

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**MERSİN BALIĞI (*Acipenser gueldenstaedti*) ERİTROSİTLERİNDEN ELDE  
EDİLEN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Fatma YAYLACI KARAHALİL**

**HAZİRAN 2009  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**MERSİN BALIĞI (*Acipenser gueldenstaedti*) ERİTROSİTLERİNDEN ELDE  
EDİLEN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**Fatma YAYLACI KARAHALİL**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“Doktor (Kimya)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 10.06.2009  
Tezin Savunma Tarihi : 26.06.2009**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Edip KEHA  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Murat KÜÇÜK**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2009**

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada, tüm canlılarda bulunan ve solunum sisteminin önemli enzimlerinden biri olan karbonik anhidraz enzimi mersin balığı (*acipenser gueldenstaedti*) eritrositlerinden ilk kez saflaştırılmış ve karbonik anhidraz enziminin bazı özellikleri ortaya çıkartılmıştır. Çalışmanın tüm deneysel kısımları Kimya bölümü Biyokimya anabilim dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Doktora tezi olarak yürütülen çalışma aynı zamanda Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri fonu tarafından (Proje No: 2004.111.002.08) desteklenmiştir. Doktora tezine yapmış oldukları katkılardan dolayı KTÜ BAP Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Nesli tükenmekte olan ve avcılığı yasak olan mersin balıklarını kendi çalışmaları için yetiştiren ve çalışmada kullanmamıza imkan sağlayan aynı zamanda tez izleme jüri üyem olarak görev yapmış olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ'a sonsuz teşekkür eder, kendisine Allah'tan rahmet dilerim.

Tüm akademik çalışmalarında yanımda olan ve hiç bir konuda desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya ve tezimin her aşamasında bilgisine danıştığım Doç. Dr. Murat KÜÇÜK'e ve Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER'e ve laboratuvarındaki imkanlarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Nurettin YAYLI'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarında hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, sürekli destek olan değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Esra ULUSOY'a, Arş. Gör. Hüseyin ŞAHİN'e, Öğretim Gör. Özlem TARHAN'a ve Zehra CAN'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve Karbonik anhidraz enzimi konusunda Türkiye'de ve Dünya'da söz sahibi olan Atatürk Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya anabilim dalından saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e ve Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım sırasında ve hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteğini gördüğüm sevgili eşim Arş. Gör. Uzun KARAHALİL' e ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Fatma Yaylacı KARAHALİL

Trabzon 2009

## İÇİNDEKİLER

|  | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| ÖNSÖZ.....   | II              |
| İÇİNDEKİLER.....   | III             |
| ÖZET.....  | VI              |
| SUMMARY.....   | VII             |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | VIII            |
| TABLolar DİZİNİ.....   | X               |
| KISALTMALAR DİZİNİ.....  | XI              |
| 1. GENEL BİLGİLER.....   | 1               |
| 1.1. Giriş.....  | 1               |
| 1.2. Enzimler.....   | 1               |
| 1.2.1. Oksidoredüktazlar.....                                    | 4               |
| 1.2.2. Transferazlar.....  | 4               |
| 1.2.3. Hidrolazlar.....  | 4               |
| 1.2.4. Liyazlar.....   | 4               |
| 1.2.5. İzomerazlar.....  | 4               |
| 1.2.6. Ligazlar (Sentetazlar).....                               | 5               |
| 1.3. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....                          | 5               |
| 1.3.1. Enzim Aktivitesine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi.....    | 6               |
| 1.3.2. Enzim Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi..... | 6               |
| 1.3.3. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....                 | 6               |
| 1.3.4. Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi.....                      | 7               |
| 1.3.5. Enzim Aktivitesine Zamanın Etkisi.....                    | 7               |
| 1.4. Enzimlerin İnhibisyonu.....                                 | 8               |
| 1.5. Enzimlerin Hastalıklarda Kullanılmaları.....                | 8               |
| 1.6. Bazı Koenzimler.....  | 10              |
| 1.6.1. Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD).....                 | 10              |
| 1.6.2. Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADP).....         | 11              |
| 1.6.3. Flavin Adenin Dinükleotid (FAD).....                      | 11              |
| 1.6.4. Koenzim-A (Co-A).....                                     | 12              |
| 1.7. Karbonik Anhidraz Hakkında Bilgi.....                       | 13              |
| 1.7.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri.....                       | 18              |
| 1.7.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....                      | 19              |
| 1.7.3. Balıklarda Karbonik Anhidrazın Fonksiyonu.....            | 21              |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1.8.    | Mersin Balığı .....   | 23 |
| 1.9.    | Pestisitler .....   | 24 |
| 1.10.   | Afinite Kromarografisi .....  | 26 |
| 1.11.   | Amaç .....  | 27 |
| 2.      | MATERYAL VE METOT .....   | 28 |
| 2.1.    | Kullanılan Kimyasal Maddeler .....  | 28 |
| 2.2.    | Kullanılan Alet ve Cihazlar .....   | 29 |
| 2.3.    | Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....  | 29 |
| 2.4.    | Mersin Balığından Kan Örneklerinin Alınması ve Eritrosit Hemolizatının Hazırlanması .....                                       | 32 |
| 2.5.    | Sefaroz-4B Afinite Kolonunun Hazırlanması .....   | 34 |
| 2.5.1.  | CNBr ile Aktive Edilmiş Sefaroz-4Bye L-Tirozin Takılması .....  | 34 |
| 2.5.2.  | Sulfanilamid Kenetlenmesi .....   | 34 |
| 2.6.    | Balık Hemolizatının Kolona Uygulanması .....  | 36 |
| 2.7.    | Karbonik Anhidraz Enziminin Elüsyonu .....  | 36 |
| 2.8.    | Protein Tayini .....  | 37 |
| 2.8.1.  | Kalitatif Protein Tayini .....  | 37 |
| 2.8.2.  | Kantitatif Protein Tayini (Bradford Yöntemi) .....  | 37 |
| 2.9.    | Elüatlarda Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayini .....  | 38 |
| 2.9.1.  | Hidrataz Aktivitesi Tayini .....  | 39 |
| 2.9.2.  | Esteraz Aktivitesi Tayini .....   | 40 |
| 2.10.   | Spesifik Aktivite Tayini .....  | 41 |
| 2.11.   | Diyaliz .....   | 41 |
| 2.12.   | Enzim Çözeltilisinin Liyofilizasyonu .....  | 42 |
| 2.13.   | SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....   | 42 |
| 2.14.   | Mersin Balığı Eritrositlerin Safaştırılan CA Enzimi ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar .....                                 | 43 |
| 2.14.1. | Optimum pH Çalışması .....  | 43 |
| 2.14.2. | Optimum İyonik Şiddet Çalışması .....   | 43 |
| 2.14.3. | Optimum Sıcaklık Çalışması .....  | 43 |
| 2.14.4. | <i>p</i> -Nitrofenil Asetat ( <i>p</i> -NFA) Substratı İçin $K_m$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve $V_o$ Değerlerinin Bulunması ..... | 44 |
| 2.14.5. | CA'nın İnhibisyon Değerlerinin İncelenmesi .....  | 44 |
| 3.      | BULGULAR .....  | 46 |
| 3.1.    | Kalitatif Protein Tayini .....  | 46 |
| 3.2.    | Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik .....   | 47 |
| 3.3.    | CA'nın Mersin Balığı Eritrositlerinden Safaştırması .....   | 48 |
| 3.4.    | Mersin Balığı Eritrositlerinden Safaştırılan CA'nın Optimum pH Değerinin Belirlenmesi .....                                     | 48 |
| 3.5.    | Mersin Balığı Eritrositlerinden Safaştırılan CA'nın Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi .....                               | 49 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.6.  | Mersin Balığı Eritrositlerinden Saflaştırılan CA'nın Optimum İyonik Şiddet Değerinin Belirlenmesi.....  | 49 |
| 3.7.  | Mersin Balığı Eritrositlerinden Saflaştırılan CA Optimum Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....   | 50 |
| 3.8.  | Mersin Balığı Eritrositlerinden Saflaştırılan CA'nın <i>p</i> -NPA İçin $K_m$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve $V_0 (k_{cat}/K_m)$ Değerlerinin Belirlenmesi..... | 51 |
| 3.9.  | İnhibisyon Çalışmaları.....   | 52 |
| 3.10. | SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez Bulguları.....   | 58 |
| 4.    | TARTIŞMA.....   | 61 |
| 5.    | SONUÇLAR.....   | 68 |
| 6.    | ÖNERİLER.....   | 69 |
| 7.    | KAYNAKLAR.....  | 70 |

ÖZGEÇMİŞ

## ÖZET

Bu çalışmada mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedti*) eritrositlerinden Karbonik anhidraz enzimi ilk kez saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Enzim Sefaroz-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonundan balık kanına göre 539 kat ve %29 verimle saflaştırılmıştır. Mersin balığı eritrositlerinde tek izoenzimin olduğu ve spesifik aktivitesinin 26943 EUxmg<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir.

Enzimin saflığını ve alt birim molekül kütlelerini tespit etmek için sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi(SDS-PAGE) yapılmış ve tek alt birimden oluştuğu gözlenmiştir. Enzimin alt birim molekül kütlesi 29 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin esteraz aktivitesine göre pH 9.0' da 30 °C sıcaklıkta ve 0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> tamponunda optimum aktivite gösterdiği bulunmuştur. Enzimin K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> kinetik değerleri *p*-nitrofenil asetat (*p*-NFA) substratı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğine göre hesaplanmış ve sırasıyla K<sub>m</sub> 4 mM ve V<sub>max</sub> 20 mM/dakika olarak tespit edilmiştir. Enzimin etkinliğini belirlemek için k<sub>cat</sub> ve k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> değerleri belirlenmiştir. *p*-NFA'a karşı k<sub>cat</sub> değeri 20,8 s<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Enzimin sülfanilamid ve asetazolamid inhibitörlerine karşı 4.0 µM ve 0.1 µM gibi oldukça düşük IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu bulunmuştur. IC<sub>50</sub>, enzimin %50'sini inhibe eden inhibitör konsantrasyonu olup düşük IC<sub>50</sub> yüksek inhibisyon değerini göstermektedir. Ayrıca enzimin Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> ve Ag<sup>+</sup> iyonları tarafından değişen IC<sub>50</sub> değerlerinde inhibe olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çevresel kirlilik oluşturan bazı pestisitler tarafından hidrataz aktivitesine göre değişen IC<sub>50</sub> değerlerinde inhibe olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Karbonik Anhidraz, Mersin Balığı, Ağır Metal, Pestisit

## SUMMARY

### **Purification, Characterization and Kinetical Properties of Carbonic Anhydrase from Sturgeon (*acipenser gueldenstaedti*) Erythrocytes**

In this study, sturgeon erythrocyte purification and characterization of carbonic anhydrase (CA) have been performed for the first time. The enzyme was purified from sepharose 4-B L-tyrosine-sulphanilamid column by a purification 539-fold and %29 yield. The specific activity of the enzyme was measured as 26943 EUxmg<sup>-1</sup>.

SDS gel electrophoresis was applied to determine the purification of the enzyme and subunit molecular weights and observed as a single band. The subunit molecular weight of the enzyme was evaluated as 29 kDa. It was shown that the enzyme performs best at a pH 9.0 and 30 °C in 0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> buffer.  $K_m$  and  $V_{maks}$  kinetic values were evaluated using *p*-NPA through Lineweaver-Burk graphic and measured as 4 mM for  $K_m$  and 20 mM/min for  $V_{max}$  respectively. For determining the efficacy of the enzyme  $k_{cat}$  and  $k_{cat}/K_m$  values were evaluated.

*p*-NPA  $k_{cat}$  value was calculated as 20.8 s<sup>-1</sup>. It was found that the enzyme has a IC<sub>50</sub> value of 4 μM and 0.1 μM for sulphanilamid and asetazolamid inhibitors. IC<sub>50</sub> is the inhibitor concentration which inhibits the 50 percent of the enzyme and low IC<sub>50</sub> value shows high inhibition rate. It was shown that the enzyme is inhibited by Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> and Ag<sup>+</sup> ions at different IC<sub>50</sub> values. It was also shown that the enzyme is inhibited by some pesticides which cause environmental pollution at different IC<sub>50</sub> values which have the changing hydratase activity.

