıyla ölçüldü. Aktivitenin en yüksek olduğu pH, optimum pH olarak bulundu (pH 8,7).

3.6. Stabil pH Tayini

Burada amaç; enzim esteraz aktivitesi 0,025M Tris-HCl tamponunda pH (7,0-9,0) aralığında, 0,025M fosfat tamponunda pH (5,0-7,5) aralığında ve 0,025M borik asit tamponunda pH (8,0-11,0) aralığında tarama yapıldı. Her bir denemede eşit hacimde tampon ve enzim çözeltisi konulup, karıştırıldı ve +4 °C de tutuldu. Enzim aktivitesi 4 gün boyunca 24 saat aralığında tayin edildi. Stabil pH 'ın 8,7 değeri olduğu bulundu.



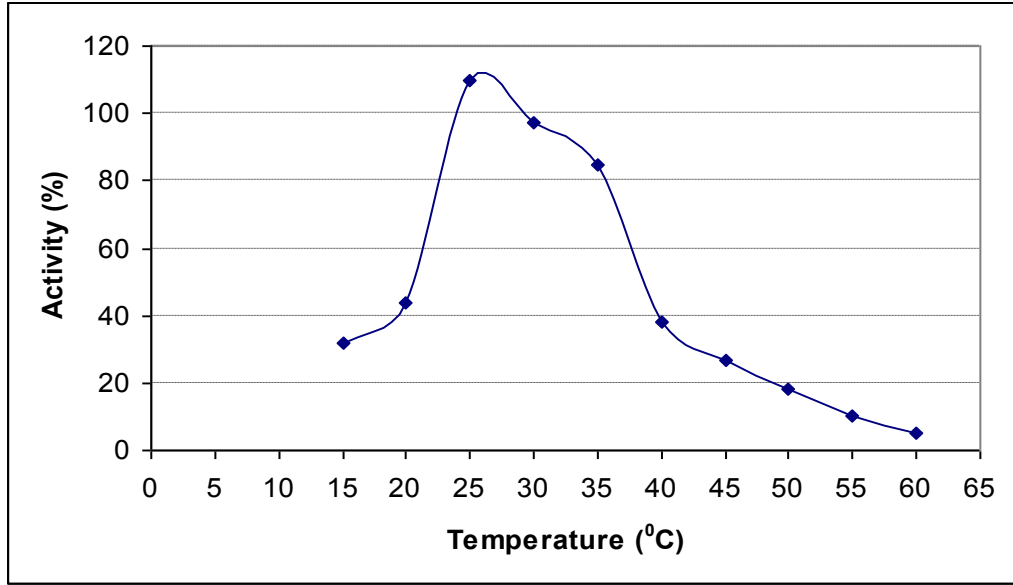
Şekil 3.1 Stabil pH ile aktivite arasındaki grafik

3.7. Optimum İyonik Şiddet Tayini

Enzim esteraz aktivitesine 0,025 M Tris-HCl ve fosfat tamponlarında pH' 8,7 de 1 M dan 0,1 M' a kadar seyreltme yapılarak tayin edildi. Optimum iyonik şiddet 1 M değeri olarak bulundu.

3.8. Optimum Sıcaklık Belirleme

Enzim esteraz aktivitesi 0,025 M Tris-HCl tamponunda pH (7,0-9,0) aralığında, 0,025 M fosfat tamponunda pH (5,0-7,5) aralığında ve 0,025 M borik asit tamponunda pH (8,0-11,0) aralığında 0-60 °C sıcaklık aralıklarında tarama yapıldı. Optimum sıcaklık olarak 25 °C olarak bulundu.



Şekil 3.2 Optimum sıcaklık ile aktivite arasındaki grafik

3.9. FCA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Jelin kolona yerleştirilmesi, tamponla dengelenmesi sonra solungaçlardan elde edilen hemolizat katı trisle pH'sı 8,7' ye getirildi. Hemolizat kolona direk olarak tatbik edildi. Tatbik etme işlemi bittikten sonra kolon yıkama tamponundan geçirildi. Yıkama işlemi solungaçların rengi kayboluncaya kadar yani köre (yıkama tamponuna) karşı 280 nm' de 0,08 A veya 0,05 A değerine kadar devam etti. Bu değere ulaşıldığında hCA I için hazırlanan tampon (pH=6,3) ile elüe edildi. Elüatlar 5 mL' lik fraksiyonlar halinde toplanarak, her tüpteki numune için 280 nm' de kalitatif protein tayini yapıldı. Elüsyon değerlerinin absoransı belli bir yükselme ve düşme gerçekleştikten sonra kesildi. Absorbans gösteren tüplerde CO₂-hidrataz aktivitesine bakıldı.

Çalışmalar sonucunda homojenatın yüksek devirli santrifüj olmadığından homojenat ve çökeleklerin tam olarak ayrılamadığını ve bu yüzden de afinite kolonunu tıkadığı görüldü ve enzim saf olarak elde edilemediği anlaşıldı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidroliz E.C.4.2.1.1) eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilen Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimdir [21]. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz (CA); canlılarda CO_2 ' in hidratasyon ve HCO_3^- in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir. Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri ise, aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir.

Karbonik anhidraz enzimi balıklarda osmotik ve asit-baz regülasyonunda önemlidir. Balığın solungaçları asit-baz ile ilgili iyon transferinde en önemli rolü olduğu iyi bilinmektedir [63]. CA enzimi, insan eritrositlerinden, balık solungaçları, balık eritrositlerinden ve karaciğeri dahil olmak üzere çeşitli dokulardan saflaştırılmıştır.

Balık solungaçları karmaşık bir organdır, asit-baz regülasyonu ve iyon taşınımı soluk alıp vermede gerekli olduğu bilinmektedir. CA in solungaç epitelyum hücrelerinde bol olarak bulunduğu varsayılır. Balıkta eritrosit CA birincil ve muhtemelen HCO_3^- dehidratasyon ucundadır. Solunum sırasında solungaç epiteli arasında CO_2 suya salınır [56]. CO_2 in küçük bir bölümü sitoplazmik CA tarafından hidratlıdır. HCO_3^- ve H^+ , Na^+/H^+ (NH_4^+) ve Cl^-/HCO_3^- gibi iyon değiştiricileri için tedarik sağlayıcıdır.

Bu çalışmada israil sazani solungacındaki CA enzimi Sephrose 4-B –tirozin –sülfanilamid afinite kolonu kullanılarak saflaştırılmaya çalışıldı fakat, homojenat afinite kolonunu tıkadığından dolayı saflaştırılamadı ve yüzden solungaçtan elde edilen homojenatla çalışıldı.