**Key Words:** Carbonic Anhydrase, Sturgeon, Heavy Metal, Pesticide



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Şekil 1. Enzim aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi.....                      | 6               |
| Şekil 2. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi.....                                      | 7               |
| Şekil 3. Enzim aktivitesine pH'ın etkisi.....   | 7               |
| Şekil 4. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) .....                                     | 11              |
| Şekil 5. Flavin adenin dinükleotid (FAD) .....  | 12              |
| Şekil 6. Koenzim-A (CoA) .....  | 12              |
| Şekil 7. Karbonik anhidraz enziminin CO <sub>2</sub> hidrasyon kataliz mekanizması..... | 17              |
| Şekil 8. Kırmızı kan hücresinde Jacob-Stewart çevrimi.....                              | 22              |
| Şekil 9. Mersin balıklarından birinin ( <i>Acipenser gueldenstaedti</i> ) görünümü..... | 23              |
| Şekil 10. Mersin balığının benzokainli havuzda kan alınımına hazırlanması.....          | 32              |
| Şekil 11. Mersin balığından kan örneklerinin alınması.....                              | 33              |
| Şekil 12. Diazolama ile sefaroz 4B–L-tirozin'e sülfanilamid takılması.....              | 35              |
| Şekil 13. Elüatlarda tespit edilen kalitatif protein tayini.....                        | 46              |
| Şekil 14. Elüatlarda tespit edilen CA' nın hidrataz aktivitesi.....                     | 47              |
| Şekil 15. Bradford yöntemine göre protein standart çalışma grafiği.....                 | 47              |
| Şekil 16. Optimum pH çalışması grafiği.....   | 48              |
| Şekil 17. Optimum sıcaklık çalışması grafiği.....                                       | 49              |
| Şekil 18. Optimum iyonik şiddet çalışması grafiği.....                                  | 50              |
| Şekil 19. Optimum substrat konsantrasyonu çalışma grafiği.....                          | 50              |
| Şekil 20. Karbonik anhidrazın p-NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği..... | 51              |
| Şekil 21. Çözücü DMSO'nun inhibisyonu.....  | 52              |
| Şekil 22. Asetazolamid inhibisyonu (Esteraz Aktivitesi).....                            | 53              |
| Şekil 23. Sülfanilamid inhibisyonu (Esteraz Aktivitesi).....                            | 53              |
| Şekil 24. Zn <sup>+2</sup> inhibisyonu (Esteraz Aktivitesi).....                        | 54              |
| Şekil 25. Cu <sup>+2</sup> inhibisyonu (Esteraz Aktivitesi).....                        | 54              |
| Şekil 26. Ag <sup>+</sup> inhibisyonu (Hidrataz Aktivitesi).....                        | 55              |
| Şekil 27. Co <sup>+2</sup> inhibisyonu (Esteraz Aktivitesi).....                        | 55              |
| Şekil 28. Korsulfan inhibisyonu (Hidrataz Aktivitesi).....                              | 56              |
| Şekil 29. Hektavin inhibisyonu (Hidrataz Aktivitesi).....                               | 56              |
| Şekil 30. 2,4-DCP inhibisyonu (Hidrataz Aktivitesi).....                                | 57              |
| Şekil 31. Dikotan inhibisyonu (Hidrataz Aktivitesi).....                                | 57              |
| Şekil 32. Antrakol inhibisyonu (Hidrataz Aktivitesi).....                               | 58              |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Şekil 33. | SDS-poliakrilamid jel elektroforezi.....   | 59 |
| Şekil 34. | SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile mersin balığı eritrosit CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart Rf grafiği..... | 60 |

## TABLULAR DİZİNİ

|   | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|---|------------------------|
| Tablo 1. Esteraz aktivitesi düzeyleri.....  | 15                     |
| Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar.....      | 28                     |
| Tablo 3. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar ve satın alındıkları firmalar..... | 29                     |
| Tablo 4. Çalışmada kullanılan çözeltilerin adı ve hazırlanması.....               | 29                     |
| Tablo 5. Hidrataz aktivitesi için pipetlemeler.....                               | 39                     |
| Tablo 6. Esteraz aktivitesi için pipetlemeler.....                                | 40                     |
| Tablo 7. Mersin balığı eritrositlerinden CA enziminin saflaştırma tablosu.....    | 48                     |
| Tablo 8. Mersin balığı eritrosit karbonik anhidrazının kinetik sabitleri.....     | 52                     |
| Tablo 9. Karbonik anhidraz için IC <sub>50</sub> inhibisyon değerleri.....        | 58                     |

## KISALTMALAR DİZİNİ

|      |  |
|------|--|
| CA   | Karbonik Anhidraz                        |
| NAD  | Nikotinamid (Niyasin) Adenin Dinükleotid |
| NADP | Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat    |
| FAD  | Flavin Adenin Dinükleotid                |
| FMN  | Flavin Mono Nükleotid                    |
| TPP  | Tiamin Pirofosfat                        |
| Co-A | Koenzim-A                                |
| Lys  | Lizin                                    |
| Tyr  | Tirozin                                  |
| His  | Histidin                                 |
| PTB  | Proton Taşıyıcı Birim                    |
| DMSO | Dimetil Sulfoksit                        |

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

### 1.2. Enzimler

Kimyasal reaksiyonları hızlandıran bileşiklere katalizörler denir. Enzimler metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran protein yapısında bulunan biyolojik katalizörlerdir. Canlı sistemlerdeki biyolojik reaksiyonların hemen hemen hepsi enzim adı verilen biyolojik katalizörler tarafından katalizlenirler. Enzimler sadece reaksiyonları katalizlemekle kalmayıp reaksiyonların çok yüksek verimde, ılımlı şartlar altında, yüksek reaksiyon spesifikliğinde gerçekleşmesini de sağlamaktadırlar. Ayrıca regülasyonu sağlayıcı pek çok özellikleri de bulunmaktadır (Voet ve Voet, 2003). Katalitik RNA molekülleri hariç bütün enzimler protein yapısındadırlar. Proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş gurubunu oluştururlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

“Hayat katalizdir” ilkesine bağlı olarak üzerinde en çok çalışma yapılan biyomoleküller enzimlerdir.

Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli faaliyetler çeşitli metabolik reaksiyonların sonucudur ve bu reaksiyonlar enzimlerin katalitik etkisiyle mümkün olmaktadır.

Enzimlerin protein kısmına “*apoenzim*” denir. Apoenzim ısı ile kolayca denatüre olur. Enzimlerin bazıları basit yapılı proteinlerdir. Bunların katalitik etki gösteren kısmı doğrudan doğruya proteinin polipeptit zinciridir. Birçok enzimin katalitik etki gösterebilmesi için proteinden başka metal iyonuna, bazılarının protein olmayan organik bir bileşiğe, bazılarının ise her ikisine de ihtiyacı vardır. Bu iyon veya bileşiğe genel olarak “*kofaktör*” adı verilir. Organik bileşik, enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmiş ve ayrılmıyorsa “*prostetik grup*” çok sıkı birleşmemiş ve ayrılabiliriyorsa “*koenzim*” adını alır. Koenzimi ile birleşik halde bulunan Apoenzim-Koenzim bütününe “*holoenzim*” adı verilir. Yani Holoenzim, koenzim veya kofaktörü ile birlikte katalitik olarak aktif durumdadır.

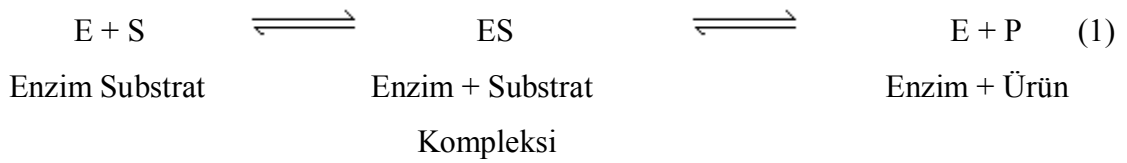
Yapıları sadece proteinden ibaret olup, koenzim veya prostetik grup gibi bir kısım ihtiva etmeyen enzimlere örnek olarak, pepsin, tripsin, üreaz gösterilebilir. Katalitik etki gösterebilmek için metal iyonuna ihtiyacı olan karbonik anhidraz; çinko protein; tirozinaz,

askorbat oksidaz; bakır kompleksleridir. Organik, fakat protein olmayan bir prostetik grup ihtiva eden enzimlere flavin nikleotidli enzimler, sitokromlar, katalaz ve peroksidaz, koenzim ihtiva eden enzimlere nikotinamid nükleotidli enzimler örnek olarak gösterilebilir.

Koenzimlerin yapısında çoğunlukla vitaminler bulunmaktadır. Bu bakımdan vitaminler, koenzimlerin yapısına girdiği için metabolik olayların enzimler tarafından kolaylıkla gerçekleştirilebilmesi için organizma açısından son derece gerekli bileşiklerdir.

Protein yapıları farklı, fakat katalizledikleri kimyasal reaksiyon aynı olan enzimlere “*izoenzim*” veya “*izozim*” adı verilmektedir. Örneğin pirüvik asidin laktik aside dönüşümünü katalizleyen laktik dehidrogenaz (LDH) enziminin 5 tane izoenzimi vardır.

Enzimin özgül olarak etki ettiği maddeye veya madde karışımına bu enzimin “*substratı*” denir. Reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise “*ürün*” adı verilir. Genel olarak reaksiyonu şu şekilde şematize edebiliriz. Enzimlerin katalizlemiş olduğu tepkimeler enzim substrat arasında bir enzim substrat (ES) kompleksi oluştururlar (1). Bağlanma aktif bölge olarak adlandırılan bir cepte meydana gelmektedir. Enzimler ve diğer katalizörlerin görevleri tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimenin hızını artırmaktır. Enzimler tepkime hızını  $10^5$ - $10^{17}$  kat artıran olağanüstü katalizörlerdir. Enzimatik hız artışında kullanılan enerji enzim substrat arasındaki zayıf etkileşimden kaynaklanmaktadır. Bazı enzimler metabolik yolları aktive ya da inaktive ederler. Feed back inhibisyonla bir reaksiyonun son ürünü reaksiyonun ilk enzimini inhibe eder (Nelson ve Cox, 2005).



Enzimlerin adlandırılması genel olarak katalize ettikleri reaksiyonun niteliğine göre yapılır. Çoğu zaman enzimin etki ettiği substrata “az” eki getirilerek isimlendirilir. Örneğin sükrozu parçalayan enzime “sükraz”, fosfor ekleyen enzime “fosforilaz” veya laktozun iki üniteye parçalanma reaksiyonunu katalize eden enzime “laktaz” denilir. Dekarboksilasyon reaksiyonu katalize eden enzime “dekarboksilaz” denir.

Enzimler etkili olduğu substratın sonuna “litik” eki getirilmek yoluyla da isimlendirilirler. Örneğin proteinleri parçalayan enzimlere “proteazlar” denildiği gibi “proteolitik enzimler” de denilir. Lipitleri veya lipoidleri parçalayan enzimler “lipolitik

enzimler” diye adlandırılırlar. Bu çeşit adlandırma daha çok geniş enzim sınıfları için kullanılırlar.

Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı özgül (spesifik) olmalarıdır. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Metabolizma reaksiyonları her ne kadar farklı enzimler tarafından kataliz edilirse de, bunlardan ancak çok az bir kısmı belirli bir substrat için spesifiktir. Bu sebeple enzim spesifitesi yani özgülüğü çok dar anlamda değil genel olarak düşünölmelidir.

Bazı enzimler sadece bir tek substrata etki edebilirler. Örneğin, üreaz sadece üreye, karbonik anhidraz karbonik aside ve fumaraz yalnız fumarik aside etki eder. Bazı enzimler ise stereo özgülük gösterirler. Bunlar substratlarının stereo izomerlerine etki etmezler. Örneğin arginaz sadece L-arginini hidroliz eder, D izomerine etki etmez. Enzimlerden bazıları belirli bir bağ ihtiva eden birçok maddelere etki ederler. Esterazlar birçok ester bağlarını parçaladıkları halde peptit bağlarını ihtiva eden proteinleri hidroliz edemezler.

Bazen enzimler bir grubu oluşturan substratlara etki ederler. Örneğin “hegzokinazlar” grup özgülüğü gösteren enzimler olup hegzozların fosforilasyonunu sağlarlar.

Proteolitik enzimlerin etki özgülüğünü tayin eden özellik, substrat molekülündeki aminoasitlerin özel konfigürasyonları ve diziliş tarzlarıdır. Örneğin pepsin ve tripsin proteinlerin bütün peptit bağlarına etki etmekle beraber, pepsin tercihli olarak bazı aminoasitlerin amino gruplarının teşkil ettiği peptit bağlarına, tripsin ise bazı aminoasitlerin karboksil gruplarının meydana getirdiği peptit bağlarına etki eder.

Bir hücre içinde yapıldıktan sonra görev yapacağı hücre dışı ortama salınan enzimlere “*Hücre içi enzimler*”, sentezlendikleri hücre içinde kalarak etkisini gösteren enzimlere “*Hücre dışı enzimler*” denilmektedir. Enzimler hücre içerisinde yapılırlar ve büyük çoğunluğu hücre içi amaçlar için kullanılır. Ancak sindirim sisteminde yer alan pepsin, kimotripsin, tripsin gibi enzimler sindirime yardımcı olmak için yapıldıkları hücre dışına salınırlar. Bazı enzimler de kan serumu içinde yer alarak hücre dışı faaliyetlerde bulunurlar. Hücrede yapıldıktan sonra dışarı salınan sindirim enzimleri, yapıldıkları hücreye zarar vermemeleri için “*proenzim*” (zimojen) denilen şekilde bulunurlar. Sonra aktif enzim haline dönüşürler.

Enzimler başlıca altı büyük sınıfa ayrılır:

### **1.2.1. Oksidoredüktazlar**

Oksidasyon-redüksiyon yani yükseltgenme-indirgenme (redoks) reaksiyonlarını katalize eden enzimler bu sınıftandırlar. Dehidrogenezlar, oksidazlar, redüktazlar, peroksidazlar geleneksel isimlerine sahip enzimler bu gurubun üyeleridirler.

### **1.2.2. Transferazlar**

Fonksiyonel bir grubun transfer reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Burada kastedilen hidrojen dışındaki gurup transferleridir.

### **1.2.3. Hidrolazlar**

Çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik reaksiyonları katalize eden enzimlerdir. Proteolitik enzimlerin tümü, lipazlar, esterazlar, fosfatazlar, nükleazlar bu grubun üyelerindendirler.

### **1.2.4. Liyazlar**

Bu enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağları hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasında bir çift bağ ilave ederler. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimler bu gurubun üyeleridir. Karbonik anhidraz bu gurubun üyelerindendir. Bu durum karbonat hidroliyaz adından da anlaşılmaktadır.

### **1.2.5. İzomerazlar**

Bir molekül içindeki geometrik, optik ve yapısal izomerizasyon değişikliklerini katalize ederler. Mutazlar, rasemazlar, epimerazlar bu sınıftandırlar.



### 1.2.6. Ligazlar (Sentetazlar)

C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler genellikle ATP' deki veya diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolize ederek iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler.

Her enzimin bir sistematik kod numarası bulunmaktadır. Bu numara E.C.(Enzyme Code )harflerinden sonra sıralanmış dört rakamdan oluşmaktadır. Bu dört rakamdan birincisi enzimin bağlı bulunduğu gurubu, ikinci ve üçüncü basamaklar, katalizlenen tepkimenin türünü göstermektedir. Son rakamda tarihsel olarak bulunuş sırasını ifade etmektedir.

### 1.3. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Enzimlerin doku ve hücrelerdeki konsantrasyonu son derece az olduğundan miktarlarını ölçmek çok güçtür. En iyi enzim aktivitesinin ölçülme yöntemi enzimin katalitik aktivitesinin ölçülmesidir. Dolayısıyla enzim miktarı, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak meydana gelen ürün miktarı ölçülerek saptanmaktadır. Biyolojik maddelerde görev alan birçok enzim “Enzim Ünitesi” birimi ile ifade edilir (Pamela C. Champe ,1987) . Buna göre 1 mikromol substratın, belirli ve özel şartlar altında (25°C) değişikliğe uğramasını katalize eden enzim miktarına “1 ünite enzim aktivitesi” denir.

Birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısına “*turnover sayısı*” denilmektedir. Karbonik anhidraz enzimi turnover sayısı en yüksek olan enzimlerdendir.  $600000\text{ s}^{-1}$  turnover sayısına sahiptir. Yani reaksiyonu  $1.7 \times 10^{-6}$  saniyede gerçekleştirebilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000). Turnover sayısı en fazla olan enzim,  $40.000.000\text{ s}^{-1}$  ile katalazdır.

Bir enzimin etkisini artıran maddelere bu enzimin aktivatörleri denir. Bunlar çok defa inorganik iyonlar bazen de organik gruplardır. Örneğin tükrükteki amilaz enzimini klorür aktive eder.

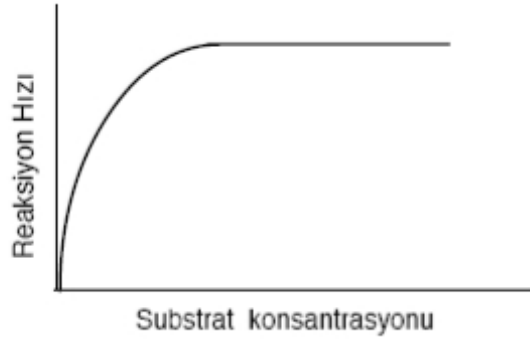
Enzimatik gerçekleşen reaksiyonların hızı üzerine, enzim ve substrat konsantrasyonlarının, sıcaklığın, ortamın pH' sın, zamanın, reaksiyon ürünlerinin, hormonların ve ışığın etkisi bulunmaktadır.

### 1.3.1. Enzim Aktivitesine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Enzimatik bir reaksiyonunun hızı, genel olarak enzimin konsantrasyonu ile orantılıdır. Enzim miktarı arttıkça reaksiyon hızı da paralel olarak artar.

### 1.3.2. Enzim Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artar, bundan sonra substrat konsantrasyonunun artması ile reaksiyon hızı değişmez (Şekil 1). Yani substratla doygunluğa ulaştıktan sonra reaksiyon hızı değişmez.

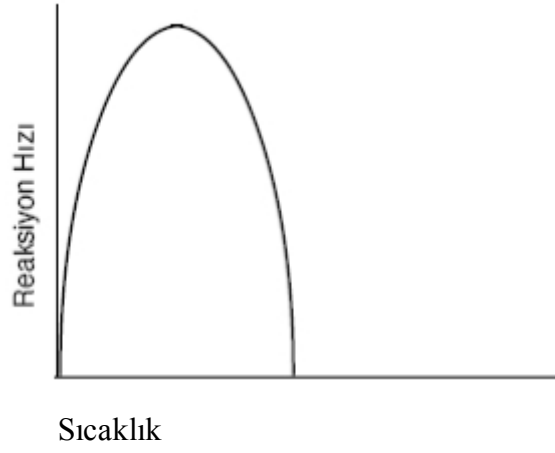


Şekil 1. Enzim aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi

### 1.3.3. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Enzimatik olarak gerçekleşen reaksiyonların hızı sıcaklık arttıkça genellikle artar, fakat belirli bir sıcaklığa ulaşıldıktan sonra enzimler denatüre olduklarından etkilerini kaybederler (Şekil 2).

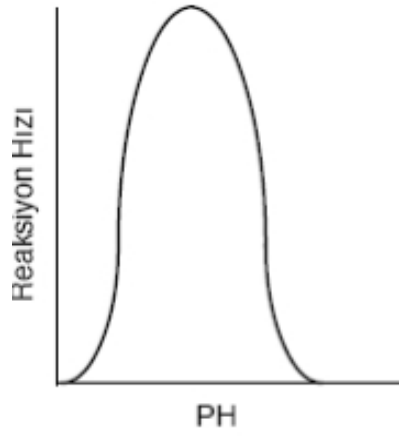
Sıcaklık in vivo aktivite düzenleme aracı değildir. Bunun nedeni canlı sistemlerde sıcaklığın sabit oluşudur (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).



Şekil 2. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

#### 1.3.4. Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi

Enzimler genellikle belirli bir pH 'da en yüksek aktiviteyi gösterirler. Bu pH' ya enzimin "Optimum pH'sı" denir (Şekil 3).



Şekil 3. Enzim aktivitesine pH'ın etkisi

#### 1.3.5. Enzim Aktivitesine Zamanın Etkisi

Enzim aktivasyonunda reaksiyon süresi ve oluşan ürünlerin de rolü vardır.

#### 1.4. Enzimlerin İnhibisyonu

Enzim-substrat kompleksini sağlayan bölge enzimin belirli bir bölgesini içermektedir. Çünkü enzimler büyük, buna karşılık substratlar küçük moleküllerdir. O halde enzimlerde substratın bağlandığı enzim tarafından değişikliğe uğratıldığı ve başka bir bileşiğe dönüştürüldüğü bir bölgeye ihtiyaç duyulmaktadır ki bu bölgeye “*aktif bölge*” adı verilmektedir. Aktif bölgede en az bir aminoasit özel bir rol oynamaktadır.

Enzim-substrat kompleksinin oluşmasını etkileyen, enzim aktivitesini azaltan maddelere “*Enzim İnhibitörleri*”, bu olaya ise “*Enzim İnhibisyonu*” denir.

Enzimler genel olarak 3 şekilde inhibisyona uğrar.

- Kompetitif inhibisyon
- Nonkompetitif inhibisyon
- Unkompetitif inhibisyon

Kimyasal olarak enzimin substratına çok benzeyen bir madde enzimin aktif merkezine bağlanarak enzimin kendi substratına bağlanmasını önlerse bu çeşit inhibisyona “*kompetitif inhibisyon*” denir. Örneğin süksinat dehidrogenaz enzimine substrat yerine malonik asidin bağlanması böyle bir inhibisyona neden olur. Enzimin inhibitör madde ile birleşmesi geriye dönüşümü olabilen bir reaksiyondur. İnhibitör maddenin etkisi bu inhibisyonda substrat konsantrasyonu artırılarak önlenabilir ( Albert L. ,1988).

“*Nonkompetitif inhibisyonda*”, inhibitör madde aktif merkezin dışında bir noktadan enzime bağlanarak enzimin, substratı ile reaksiyona girme hızını azaltır. Bunların bir kısmı geriye dönüşümlü, bir kısmı ise geriye dönüşümsüzdür (Gözükara, 1990) .

Eğer bir inhibitör serbest enzime değil de, enzim substrat kompleksine bağlanarak bir inhibisyona neden oluyorsa bu tip inhibisyona “*Unkompetitif inhibisyon*”denir.

#### 1.5. Enzimlerin Hastalıklarda Kullanılmaları

Enzimler bugün tıbbi tedaviden endüstriye kadar pek çok alanda kullanılmaktadır. Enzimlerden bazı hastalıkların tedavisinde yararlanıldığı gibi, enzimlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinden hastalıkların tanısında da yararlanılmaktadır. Böylece hastalığın gelişimi ve süreci hakkında fikir edinilebilir.

Enzimler hücre içinde sentez edilirler ve amaçları doğrultusunda kullanılırlar. Fakat bazı patolojik hallerde, hücreler arası sıvıda veya kan plazmasındaki enzim düzeyi artar. Bunun sebebi enzim sentezinin artmasının olabileceği gibi, hücre zarının geçirgenliğinin artması veya hücrenin parçalanması yani hücre nekrozu sonucunda da olabilir. Her iki halde de enzim molekülünün büyüklüğü önem taşımaktadır.

Hücre içi enzim miktarı ile plazma enzim miktarları arasında belirli enzimler yönünden çok büyük farklar vardır. Örneğin karaciğer hücresindeki laktik dehidrogenaz enzimi 10000 kat daha yoğun haldedir.

Nekroz ve doku harabiyeti halinde enzimler ekstraselüler sıvıya geçerler. Örneğin, kalp kası nekrozuna sebep olan kalp infarktüsünde kalp kası hücresi enzimlerinin düzeylerinin kanda çok artması gösterilebilir. Bu enzimlere örnek olarak “*serum glutamik oksalasetik transaminaz*”(SGOT), “*kreatin kinaz*” (CK) gösterilebilir. SGOT enziminin normal aktivitesi kanda 25-30 ünite iken enfarktüs halinde nekrozu olan dokunun büyüklüğüne göre artış gösterir. Hastalığın iyileşmesi enzim düzeylerinin belirli aralıklarla tespiti ile gözlenebilir. Benzer şekilde serum alanin-amino transferaz (SGPT); karaciğer harabiyeti, laktik-dehidrogenaz (LDH), kalp ve karaciğer bozuklukları belirlemede kullanılan önemli enzimlerdir. SGPT enzimi Enfeksiyöz Hepatititte, hücre harabiyeti sonucu normalin 10-50 katı artar. Pankreas iltihabında “Pankreas amilaz” enzimi yükselir. Kemik üretiminin arttığı kemik hastalıklarında serumda “Alkale fosfataz “ enzim düzeyi artar. Paget hastalığında bu artış normalin 20 katına kadar yükselebilir. Asit fosfataz enzimi en çok erkeklerin prostat bezinde bulunur. Prostat tümörlerinde bu enzim düzeyinde yükselme olur, böylece teşhis için belirleyici özellik gösterir. Enzimlerin izoenzimleri de teşhis yönünden önem taşımaktadırlar. Örneğin laktik dehidrogenaz enziminin izoenzimleri farklı dokularda yoğunlaştığından, bu enzimin belirli bir izoenzimindeki artış bu enzimin daha çok bulunduğu doku üzerine dikkati çekmektedir. Amino asitler başta olmak üzere karbonhidrat ve lipid metabolizmalarında yer alan bazı enzimlerin kalıtsal olarak eksikliği de bazı hastalıklara yol amaktadır. Örneğin amino asitlerin metabolizmalarındaki enzim defektleri zeka ve gelişim geriliği ile kendini gösterir. Özellikle midede sindirim bozukluklarında proenzim olarak pepsinojeni kapsayan preparatlardan veya ince bağırsakların üst kısmında yine sindirime yardımcı olmak amacıyla pankreas enzimlerini içeren preparatlardan yararlanılmaktadır. İyi kalitede hamur elde etmek için amilaz, proteaz ve fermentasyon enzimleri kullanılmaktadır. Böylece ekmeğin daha lezzetli ve kabarık bir hal alması sağlanmaktadır. Görüldüğü gibi enzimler

hücrede metabolizmanın düzenli yürümesini sağlamakta, tıpta teşhiste ve tedavide kullanılmakta, endüstride ve günlük hayatta çeşitli yerlerde kullanılmaktadırlar (Aras ve Erşen, 1988).