Carassius gibelio türü balıktan elde edilen homojenattaki karbonik anhidraz enzimlerinin stabil pH ' 8,7, optimum pH' ı 8,7, optimum sıcaklığı 25 °C, optimum iyonik şiddeti 1M Tris-HCl tamponu olduğu belirlendi. Yapılan deneyde FCA-I enziminin protein miktarı 0,005 mg/mL ve hidrataz aktivitesi 4,44 EU/mL bulundu. Fakat, carassius gibelio türü balığın solungaçlarından istenilen enzim aktivitesi elde edilemedi. Saf enzim elde edilemediği içinde elektroforezi yapılamadı.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Alikunhi, K. H. 1966, Synopsis of Biological Data On Common Carp, *C. carpio* L. 1958. FAO. World Symposium On Warm- water Pond Fish Culture. ROME
- [2] Çelikkale, S. 1988, İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği K.T.Ü. SDBT Fak. Yay. No.3 TRABZON
- [3] Horvarth, L., Tamas, G., and Tölg. İ. 1984, Special Methods İn Pond Fish Husbandry. Akademia Kiado. BUDAPEST
- [4] Comition, 1984, Better Freshwater Fish Farming, The Fish, FAO Better Farming Series. 30 ROME
- [5] Özden, O., Y. Güner, A. G. Alpbaz, M. Altunok, 1998, Kıyı Ötesi Ağ Kafes Teknolojisi, E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Dergisi. Cilt:15 Sayı:1-2,
- [6] Zohar, Y., R. Billard, C. 1984, Weil, La reproduction de la daurade et du bar: Le cycle sexuel et l' induction de la ponte. In aquaculture de bar et des Sparides, (eds R. Billard; G. Barnabe), pp. 3-24. INRA Press, Paris.
- [7] Fırat Kürşat , Şahin SAKA, Levrek (*Dicentrarchus labrax* Lin., 1758) Balığının Biyolojisi Ve Yetiştirme Teknikleri, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Yetiştiricilik Anabilim Dalı, İzmir.
- [8] Zou, Z., Cui, Y., Gui, J. ve Yang , Y. 2000, Growth and feeding utilization in two strains of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*: patterns effects in a gynogenetic fish. J. Appl. Ichthyol., 17:54-58
- [9] Kottelat, M. 1997, European Freshwater Fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. Biologia 52 (Suppl. 5):1-271
- [10] Szczerbowski, j. A. 2001, *Carassius Jarocki*, 1822. p. 1-78. In: P.M. Banareescu & H.J. Paepke. The Freshwater Fishes of Europe.
- [11] Baran, I., Ongan, T. 1988, Gala Gölü'nün limnolojik özellikleri , balıkçılık sorunları ve öneriler. Gala Gölü ve Sorunları Sempozyumu, Doğal Hayatı Koruma Derneği Bilimsel Yayınlar Serisi, İstanbul, s.46-54.
- [12] Özuluğ, M. 1999, A taxonomic study on the fish fauna in the Basin of Büyükçekmece Dam Lake. Tr.J.of Zoology. 439-451
- [13] Kalous, L., Memiş, D., Bohlen, Jörg, 2004, Finding of triploid *Carassius gibelio* (Bloch, 1780) (Cypriniformes, Cyprinidae) in Turkey. Cybium 28:77-79
- [14] Paulovits, G., Tatrai, I., matyas, K., Korponai, J. & Kovats, N., 1998, Role of Prussian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) in the nutrient cycle of the Kis-Balaton Reservoir. Int. Rev. Hydrobiol., 83, Suppl.: 467-470.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [15] Özuluğ, M., Acıpinar, H., Gaygusuz, Ö., Gürsoy, Ç and Tarkan, A. S. 2005, Effects of human factor on the fish fauna in a drinking-water resource (Ömerli Dam Lake-İstanbul, Turkey). Res.J.Agric.&Biol.sci.1:50-55.
- [16] Geldiay, R., ve Balık S., (1996), Türkiye Tatlısu Balıkları. Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi, No:97, 532 s., İzmir.
- [17] Boyhan, M. 1987, Hançer, N. 1987, Biyokimya ve Besin Kimyası, Milli Eğitim Basımevi, İstanbul .
- [18] Maren, T. H. and Janskowska, L., 1985, Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot. Cur.Eye. Res.,4, 399.
- [19] Owa, T. And Nagasu, T. 2000, Exp. Opin. Ther. Patents, 10,1725.
- [20] Keha, E. E. ve Kührevioğlu, Ö. İ. 2000, Biyokimya. Şafak Yayınları, Erzurum, 97-125.
- [21] Bingöl. G., 1983, Biyokimya. Güven Matbaası, 285.
- [22] Arslan, O., Kührevioğlu, Ö. İ. and Nalbantoğlu, B., 1997, Synthesis and Investigation of Inhibition Effects of New Carbonic Anhydrase Inhibitors. Bioorg.Med.Chem.,5,515-518.
- [23] Fersht, A. Enzyme Stcucture and Mechanism. W.H.Freeman and Company 1985:436-439
- [24] Maren, T. H. Carbonic Anhydrase; Chemistry, Physiology and Inhibition. Rev.1967:47:595- 81.
- [25] Hewett-Emmentt, D., 2000, In The Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 29-78
- [26] Foskett. J. K. and Scheffey. C.:The Chloride Cell:Definitive Identification as the Salt-Secretary Cell in Teleosta. Science (Washington, D.C.) 1982:215:164-166.
- [27] Conley. D. M. and Mallatt. J.: Histochemical Loclization of Na⁺- K⁺ ATPaz and Carbonic Anhydrase Activity in Gills of 17 Fish Species. Con.J.Zool. 1982:66:2398-2405.
- [28] Heisler. N.: Acid-base Regulation in Fishes. In Fish Physiology. Vol. 10A. Ed by W.S. Hoar and D.J. Rondall Academic Pres. Newyork 1984:315-401.
- [29] Lacy. E. R.: Histochemical and Biochemical Studies of Carbonic Anhydrase Activity in the Opercular Epithelium of Euryhaline Teleost. Fundulus heteraclitus. Am.J.Anat. 1983:166:19-39.
- [30] Maetz. J. and Garcia Romeu F.: the mechanism of Sodium and Chloride Uptake by the Gills of a fresh water fish. Carassius auratus. II. Evidence for NH₄⁺/Na⁺ and HCO₃⁻/Cl⁻ exchanges.J.Gen.Physiol.1964:47:1209-1227.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [31] Henry. R. P. Samtresh. N. J. Comeron. J. N.: The Distribution of Branchial Carbonic Anhydrase and the Effectsof Gill and Erythrocyte Carbonic Anhydrase Inhibition in the Channel Catfish. *Ictalurus punctatus*. *J.Exp.Biol.* 1988:134:201-218.