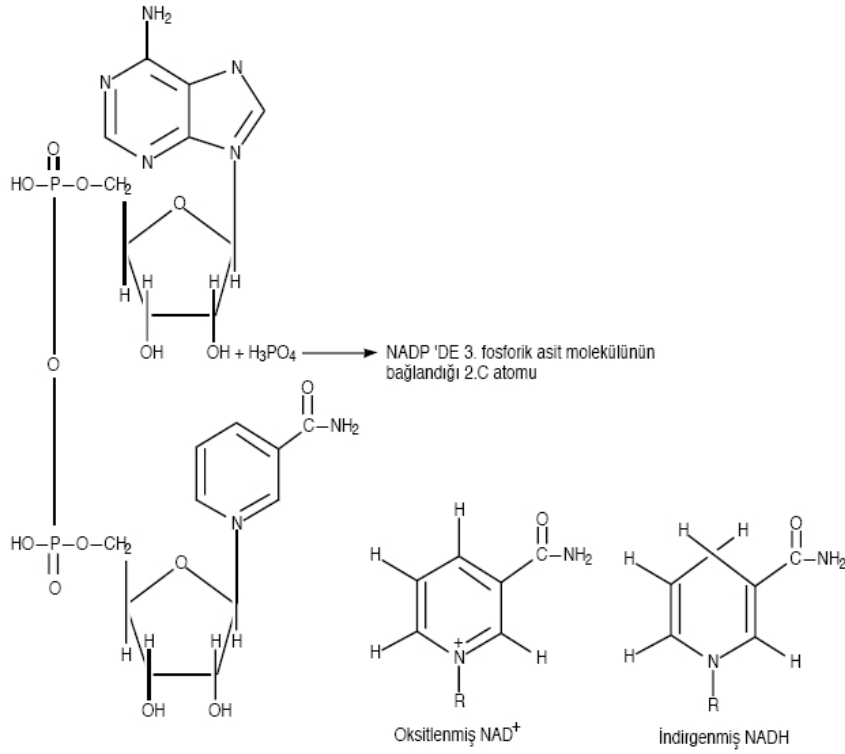
## 1.6. Bazı Koenzimler

Birçok vitamin özellikle B grubu vitaminleri veya bunların yapılarında yer aldığı organik bileşikler protein yapısında olan enzimlerin koenzimi, yani aktivatörü olarak görev yaparlar.

Koenzim olarak vitaminlerden yararlanan önemli koenzimler arasında nikotinamid (niyasin) adenin dinükleotid (NAD), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mono nükleotid (FMN), tiamin pirosofosfat (TPP) ve yapısında pantotetik asidin yer aldığı koenzim-A' yı sayabiliriz. Bunların dışında piridoksin, lipoik asit, biotin, folik asit ve B12 vitaminlerini kapsayan koenzimler de vardır. Koenzim Q ise  $\alpha$ -tokoferol aktivitesine benzer aktivite gösteren organik bir bileşiktir.

### 1.6.1. Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD)

Bu koenzim adından da anlaşılacağı gibi nikotinamid ve adenini kapsayan iki mol nükleotidin birleşmesi ile meydana gelmiştir (Şekil 4). NAD, birçok dehidrojenazın koenzimi olarak görev yapar. Nikotinamid içeren enzimler sitrik asit döngüsü dışında daha birçok yükseltgenme-indirgenme reaksiyonunu katalize ederler. İndirgenme ve yükseltgenme olayları koenzimin nikotinamid kısmı ile ilgilidir.



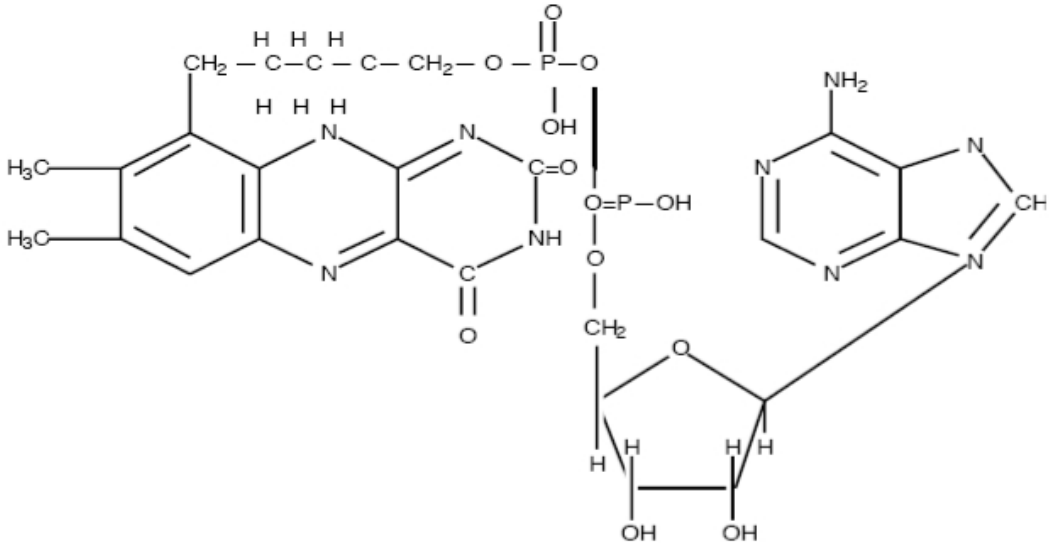
Şekil 4. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)

### 1.6.2. Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADP)

Bu koenzimde dehidrojenazlar sınıfına dahil olup, tıpkı NAD gibi görev yapar. Yapı olarak tek farkı bir fosforik asit molekülünün fazla olmasıdır. Birçok substratın katalizi için NAD yanında NADP'ye de gereksinim vardır. Özellikle indirgenmiş NADP (NADPH), pentoz fosfat yolu üzerinde meydana gelmekte ve yağ asitlerinin oluşumu sırasında gereksinim duyulan indirgenme reaksiyonları için kullanılmaktadır.

### 1.6.3. Flavin Adenin Dinükleotid (FAD)

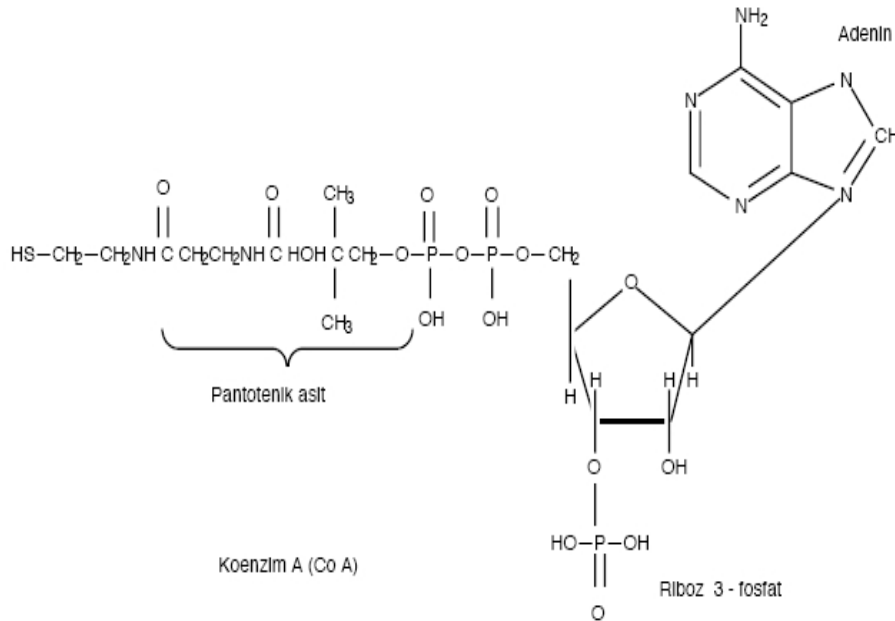
Flavin adenin dinükleotid, yapı yönünden nikotinamid adenin dinükleotide benzer, aradaki fark nikotinamid yerine flavin vardır (Şekil 5). Ayrıca flavine bağlı şeker bir riboz değil, ribozun alkolü olan ribitoldür. Dehidrojenazlı enzimlerin kofaktörü olarak sitrik asit siklusunda ve solunum zincirinde görev yapar (Aras ve Erşen, 1988).



Şekil 5. Flavin adenin dinükleotid (FAD)

#### 1.6.4. Koenzim-A (Co-A)

Yapısında adenin, riboz-3-fosfat, ayrıca iki mol fosforik asit, pantotenik asit ve b-merkaptetilamin molekülleri yer alır. Isıya dayanıklıdır. Koenzim-A sitrik asit siklusunda, kolesterolün yapımında, yağ asitlerinin sentezinde ve daha birçok biyokimyasal reaksiyon sırasında “açıl” grupları taşıyıcısı olarak görev yapar (Aras ve Erşen, 1988) .



Şekil 6. Koenzim-A (Co-A)



### 1.7. Karbonik Anhidraz Hakkında Bilgi

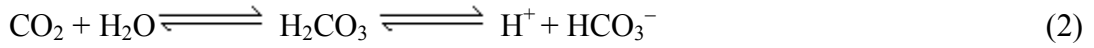
Tüm canlı türlerinde mevcut olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan enzim olan Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) canlı sistemlerde pH düzenleyici, su, elektrosit ve iyon transportunu düzenleyici olarak rol alan bir enzimdir. Fizyolojik olarak karbondioksidin hidrasyonunu ve bikarbonatın dehidratasyonunu dönüşümlü olarak katalizler. Keline ve Martin (1944) de enzimin aktivitesinin  $Zn^{+2}$  konsantrasyonuna bağımlı olduğunu ve aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  içerdiğini bulmuşlardır. Dolayısıyla CA ilk metaloenzim olarak anılmıştır. CA sığır eritrositlerinden izole edilmiş ve kinetiği incelenmiştir (Kernohan, 1964; DeVoe ve Kistiakowsky, 1961). Archaeon türü olan *Methlinsarcina thermophila*' dan (Alber ve Ferry, 1994), Bottcher vd. (1994) yengeç solungaçlarından , zebrafish den (Peterson, vd. 1997), yılan balığından (Anquilla anguilla) (Lionetto vd. 2000), Salmon türünden (*Oncorhynchus masou*) (Tohse ve Mugiya 2001), gökkuşuğu alabalığına (Söyüt ve Beydemir 2008) ve gökkuşuğu eritrositlerinden (Hisar vd. (2002) saflaştırıp kinetik çalışmalar yapmışlardır. Memeli dokularından 16 tane izoenzimi mevcut bulunmaktadır (Esbaugh ve Tufts, 2007) . Enzimin molekül ağırlığı 20-36 kDa arasında değişim göstermekte olup memeli dokularında tek alt birim halinde bulunur.

CAs, EC 4.2.1.1 karbonik anhidraz enzimi en az beş farklı evrimsel olarak birbirinden farklı gen ailesi tarafından kodlanan prokaryot ve okaryotlarda bulunabilen bir metalo enzim ailesi gurubundandır: ***α sınıfı*** CAs (bakteri, alg, yeşil bitkiler ve omurgalılarda bulunur), ***β sınıfı*** CAs (çoğunlukla bakterilerde, alglerde), ***γ sınıfı*** CAs ( bazı arklarda ve bakterilerde), ***δ sınıfı*** CAs marine diatomda (*thalassiosira weisflogii*) ve ***ε sınıfı*** CAs ise syanao bakteri ve özellikle bazı kemolitik bakterilerde görülmektedir. Karbonik anhidraz  $CO_2$ 'in geri dönüşümlü dehidrasyonunu katalizler. Şimdiye kadar pek çok memeliden karbonik anhidraz izoenzimleri izole edilmiştir.  $α$ ,  $β$  ve 1994'de de  $γ$  sınıfı olmak üzere 3 ayrı sınıf mevcuttur (Daha sonra  $ε$  alt sınıfı da izole edildi). Bu üç sınıfta herhangi bir önemli benzerlik görülmemiştir. Hepsinde bulunan yapısal farklılıklara rağmen üç sınıfta da kataliz için aktif bölgede tek bir çinko atomu bulundurulması ortaktır. Karbonik anhidraz bir çinko metalo enzim ailesinden olup tek peptid zincirinin aktif bölgede  $Zn^{+2}$  iyonu ile koordine olduğu bir yapıya sahiptir.

Vücutta metabolik olaylar sonucu istirahat halinde dakikada birkaç yüz mL  $CO_2$  üretilir; bu değer ağır bir egzersiz halinde 10 kat artabilir. Karbondioksit vücut sıvılarının asid-baz dengesini sağlamada önemli görevi vardır ve vücut sıvılarında konsantrasyonu

çeşitli homeostaz mekanizmaları ile sabit tutulur. Bunun için dokularda oluşan CO<sub>2</sub>'in, oluşma hızı ile orantılı olarak akciğerlerden atılması gerekir. Dokulardan kana geçen karbondioksit kısmen plazma içine ve kısmen de eritrositlere difüze olarak onların içinde taşınırlar.

a) Plazmada su ile birleşerek bikarbonat iyonuna dönüştürülür ve molekül başına bir H<sup>+</sup> salıverilir (2).



b) Plazma proteinlerine karbamino grupları oluşturmak suretiyle bağlanır.

c) Eritrositlerde karbonik anhidraz enziminin katalitik etkisi altında, böbrek tübüllerinde olduğu şekilde su ile birleşerek H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> oluşturur. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, plazmadaki Cl<sup>-</sup> ile değiş tokuş edilerek oradaki bikarbonat stokuna katılır (klorür–kayması).

d) Böylece eritrositler içinde oluşan H<sup>+</sup>, dokudan geçerken indirgenmiş (oksijenini kaybetmiş) olan Hb ile birleşir ve meydana gelen HHb, CO<sub>2</sub>'i karbamino bileşiği şeklinde bağlar. Alveollerden atılan CO<sub>2</sub>'in % 20–25'i bu şekilde taşınan fraksiyondur.

e) CO<sub>2</sub>'in az bir kısmı plazma veya eritrositlerin suyunda çözünür. Kan alveollerden geçerken, bikarbonat haline geçmemiş bağlı veya çözünmüş (serbest) CO<sub>2</sub> fraksiyonu kısmen alveol havası içine boşaltılır (Kayaalp, 2002).

Yapılan çalışmaların birinin sonucunda daha önce bilinenden daha fazla oranda karbonik anhidraz enziminin prokaryotlarda yaygın olduğu görülmüştür. Bu sonuç tatlı suda, tuzlu suda, mezofilik, termofilik, aerobik, anaerobik, patojenik, simbiyotik, gibi çeşitli türlerden elde edilmiş verilerdir. Prokaryotlardaki karbonik anhidrazlar ayrıca medikal olarak da önem taşımaktadırlar. Sonuçlara göre karbonik anhidraz patojen türlere karşı mikrobiyal tehlikede önerilmektedir. Elde edilen verilerde bunu desteklemektedir. Enzim tarafından kodlandığı varsayılan genin ekspresyonuyla infeksiyon azaltılmaktadır (Smith ve diğerleri, 1999).

Yapılan bir başka bir çalışmada normal glukoz ve yüksek glukoz seviyelerinde CA esteraz aktivitesi ölçülmeye çalışılmıştır. 40 tane normal düzeyde 62-109 mg/dL ve 40 tanede serum glukoz seviyesi 114-518 mg/dL olan kişilerle çalışma yapılmıştır. Esteraz aktivitesi Armstrong ve diğerleri tarafından tanımlanmış p- nitro fenil asetat substrat olarak kullanılarak yapılmıştır. Net olarak esteraz aktivitesi ölçümü için bu ölçümler 0,1 M asetazolamid varlığında tekrarlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda net esteraz aktivitesi

ile total esteraz aktivitesi arasında iki serum gurubuna bakıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. Bu durumunda in vitro karbonik anhidraz esteraz aktivitesini işaret ettiği ifade edilmektedir. Yüksek glukoz seviyesiyle normal glukoz seviyeleri karşılaştırıldığında, net esteraz aktivite düzeyleri arasında bir anlamlılık olmamasına rağmen total esteraz aktivitesi düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuç total esteraz aktivite düzeylerinin patolojik şartlar altında bulunduğunu ve in vitro karbonik anhidraz aktivitesinin dikkate alınmaması gerektiğini ve in vivo sonuçların hatalı olduğunu desteklemektedir (Polat ve Nalbantoğlu, 2002). Bu veriler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Esteraz aktivitesi düzeyleri

| Serum glukoz seviyesi (mg/mL) | Total esteraz aktivitesi (u/min/mL serum) | Net esteraz aktivitesi (u/min/mL serum) | Karbonik anhidraz esteraz aktivitesi (u/min/mL serum) | %    |
|-------------------------------|---|---|---|------|
| 95.22±8.87                    | 20.2±1.9                                  | 18.1±1.8                                | 2.1±0.7   | 10.4 |
| 208.58±87.90                  | 21.3±2.8                                  | 17.9±2.9                                | 3.4±1.2   | 16.0 |

Karbonik anhidraz temel olarak solunum sırasında oluşan CO<sub>2</sub>' in suda çözünmesini, taşınmasını ve vücuttan atılmasını sağlamanın yanı sıra, asit baz dengesini, iyon değişimini, kardiyovasküler sistemin düzenlenmesini sağlama gibi pek çok fizyolojik olayda da rol alan çok önemli bir enzimdir. İlk olarak insan eritrositlerinden izole edilen enzim pek çok canlı organizmada ve dokuda çalışılmıştır.

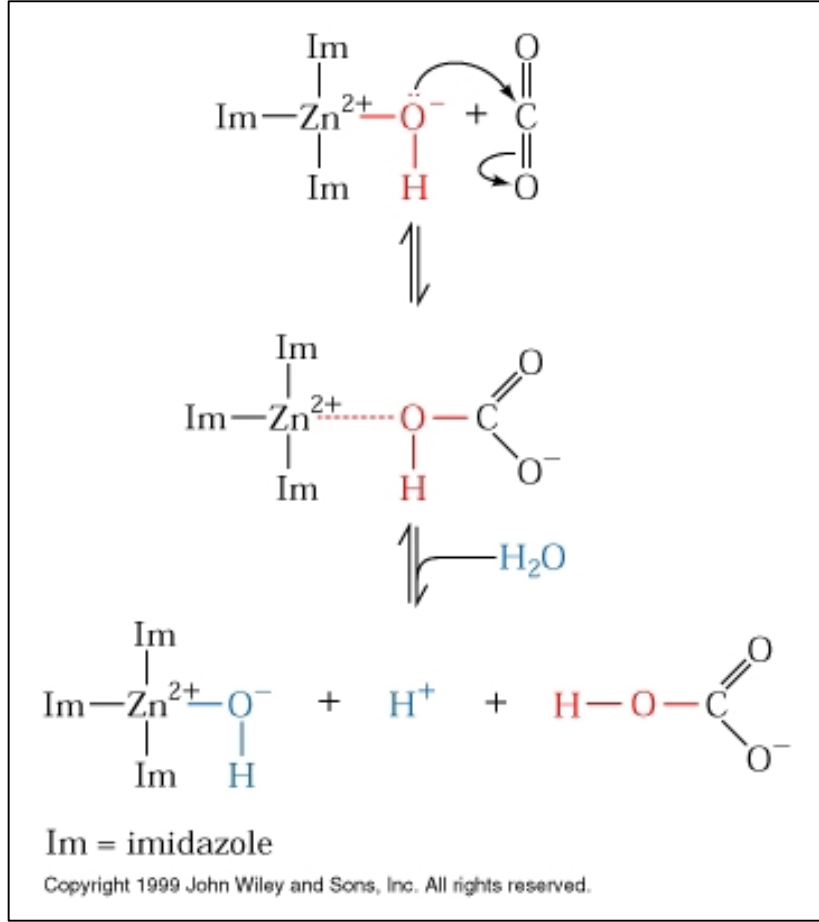
Memelilerde solunumda, karbondioksit ve bikarbonatın taşınmasında; akciğerlerde ve dokularda pH ve CO<sub>2</sub> dengesinde, doku ve organlara çeşitli salgıların salınımında, özellikle de CAs memelilerde lipogenez, glukogenez, üregenez, gibi biyosentetik metabolik olaylarda önemli rol oynamaktadır. Bitkilerde, alglerde, prokaryotlarda ise CAs CO<sub>2</sub> fiksasyonunda gereklidir (Innocenti ve diğerleri).

Canlılarda çok yaygın olarak bulunan CA enzimin bulunduğu ortamın şartlarına ve ihtiyacına göre değişik izoenzimleri mevcuttur. Her geçen gün yeni bir izoenzimi ortaya çıkartılmakta olup bugün itibariyle 16 tane izoenzimi bulunmaktadır. Üzerinde en çok çalışma yapılan ve en yaygın olarak bulunan izoenzimleri ise CA I ve CAII' dir.

Son beş yıldır tanımlanan karbonik anhidrazların fizyolojik ve biyokimyasal olarak önemli derecede arttığını söylemek mümkündür.  $\beta$  ve  $\gamma$  sınıfı enzimleri özellikle proton transferiyle açıklanan mekanizmaları içerirler. Son yıllarda izole edilen 4  $\beta$  sınıfı enzim bu sınıfa ait enzim mekanizmalarını anlamada önemli ölçüde fayda sağlamıştır. Hem  $\beta$  hem

de  $\gamma$  sınıfı saflaştırılan enzimlerle bu sınıfa ait bilgiler genişlemeye devam etmektedir. Bu raporda T.weissfloggi' den 4. sınıf bir karbonik anhidrazın tanımlanabileceği ve bunun da karbonik anhidrazın yüzeyindeki farklılıklardan faydalanılarak olabileceği öneriliyor (Tripp ve diğerleri, 2001). Daha sonraki yıllarda bu öneri gerçekleşiyor.

İzoenzimlerin hepsinde ortak olan nokta aktif bölgelerinde bir çinko  $Zn^{+2}$  iyonu bulundurmalarıdır. Bunlardan hayvan ve bitki kökenli olanlar sırasıyla  $\alpha$  ve  $\beta$  sınıfı içerisinde gruplandırılmışlardır.  $\alpha$ -sınıfındaki izoenzimleri doğada oldukça yaygın olup monomerik yapıdadır. Çok az sayıda prokaryotik  $\alpha$ -sınıfı karbonik anhidraz tespit edilmiştir.  $\alpha$ -Sınıfı karbonik anhidrazların katalitik mekanizmasında aktif bölgeden protonun dış çözücü ortamına aktarılmasında His-64 birimi aracı rol oynamaktadır. Proton His-64'e onunla çinko atomu arasındaki su molekülleri aracılığıyla aktarılır. Yapılan çalışmalar Lys-91 ve Tyr-131 birimlerinin de proton transfer mekanizmasında rol aldığını göstermektedir.  $\beta$ -sınıfındakiler dimerler, tetramerler, heksamerler ve oktamerler halindedirler. Önceleri sadece bitkilerde bulunduğu sanılan  $\beta$  sınıfındaki izoenzimler sonraları alg, bakteri ve arkeon türlerinde de tespit edilmiştir. Bu sınıftaki izoenzimlerde aktif bölgedeki  $Zn^{+2}$  iyonu iki sistein ve bir histidin ligandlarıyla bağlanmaktadır. Dizi analizleri bu sınıftaki izoenzimlerde yalnızca beş amino asit biriminin ve aktif bölgede üç çinko ligandının, bir aspartat ve bir de arginin biriminin korunmuş olduğunu göstermektedir. Üçüncü sınıf olan  $\gamma$  enzimleri trimer yapıda olup bu sınıfın yapısı aydınlatılmış tek üyesi 1994'te archaeon Methanosarcina thermophila'dan izole edilmiştir. İzole edilen bu izoenzimin çinko yerine kobalt kullanıldığında daha yüksek hidrataz aktivitesi gösterdiği ve p-nitrofenil asetatla esteraz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Metal bağlanma bölgesinde  $\alpha$ -sınıfındaki gibi üç histidin birimi ligand oluşturmaktadır, ancak bunların ikisi bir monomere, bir tanesi ise bitişikteki diğer monomere aittir. Son zamanlarda yeni bir sınıf CA izoenzimi ( $\delta$ -sınıfı) Thalassiosira weissflogii'den izole edilmiştir.



Şekil 7. Karbonik anhidraz enziminin CO<sub>2</sub> hidrasyon kataliz mekanizması

Karbonik anhidrazın katalizlediği temel enzimatik olay karbondioksitin (CO<sub>2</sub>) hidrasyonudur (Şekil 7).

Kinetik çalışmalar bütün karbonik anhidraz izoenzimlerinde iki basamaklı bir mekanizmanın olduğunu göstermiştir. İlk basamakta (3) çinkoya bağlı hidroksit iyonunun CO<sub>2</sub>'e nükleofilik saldırısı gerçekleşmektedir. İkinci basamakta (4) ise çinkoya bağlı su molekülünün iyonlaşması ve protonun uzaklaştırılmasıyla aktif bölgenin tekrar oluşturulması olayları gerçekleşmektedir.