- [32] Shottcher. K. And Siebers. D.: Biochemistry localization and Physilogy of Carbonic Anhydrase in the Gills of Euryholine Crabs. *J. Exp. Zool.* 1993:265:397-409.
- [33] Carter. N. D. Hawett-emmett. D., Jeffrey. S., and Tashian R.E.: Testosterone- Induced Sulfonamide Resistant Carbonic Anhyrase Isozyme of Rat Liver is Indistinguishable from Skeletal Muscle Carbonic Anhydrase III. *Frebs Letters* 1981:128:114-118.
- [34] Pocker, Y. and Janjic, N., 1989, Molecularity of Water in Ezymic Catalysis. Application to Carbonic Anhydrase II, *J.Am. Chem.Soc.*, 111, 731 p.
- [35] Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., 1966, Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 214, 5137 p.
- [36] Barman, T.1985, E:Enzyme Handbook, Springer Verlag, New York Berlin Heidelberg Tokyo.
- [37] Scher, A. and Dietsch, P., 1984, A 54000 molecular weigth protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. In *Biology and Chemistry of the carbonic anhydrase*. *Annals New York Acad. Sci.*, 429,241.
- [38] 52 Rickli, E. E., Ghazanfar, S. A. S., Gibbons, B. H. and Edsall, J. T., 1964, Carbonic anhdrase from human erythroctes. *J.Biol.Chem.* 239, 1065.
- [39] Nyman, P. O. and Lindskop, S., 1964, Aminoacid compositions of the various forms of bovine and human erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 85, 1411.
- [40] Pocker, Y. and Sarkanen, S., 1979, Carbonic Anhydrase; Structure, catalytic versatility and inhibition. *Advances in Enzymology*, 49,149.
- [41] Kaiser, E. T. and Lo, K. W., 1969, The carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2- hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultone. *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 4912.
- [42] Wistrand, P. J., 1980, Solubilization and preliminary characterization of membrane- bound carbonic anhydrase. *Uppsala J. Med. Sci.*, 85,75.
- [43] Björkbacka, H., Johansson, I. M., Skarfstad, E. and Formsan, C., 1997, The sulfhydryl groups of Cys269 anol Cys272 are critical for oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativun*. *Biochem.*, in pres.
- [44] Stams, T., Chen, Y., Boriack- Sjodin, P. A., Hurt, J.D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis. P. and Christianson, D. W., 1998, *Protein Sci.*, 7, 556 p.
- [45] Maren, T. H. and Conroy, C. W., 1993, A new Class of carbonic anhydrase inhibitör. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [46] Briganti, F., Pierattelli, A., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 1996 Eur. J. Med. Chem., 31,1001 p.
- [47] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity J. Pharm. And. Toxicol. Meth., 38, 169-172 p.
- [48] Hakansson, K., Carlsson, M., Svensson, L.A. and Liljas, A.1992, Structure of native and apo carbonic anhydrase II. J. Mol. Biol. 227:1192-1204 p.
- [49] Roughton, F. J. W. and Booth, V. H. 1946, The Effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. Biochem. J. (40) : 319 p.
- [50] Tozlu, İ., 1997, Eritrositlerden Afinit Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Van.
- [51] Lidskog, S. and Wistrand, P. J. 1988, Inhibitors of carbonic anhydrase. In: Design of Enzyme Inhibitors as Drugs, pp. 698-723 p.
- [52] 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 p.
- [53] Kandel, M., Gonall, A. G., Wong, S. and Kondel, S. I., 1970, Some characteristics of human, bovine and horse carbonic anhydrase as revealed by inactivation studies. J. Biol. Chem., 245, 2444p.
- [54] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characterization of carbonic activity. J. Pharm and Toxicol. Meth., 38, 169-2444p.
- [55] Kohn, J. and Wilchek, M. A., 1978, Colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. Biochem. Biophys. Res. Com., 7, 14 p.
- [56] Arena (Applied Research Ethics National Association), 2002, Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook, 2nd Edition, Boston, pp. 121-125.
- [57] N. Le Trang, K. K. Bhargava, A. Cerami, Purification of glutathion reductase from gerbil liver in two steps, Anal. Biochem. 133 (1983) 94-99.
- [58] E. Bayram .M. Sentürk. O.I.Kührevioğlu, C.T. Supuran. In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 9101-9105.
- [59] Wilbur, K. M., and Anderson, N. G., 1976, “Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase.” J. Biol. Chem., 176, pp. 147-151.
- [60] Verpoorte, J. A., Metha, S., and Edsall, J. T., 1967, “Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C.” J. Biol. Chem., pp. 242: 4221-4229.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [61] 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, pp. 248-251.
- [62] Supuran, C. T., and Scozzafa, A.; 2002, "Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy." Exp. Opin. Ther. Pat., 12, pp. 217-242.
- [63] Beydemir, S., Çiftçi, M., Kufreviöglü, O. I., and Buyukokuroglu, M. E., 2002, "Effects of gentamisin sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo." Biol. Pharm. Bull., 25, pp. 966-969.
- [64] Testereci, H., Sekin, S., and Ekin, S., 1999, "A study on esterase activity of carbonic anhydrase from Van Lake fish (*Calcalburnus tarichi*) ." Turk. J. Vet. Anim.Sci., 23 pp. 145-153.