Bu mekanizmada (5) safhasının gerçekleşmesinde, protonun dış çözücü ortamına aktarılması için enzimin aktif bölgesindeki bir amino asit birimi proton taşıyıcı birim (PTB) olarak rol oynamaktadır. PTB aldığı protonu ortamdaki tampon (B) moleküllerine aktarmaktadır (Reaksiyon 5 ve 6).



Karbonik anhidraz II' nin katalizlediği enzimatik mekanizmada hız belirleyici basamak protonun aktif bölgeden uzaklaştırılması safhasıdır. Bu nedenle aktif bölgedeki proton taşıma kapasitesine sahip amino asit birimleri aktivitede önemlidirler. Aktivitede çinkonun dördüncü ligand pozisyonuna yakın bölgede bir hidrojen bağı alıcısının olması da ayrıca önem taşımaktadır (URL-1, 2009).

Enzim, hidrataz aktivitesi yanında esteraz aktivitesine de sahiptir, ancak fizyolojik açıdan hidrataz aktivitesi önemlidir. Bu sayede organizmanın asit – baz dengesinin düzenlenmesinde önemli rol üstlenir. Bu dengenin bozulduğu durumlarda, örneğin göz içi tansiyonunda, karbonik anhidraz enzim aktivitesine müdahale sıklıkla uygulanan bir tedavi yöntemidir. Bu açıdan karbonik anhidraz inhibitörleri klinik olarak önemli bileşiklerdir (Puscas vd., 2000).

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin biyolojik numunelerden izole edilmesinde, saflaştırılmasında ve karakterizasyonunda birçok kromatografik ve elektroforetik yöntem uygulanmıştır. Karbonik anhidrazın farklı izoformlarının farklı canlılardan ve dokulardan kromatografik ayrılmasında, uygulanan yöntemlerde farklılık arz etmektedir.

### 1.7.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Karbonik anhidraz enziminin farklı izoenzimleri memelilerde oldukça yoğun olarak çalışılmaktadır. Fakat hala omurgalılarla ilgili yapılan çalışmaların çok erken aşamalarında olduğu düşünülmektedir (Tufts, vd. 2003). İnsanda 15 tane  $\alpha$ -CA izoenzimi olduğu tespit edilmiş, bunun 12 tanesinin katalitik olarak aktif olduğu bildirilmiştir. Üzerinde en fazla çalışma yapılmış olan izoenzimler sitoplazmik karbonik anhidraz I ve karbonik anhidraz II' dir. Bu iki izoenzimin en kolay elde edilebilir kaynağı ise eritrositlerdir. CA III iskelet

dokusunda en çok bulunan protein olarak, CA IV membrana bağlı olarak insan böbrek ve akciğerlerinde basolateral membran ve tübüler mikrozomlarda, CA V bazı dokuların mitokondrisinde, CAVI salgı sıvılarında (idrarda, süt), CAVII sitozolik olarak bulunan izoenzimlerdir (Beydemir ve diğerleri, 2000).

Sitoplazmik CAI, CAII, CAIII, CAVII ve CAXIII; plazma membranına bağlı olarak CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV ve CAXV; mitokondride CA, VA ve VB; salgıda CA VI; tümör hücrelerinde CA IX ve CAXII bulunur.

Metaloenzim karbonik anhidrazın izoenzimi CA IX- hipokside yüksek düzeyde ifade edilen genlerden birisidir. CA IX özellikle hipoksik tümör dokularında bulunup gastrointestinal yoldaki düşük düzeydeki ekspresyonu haricinde birçok normal dokuda bulunmayan yüksek aktiviteli ve tümörle ilişkili bir membran enzimidir. CA IX'un yeni antikanser tedavileri için ilaçlara hedef oluşturabileceği ve bir tümör ilerleme belirteci olduğu gösterilmiştir. Floresan ve membran geçirgenliğini etkileyen sülfanamidler gibi özgül inhibitörler kullanılarak bu tümörle ilişkili membran enzim aktivitesinin engellenmesinin tümör pH'sını değiştirip asiditeyi azalttığı ve normal pH değerlerine doğru 0.5-0.7 pH ünitesi kadar yaklaştırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, CA IX antikanser ilaç geliştirilmesi ve daha seçici ve etkin CA IX inhibitörlerinin kullanılmasıyla hipoksik kanserlerde pH dengesizliğinin kontrol edilmesinin ve genellikle klasik kemo ve radyo terapiye cevap vermeyen bu tümörlerin tanı ve tedavisinin yapılabileceği öngörülmektedir (Özensoy ve Supuran,2007).

### 1.7.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri göz içi basıncı düşürmede kullanılan en güçlü ajanlardan biridir. Fakat kullanımları genelde pek çok istenmeyen yan etkiyle birlikte seyreder. Bazıları, ilaçların çok büyük bir çoğunluğunda CA' nın inhibisyonunda uygulanır. Yapılan bu çalışmanın amacı tatlı sularda yaşayan *Oncorhynchus* ve *Cyprinus carpio carpio* balıklarından elde edilen, balıklarda osmoregülasyon, asit baz dengesi ve tuzlulukta anahtar rol oynayan, kandaki CA enzimi üzerine bazı pestisitlerin in vitro etkisinin diğer CA inhibitörleriyle karşılaştırılmasıdır. CA aktivitesi büyük oranda pestisitler ve inhibitörler tarafından inhibe edilirler. *Oncorhynchus mykiss*'in inhibe edilen IC<sub>50</sub> değerleri lambda-cyhalothrin, deltametrin, diozinon, dorzolamid ve brinzolamid için  $6.05 \times 10^{-4}$ ,  $1.48 \times 10^{-5}$ ,  $6.84 \times 10^{-3}$ ,  $3.82 \times 10^{-5}$  ve  $1.80 \times 10^{-6}$  mol/l'dir. C. c. *Carpio* için

ise  $6.86 \times 10^{-4}$ ,  $4.70 \times 10^{-4}$ ,  $3.92 \times 10^{-3}$ ,  $8.34 \times 10^{-}$ ,  $1.42 \times 10^{-6}$  mol/l'dir. Bu çalışmada kullanılan pestisitlerin CA aktivitesini inhibe etmeleri farklı balık türlerinde farklı derecelerde olmaktadır. CA enzimi üzerine en etkili inhibitörün pestisitler arasında detrametrin olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalar in vivo ortamda suda yaşayan organizmalar üzerine pestisitlerin toksik etkilerinin anlaşılmasını invitro olarak ışık tutmuştur (Doğan,2005).

Asetazolamid, methazolamid ve sulfonamid türevleri kırk yıldır glukomada (göz tansiyonu) intraselüler basıncın düşürülmesinde kullanılmaktadır. Asetazolamid, methazolamid, sulfanilamid, diklorofenamid, dorzalamid gibi inhibitörler bikarbonat konsantrasyonunu azaltırlar, suyun ve  $\text{Na}^+$  iyonunun posteriur kısmına akışı olur ve bu da sulu ortamın azalmasına, intraoküler basıncın azalmasına neden olur. Asetazolamid gibi inhibitörler  $\text{CA}'$  yı bloke ederek  $\text{Na}^+$  ve  $\text{H}^+$  değişim kapasitesini azaltırlar ve hafif diüretik etki ederek göz tansiyonunun azalmasına yardımcı olurlar. Bikarbonat lümen içinde kalır ve idrar pH' sı belirgin olarak artar. Asetazolamid sadece glokomda değil aynı zamanda epilepsi, yükseklik hastalığı, metabolik alkalozda de kullanılmaktadır (Kaur vd., 2002).

Bu inhibitör maddelerinin ortak özelliği aromatik halkalarına bağlı bir serbest sulfonamid ( $-\text{SO}_2 \text{NH}_2$ ) grubudur ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyonuna neden olurlar. Glukomada CA II inhibitörü olarak kullanılan ilaçların istenmeyen yan etkileri daha etkili sulfanamid türevlerinin sentezine zorlamıştır (Becker, 1954).

Mitokondrial CA VA ve CA VB' nin inhibitörleri antiobezite ajanı olarak da kullanılmaktadır. CA IX ve CAXII inhibitörleri kanser tedavisinde kullanılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada daha öncesinde yapılmamış olan insan eritrosit plazmasında karbonik anhidrazın olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmada insan eritrosit membranında CAIV' ün bulunup bulunmadığı tespit edilmiştir. Daha önceden yapılan çalışmalarda sadece karaciğerde ve akciğer hücre membranlarında bulunduğu rapor edilmişti. Bu nedenle membran bağlı CAIV insan eritrosit membranından saflaştırılarak karakterize edilmiştir (Demir vd.,2000).

Sülfonamide ek olarak anyonlar ikinci sınıf çinko bağlı karbonik anhidraz inhibitörleri klinikte ilaç olarak kullanılırlar. Yapılan çalışmada çinko ve kobalt bağlı  $\gamma$  sınıfı enzimi olan metanosarkina termofiladan (cam) izole edilen karbonik anhidraz ile anyonlar hakkında ilk inhibisyon çalışması rapor edilmiştir.  $\alpha$  sınıfı sitozolik hCA I ve hCA II izozimleri gibi membran bağlı hCA IV' de de halide, psödöhalide, bikarbonat, karbonat, nitrat, nitrit, hidrosülfid, bisülfid ve sülfat vb gibi pek çok sayıda anyonik türde



inhibisyon için karşılaştırma sağlayan bilgiler mevcuttur. En iyi Zn-Cam anyonik inhibitörleri hidrojen sülfid ve siyanat olarak tespit edilmiştir. En iyi Co-cam inhibitörü ise karbonat olarak tespit edilmiştir. Bu farklılığın temel nedeni olarak metal iyonlarının aktif kısımlarında farklı geometride yerleşmesiyle açıklanmıştır. Çalışmada asetazolamidin intraselüler karbonik anhidraza ulaştığında in vivo ortamda intraselüler karbonik asidozu azaltacağı beklenebilir. Veriler karbonik asidin beyindeki dekarboksilasyonda birincil ürün olduğunu ve kan dolaşımında metabolik olarak üretilen  $H^+$ ,  $(HCO_3)^-$  ve karbonik anhidrazın  $CO_2$  ile yer değişimini beyin özelliği sayesinde gerçekleştirdiğini göstermiştir (Severinghaus vd.,1969).

Metalokarbonik anhidrazlar aynı bağ sırasında Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II) metal iyonlarını içerirler. Bu seride sadece Zn(II) ve Co(II) metallerini içeren karbonik anhidrazlar  $CO_2$  hidrasyonunu katalizler ve p-nitro fenil asetatı hidroliz ederler. Bunun gibi sadece Zn(II) ve Co(II) metal iyonları ve aktif bölgede 3H-asetazol amid bağını teşvik eder. Asetat, azid, siyanat, sülfid, ve siyanit aktif bölge için 3H-asetazol amid ile yarış halinde bulunurlar. Bir ekvalent sülfid ve siyanitin Zn(II) ve Co(II) enzimlerine bağlanmasına,  $H_2S$  ve  $HCN$ ' nin pH değerleri pKa değerlerinin altında olduğunda  $H^+$  iyonları salınımı eşlik eder. pH aralığının üstünde  $CN^-$  ve  $HS^-$  formunda inhibitörlerde bağlanma  $OH^-$  iyonu varlığında gerçekleşir. Deneysel verilerde protein bağlı tek bir  $H^+$  nin ayrılmasına pKa 8,1' de tanımlanan metal iyonu eşlik eder (Coleman, 1967).

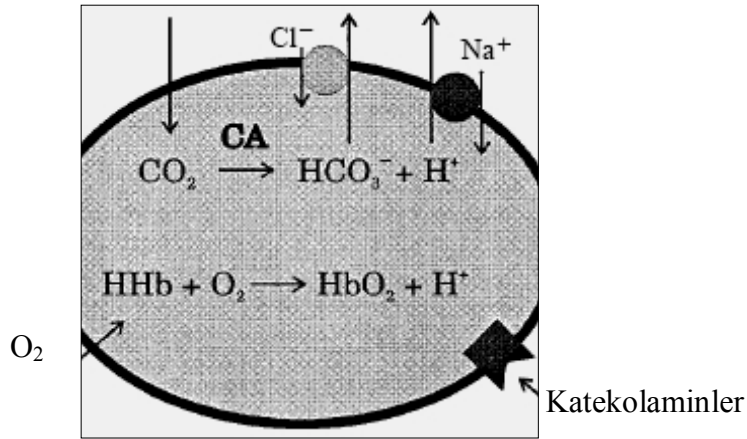
Değişik tür mersin balıklarında çeşitli enzim çalışmaları literatürde bulunmaktadır. Perdu-Durand, ve Cravedi 1989' da çeşitli ksenobiotik enzimleri, Sarosiek vd. 2004' de Rus mersin balığında arilsulfatazları, yine Sarosiek, vd. 2006' da asit fosfatazları, Trenzado vd. 2006' da çeşitli antioksidan enzimleri çalışmışlardır. Ancak literatürde herhangi mersin balığı türünden karbonik anhidraz enzim izolasyonu ve karakterizasyonu üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Balıklarda yapılan CA çalışmalarında daha çok pestisit ve diğer kirletici unsurların CA inhibisyonu üzerine etkisi incelenmiştir.

### 1.7.3. Balıklarda Karbonik Anhidrazın Fonksiyonu

Asit döngüsünde hız sınırlayıcı basamak plazmada bikarbonatın dehidratasyonudur. Katekolaminler bir adrenerjik reseptör yoluyla, plazma pH' sından kırmızı hücre pH' sını ayırarak  $Na^+/H^+$  pompasını aktive ederler. Katekolaminler hipoksi durumunda olduğu gibi kanın içine girerler ve eritrosit membranının karşısında  $Na^+/H^+$  pompasını aktive ederler.

Balık eritrositlerinde asit Jacob-Stewart çevrimi yoluyla plazmadan eritrositlere transfer edilmektedir. Bu döngü karbondiosit ve bikarbonatın dönüşümüyle olmaktadır (Lessard ve diğerleri, 1994).

Karbonik anhidraz enzimi memelilerdekine göre balıklarda bazı farklılıklar göstermektedir. Memelilerdekinin aksine teleostların kan plazmasında ve solungaç epitelinin iç yüzeyinde CA aktivitesi yoktur. Dolayısıyla  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonları katalizsiz olarak gerçekleşir (Perry vd. 1996, Acierno vd. 1997). Hipoksi durumunda katekolaminler kana salıverilir ve bu durumda  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pompasını aktive ederek, kırmızı kan hücrelerinin pH' sının artmasına yol açar. Memeli hücrelerindeki gibi balık eritrositlerinde plazmadan kırmızı kan hücrelerine yavaşça asit transferi Jacob-Stewart yolu üzerinden olur (Şekil 7).



Şekil 8. Kırmızı kan hücresinde Jacob-Stewart çevrimi

Plazmada CA' nın eksikliği katekolaminlerin eritrosit pH' sını düzenlemesine neden olur. Balık plazması tamamen CA' dan yoksundur ve solungaçların bazal membranında bulunmaz. Memeli plazması akciğer endotelyumunda CA aktivitesine sahip ve fakat katekolminler tarafından eritrositlerde pH düzenlemesi yoktur. Lessard vd., 1989' da, katekolaminlerin alabalık kırmızı kan hücresi 0.5 mg/mL karbonik anhidraz varlığında bile pH' sını in vitro olarak artırdığını bulmuşlardır.

CA aktivitesinin eksikliği kaslardan kana gecen serbest protonların plazma bikarbonatını titre etme hızını azaltır ve oluşan bu asidin eritrosit hücresine transferi çok yavaş olduğundan oluşan asidik ortamdan eritrositler korunur. Plazmadaki CA aktivitesinin

eksikliği solungaç epitelindeki CO<sub>2</sub> atılımını da yavaşlattığından, kan pH' sının dengelenmesini kolaylaştırır. Aşırı egzersiz ve hipoksi durumunda ise kana çok yüksek oranda asit salınımı gerçekleştiğinden, düşen kan pH' sı ile birlikte Hb' in oksijen bağlama kapasitesi azalmaktadır. Balık organlarının 2/3 kas oluşturur. Bu kaslarda etkin şekilde glikolitik yol aktiftir ve büyük miktarda kana asit bırakırlar. Plazmada CA bulunmuş olsaydı karbonik asit hızlıca kırmızı kan hücrelerine transfer olur ve oda bikarbonik aside dönüşerek ve CO<sub>2</sub> çıkışı olurdu. Her iki yol da CA aktivitesi yokluğunda çok yavaş oluşmaktadır

Tatlı su balıklarının solungaç epitelinin apikal bölgesinde CA proton ATPaz ile birlikte bulunur. CA ATPaz' a proton temin etmektedir. CA solungaçların bazal bölgesinde bulunmadığından plazma solungaçlar içinden geçerken CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> reaksiyonları CA yokluğundan dolayı katalizlenemez ve kanın solungaçlardan geçmesi esnasında eritrositlerde katalizlenmektedir (Randall ve Bruauner, 1998).

### 1.8. Mersin Balığı

Mersin balıkları kuzey yarım kürede ılıman deniz ve göllerin 150 m' ye kadar olan sahillerinde ve bunlara bağlı nehirlerde yaşayan ekonomik öneme sahip balıklardır.



Şekil 9. Mersin balıklarından birinin (*Acipenser gueldenstaedti*) görünümü

Coğrafik dağılımı türlerine göre farklılık gösteren mersin balıklarının 26 türü olduğu belirtilmekte ve Türkiye sularında bu familyanın dört türünün halen yaşamakta olduğu bilinmektedir. Deneyleerde kullanılan mersin balığı Şekil 8’de görülmektedir.

Mersin balıkları göçmen balıklar grubundan olup, çok geniş çevre şartlarına kolayca uyum sağladıklarından, deniz, göl ve ırmaklara kadar çok değişik su koşullarına girebilmekte ve adapte olabilmektedirler. Büyük çoğunluğu denize göç etmesine rağmen denizlere gitmeyen nehir ve göllerde yaşayan “tatlı su mersini” olarak bilinen türleri de mevcuttur.

Büyüme devrelerini derin sularda geçiren mersin balıklarının üremeleri nehirlerde gerçekleşir. Ergin bireylerin denizden tatlı suya üreme göçü, buldukları ortamın sıcaklığına bağlı olarak değişmekle beraber, genellikle ilkbaharda suların ısınmasıyla birlikte başlar. Yumurtalarını nehirlerin bol oksijenli, çakıllı sularına bıraktıktan sonra tekrar denizlerin derin sularına dönmesiyle göç tamamlanır. 15-20 kadar değişik türü bulunan mersin balığı 4-5 metre kadar uzunluğa ve 1-1.5 ton ağırlığa kadar varan türleri içeren tatlı su balık türüdür. En büyük tatlı su balıklarındandır. Aslında tuzlu suda yaşarlar ve çoğu türleri sadece yumurtlamak için tatlı suya gelirler. Hem tatlı hem de tuzlu suda yaşayabilirler. Çok geç ergenlik çağına girerler ve ancak 20 yaşında olunca ilk kez yumurtlarlar (URL-2, 2009).

### **1.9. Pestisitler**

Pestisit, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak, ya da zararlarını azaltmak için kullanılan madde ya da maddelerden oluşan karışımlardır. Pestisit, kimyasal bir madde, virüs ya da bakteri gibi biyolojik bir ajan, antimikrobik, dezenfektan ya da herhangi bir araç olabilir. Zararlı organizmalar, insanların besin kaynaklarına, mal varlıklarına zarar veren, hastalık yayan böcekler, bitki patojenleri, yabancı otlar, yumuşakçalar, kuşlar, memeliler, balıklar, solucanlar, ve mikroplar olabilir. Her ne kadar pestisitlerin kullanılmasının bazı yararları olsa da insanlar ve diğer hayvanlar için potansiyel toksisiteleeri nedeniyle bazı sorunlarda yaratabilir. Kimyasal veya biyolojik pestisitler olarak ikiye ayrılırlar (URL-3, 2009).

- İnsektisit : Böcek, haşerelere karşı kullanılan ilaçlardır.
- Fungusit : Funguslara (Mantar) karşı kullanılan ilaçlardır.

- Herbisit : Yabancı otlara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Mollusit : Yumuşakçalara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Rodentisit : Kemirgenlere karşı kullanılan ilaçlardır.
- Nematisit : Yuvarlak solucanlara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Akarisit : Akarlara karşı kullanılan ilaçlardır.

Kimyasal pestisitlerin canlı organizma üzerinde akut toksik etkileri vardır. Karbamatlar, organofosfatlar ve klorlanmış hidrokarbonları içeren birçok pestisit genetik etkiye sahiptir. Tarım ile uğraşan ve pestisite maruz kalan insanlarda yapılan çalışmalarda bu bireylerde yapısal ve sayısal kromozom anomalileri ile kardeş kromatit değişiminde artmalar gözlenmiştir.

Pestisitlerin kronik etkisine maruz kalan tarım işçilerinde birçok genetik hasarın yanı sıra karaciğer, böbrek ve kaslarda bozukluklar görülmüştür. Yapılan hayvan deneylerinde ise radyoaktif olarak işaretlenip anneye verilen pestisit 5 saat sonra plasentadan fetüse geçtiği ve fetüsün göz, sinir sistemi ve karaciğerine yerleştiği gözlenmiştir. Organofosfatlı ve karbamatlı insektisitler ise etkilerini doğrudan doğruya periferik ve merkezi sinir sistemi üzerinde göstererek canlı yaşamını tehdit etmektedir.

Tarım ilaçlarının kan hücreleri üzerine de olumsuz etkileri vardır. Organofosforlu insektisitler eritrositlerin membran özelliklerini değiştirerek eritrosit fonksiyonun engellemektedir. Diğer bazı pestisitlerde eritrositlerin boyutlarının ve yüzey şekillerinin bozulmasına ve eritrosit antioksidan sistem enzimlerinin aktivitelerinin değişmesine sebep olmaktadır. Pestisitlerin en önemli etkilerinden biri de asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmeleridir. Bu durumda alt beyin kökünde solunum kontrol merkezlerinin baskılanması ile canlı ölüme gider (URL-4, 2009). Pestisitler sadece merkezi sinir sistemine değil pek çok enziminde inaktivasyonuna neden olmaktadır. Karbonik anhidraz enzimi bunlardan bir tanesidir (Doğan, 2005).

Klorofenoller fenolden türemiş sentetik organik bileşiklerdir. Fenol halkasındaki hidrojenlerle klor atomunun yer değiştirmesiyle özellikle endüstriyel ve ticari süreçlerde, fenolün klorlanması ya da klorobenzenin hidrolizlenmesi sonucu oluşur (Czaplicka, 2003). Herbisit, pestisit, boya, solvent ve kağıt endüstrisi atıkları çevrede klorofenollerin kaynağı olarak bulunmaktadır. Ayrıca klorofenoller suların klorlanması prosesi esnasında da oluşmaktadır. 2,4- diklorofenollerde bütün klorofenoller gibi önemli ölçüde toksiktir (Yıldız, 2004).

### 1.10. Afinite Kromatografisi

Bazı proteinler afinite kromatografisi vasıtasıyla bir basamakla çok kompleks olan bir karışımdan bile izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup saflaştırılması istenen molekül, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize olmuş bir komplementer bağlanma ligandına spesifik ve tersinir olarak bağlanır. Matriks olarak, kullanılacak ligandın, saflaştırılacak olan maddeye özel olması gerekmektedir. Küçük olan ligandları bağlamak için hazırlanmış adsorbanların, sterik engellemelerden dolayı ayırma kapasiteleri düşük olabilir. Bu gibi durumlarda ekstra uzantı kolları takmak gerekmektedir. Uzantı kolları matriksle ligand arasına takılırlar (Keha, 2000).

Afinite kromatografisi mükemmel ayırma gücü, yüksek kapasite ve hızıyla örneklerin fraksiyonlanmasında kullanılan bir yöntemdir (Harris ve Angal 1990).

Kimyasal ayırma modern araştırma yöntemlerinin temel elemanı olup kompleks örneklerde çok geniş bir kullanım alanı vardır. Örnekler ilaç ya da kandaki hormonların iz analizlerinden, rekombinant proteinlere kadar geniş bir alanda alınabilir. Likit kromatografisi metodu bu tür ayırmalar için pek çok bileşeni ayırma yeteneği nedeniyle özellikle yaygındır. Uygun materyallerle birleştirildiğinde bu teknik hem yüksek performansta kimyasal ayırma hem de ölçümde kolaylık sağlar. Likit kromatografisinde bulunan durgun ve hareketli fazlar geniş bir aralıkla yer alırlar ve metodun esnek olmasıyla kimyasal ya da fiziksel özellikler bu ayırmanın temelinde kullanılabilirler.

Likit kromatografisinin en esnek ve kullanışlı formu olarak afinite kromatografisi tekniği bilinir. Bu teknikte seçici ve dönüşümlü etkileşimler kullanılır ki bu etkileşimler pek çok biyolojik sistemde enzimin substrata bağlanması ya da antijen antikor etkileşimi gibi olaylarda da bulunmaktadır. Bu etkileşimler afinite kromatografisinde etkileşen molekül çiftlerinden birinin katı desteğe immobilizasyonu ve kolonun içine yerleştirilmesinde etkili olmaktadır. Mobil faz çözünen madde-ligand bağlanması için uygun pH, iyonik şiddet ve çözücü içeriğine sahip olmalıdır. Bu haldeyken örnek içeriği afinite kolonuna tatbik edilir. Bu çözücü afinite kolonunda zayıf hareketli fazın yerine geçer ve uygulama tamponu olarak işaret eder. Örnek bu şartlarda kolondan geçerken afinite ligandına bağlanmak için tamamlayıcı olur. Fakat bu ilişki, içerisinde yüksek seçicilikten dolayı örnekteki diğer bileşenlerin yıkanarak ya da elüe edilerek kolondan pik vermeyecek şekilde uzaklaştırılmasını gerektirmektedir. Kolona tutunmamış bileşenler

kolon yıkanarak uzaklaştırılır. Bu çözücü güçlü hareketli faz olup elüsyon tamponu olarak bilinir (David, 2006).

### **1.11. Amaç**

Mersin balığı (*acipenser gueldenstaedti*) nesli tükenmekte olan bir balık türü olup, yumurtlaması yani erginliğe ulaşması yaklaşık olarak yirmi yıl sürmektedir. Bu nedenle balığın neslinin tükenme tehlikesi daha da ciddiye alınması gereken bir konudur. Tezin amacı Mersin balığı eritrositlerinden ilk kez karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterize edilmesi, ağır metaller ve pestisitler tarafından inhibisyonlarının incelenmesidir. Ülkemizde çok yoğun bir şekilde kullanılmakta olan bazı pestisitler ve ağır metallerde çalışılarak bunların meydana getirebileceği zararların gözlenmesi de amaçlarımızdandır. Bu şekilde nesli tükenme tehlikesi altında olan bu balık türünün kirlilikten ne şekilde etkilendiği hakkında bilgi edinmemiz mümkün olacaktır.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındıkları firma ve özellikleri Tablo 2’de verilmektedir. Çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup değişik firmalardan temin edilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar

| Adı  | Satın alındığı firma                    |
|--|---|
| 2,4-diklorofenol                             | Bayer                                   |
| Akrilamid                                    | Merck KGaA Darmstand, Germany           |
| Amonyum peroksidisülfat                      | Merck KGaA Darmstand, Germany           |
| Antrakol <sup>TM</sup>                       | Bayer                                   |
| Asetazolamid                                 | Merck KGaA Darmstand, Germany           |
| Asetonitril                                  | Sigma-Aldrich Steinheim, Germany        |
| Aseton                                       | J.T.Baker, Holland                      |
| Benzokain                                    | Sigma-Aldrich Steinheim, Germany        |
| Bovine Serum Albumin (BSA)                   | Sigma-Aldrich Steinheim, Germany        |
| Bisakrilamid (N,N’metilen bisakrilamid)      | Merck KGaA Darmstant, Germany           |
| Bromofenolblue                               | Sigma-Aldrich Steinheim, Germany        |
| Coomassi Brilliant                           | Merck KGaA Darmstand, Germany           |
| Dikotan <sup>TM</sup>                        | Bayer                                   |
| Diyaliz torbası                              | Sigma-Aldrich Steinheim, Germany        |
| DMSO (dimetilsülfoksit)                      | Sigma-Aldrich Steinheim, Germany        |
| Folin reaktifi                               | Applichem Darmstel, Germany             |
| Hektavin©                                    | Bayer                                   |
| Korsulfan©                                   | Bayer                                   |
| Na- K tartarat                               | Merck KGaA Darmstand, Germany           |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>             | Merck KGaA Darmstand, Germany           |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>             | Merck KGaA Darmstand, Germany           |
| NaN <sub>3</sub>                             | Fluka(Sigma-Aldrich,Steinheim, Germany) |
| p-nitrofenilasetat                           | Merck KGaA Darmstant, Germany           |
| SDS  | Merck KGaA Darmstand, Germany           |
| Syanojen bromürle aktive edilmiş sefaroze 4B | Sigma-Aldrich Steinheim, Germany        |
| Sepharose 4 B                                | Sigma-Aldrich Steinheim, Germany        |
| Sülfanilamid                                 | Sigma-Aldrich Steinheim, Germany        |
| TEMED (N,N,N’,N’-tetrametiletilen diamin)    | Merck KGaA Darmstand, Germany           |
| Tris(tris(hidroksimetil)-aminometan          | Merck KGaA Darmstand, Germany           |



## 2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar ve satın alındıkları firmalar

| Adı                      | Satın alındığı firma  |
|--------------------------|---|
| Afinite kolonu           | Sigma-Chemical Company, Steinheim, Germany                  |
| Buzdolabı                | Arçelik, Türkiye  |
| Derin Dondurucu          | Arçelik, Türkiye  |
| Elektroforez             | DSG-190-02 C.B.S. Scientific Co.                            |
| Elektroforez güç kaynağı | Thermo EC250-90   |
| Kontak Termometre        | Heidolph, Germany   |
| Fraksiyon kolektör       | Foxy Jr. USA  |
| Liyofilizatör            | Alpha-1-4 LD Plus ve EDWARDS vacum pomp<br>Succex, England  |
| Manyetik karıştırıcı     | Heidolph MR 3001K, Germany                                  |
| Peristaltik pompa        | Tris <sup>TM</sup> USA                                      |
| pH metre                 | Hanna pH213, Romania  |
| Soğutmalı Santrifüj      | Hettich-Universal 320 R                                     |
| Spektrofotometre         | ATI-Unicam UV-2 UV-Vis spectrophotometer<br>(Cambridge, UK) |
| Terazi                   | Ohaus- NJ.USA   |

## 2.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan çözeltiler taze hazırlanmış olup pek çoğu buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilmiştir. Kullanılan çözeltilerin konsantrasyonları, hazırlanış şekilleri Tablo 4' de verilmektedir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan çözeltilerin adı ve hazırlanması

| Çözelti adı   | Hazırlanışı  |
|---|--|
| 0.05 M Tris- SO <sub>4</sub> , pH=7.4                         | 6.055 g Tris 850 mL saf suda çözüldü ve 1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ile pH sı 7.4' e ayarlandı ve 1.0 L' ye seyreltildi.                    |
| 1 M Tris-SO <sub>4</sub> , pH=7.2-10                          | 12.11 g Tris 80 ml saf suda çözüldü ve pH' sı 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ile istenen pH' ya ayarlandı ve 100 ml' ye saf suyla tamamlandı . |
| 25 mM Tris-HCl/0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH=8.7 | 1.51 g Tris ve 7.1 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 250 mL saf suda çözüldü ve 1M HCl ile pH' sı ayarlanıp 500 mL' ye saf suyla tamamlandı.     |

Tablo 4'ün devamı

|   |  |
|---|--|
| 25 mM Tris-HCl/ 22 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH =8.7 | 1.5 g Tris ve 1.56 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> saf suda çözüldü, 1M HCl ile pH'sı ayarlandı ve 500 mL' ye saf suyla tamamlandı.                      |
| 1.5 M Tris-HCl Tamponu (pH=8.8)                                 | 181,7100 g Tris bazı 800 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH=8,8 olacak şekilde ayarlandı ve hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.               |
| 1.0 M Tris-HCl Tamponu (pH=6,8)                                 | 121,1400 g Tris bazı 800 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH'sı ayarlandı ve hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.                               |
| 0.1 M NaCH <sub>3</sub> COO/ 0.5 M NaClO <sub>4</sub> , pH=5.6  | 3.4 g NaCH <sub>3</sub> COO.3H <sub>2</sub> O ve 15.25 g NaClO <sub>4</sub> 150 mL saf suda çözüldü ve 1 M HCl ile pH' sı ayarlandı 250 mL' ye tamamlandı. |
| 0.2 M NaHCO <sub>3</sub> , pH=8.8                               | 8.2 g NaHCO <sub>3</sub> 200 mL saf suda çözüldü ve 1 N NaOH ile pH' sı ayarlandı, 500 mL' ye tamamlandı.  |
| 3 mM <i>p</i> -nitrofenilasetat                                 | 27,2 mg <i>p</i> -NPA 1 mL asetonda çözülüp hızlı bir şekilde karıştırılan 49 mL saf suya çok yavaş bir şekilde ilave edildi.                              |
| % 0.9 NaCl  | 4.5 g NaCl alınıp önce saf suda iyice çözüldükten sonra 500 mL' ye tamamlandı  |
| %10 (w/v)'luk SDS Çözeltisi:                                    | 10,0 g SDS deiyonize suda çözüldürüldükten sonra 100 mL'ye tamamlandı.   |
| %10 (w/v)'luk Amonyum Persülfat                                 | 10,0 g Amonyum persülfat deiyonize suda çözüldürüldükten sonra 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti jel karışımı hazırlanırken o anda hazırlanmalıdır.         |
| %0.1 (w/v)'lik Bromofenol Blue                                  | 0,1 g bromofenol blue deiyonize suda çözüldürüldükten sonra 100 mL'ye tamamlandı.  |
| Coomassie Brilliant Blue  | 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250' nin 45 mL metanol, 45 mL saf su ve 10 mL glasiyal asetik asit karışımında çözülmesiyle elde edildi.                  |
| Jel Yıkama Çözeltisi  | 30 mL metanol, 60 mL saf su ve 10 mL asetik asitin karıştırılmasıyla elde edildi.  |
| Yürütme Tamponu   | 14,4 g Glisin ve 3,0 g Tris bazı 800 mL saf suda çözülerek 5 mL %10'luk SDS çözeltisi ilave edilerek hacmi 1000 mL' ye tamamlandı.                         |

Tablo 4'ün devamı

|  |   |
|--|---|
| Numune Muamele Tamponu   | 50mM Tris-HCl pH=6,8, 100 mM $\beta$ -merkaptotanol, %2'lik SDS, %0,1 bromofenol blue, %10 gliserol konsantrasyonlarında olacak şekilde hazırlandı.   |
| Veronal tamponu 0.025 M Na-Barbital pH=8.15  | 2,577 g Na-Barbital 450 mL suda çözülür pH=0.1 M HCl ile pH=8.15' e ayarlandı ve 500 mL' ye saf suyla tamamlandı.   |
| % 0.02 NaN <sub>3</sub>  | 20 mg NaN <sub>3</sub> alınıp 100 mL' ye saf suyla tamamlandı.  |
| L-tirozin çözeltisi  | 80 mg tirozin 40 mL 0.1 M NaHCO <sub>3</sub> ' de çözüldü(pH= 10 ).   |
| Coomassie Brillnat Blue G-250  | 100 mg Coomassie Brillnat Blue G-250, 50 mL % 95 ve % 85 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> saf suda çözüldürülerek 1000 mL' ye tamamlandı.   |
| CA-II Elusyonu çözeltisi (0.1 M CH <sub>3</sub> COONa/0.5M NaClO <sub>4</sub> (pH=5.6) | 3 g NaOH, 8.2 mL HClO <sub>4</sub> ve 2.04 g CH <sub>3</sub> COONa 125 mL saf suda çözüldü pH'sı ayarlandı ve 150 mL' ye tamamlandı.  |
| % 10 SDS   | 10 g SDS saf suda çözülerek 100 mL saf suyla tamamlandı.  |
| CO <sub>2</sub> çözeltisi  | Buz banyosunda saf su içinden 45-50 dakika CO <sub>2</sub> ' nin geçirilmesiyle elde edilir.  |
| Akrilamid-bisakrilamid (30-0.8)  | 30 g Akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid saf suda çözülerek 100 mL çözelti hazırlanır ve süzgeç kağıdından süzülerek 4 ° C' de saklanarak 1 ay içinde kullanılır.   |
| PBS (10 mM)  | 0.863 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.471 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8.02 g NaCl ve 0.180 g KCl 800 mL saf suda çözüldürülüp pH=7.4' e ayarlandı ve hacim 1L' ye saf suyla tamamlandı.   |
| 10 mM EDTA/10 mM PBS   | 3.72 g EDTA 10 mM PBS içinde çözüldürülerek 1 L' ye saf suyla tamamlandı.   |
| % 1' lik BSA   | 0.1 g Bovine serum albumin alınıp % 0.9 NaCl' de çözülerek 10 mL' ye tamamlandı.  |
| İnhibitör maddelerin hazırlanması  | İnhibisyon çalışmalarında kullanılan stok çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 3.4' de verilmektedir.   |
| Pestisitler  | 10 mg pestisit 1 mL (10 mg/mL) DMSO da çözüldü ve stok 10 <sup>4</sup> (µg/mL= ppm)'lik çözelti elde edildi. Daha sonra C <sub>1</sub> xV <sub>1</sub> =C <sub>2</sub> xV <sub>2</sub> formülünden gerekli seyreltmeler yapılarak istenen ppm'de pestisit DMSO çözücü olarak kullanılarak hazırlandı. |

Tablo 4'ün devamı

|   |  |
|---|--|
| 10 mM stok $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | 0.062 g $\text{CuSO}_4$ alınıp 200 mL saf suda çözüldü ve 250 mL' ye tamamlandı.                           |
| 10 mM stok $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$   | 0.0369 g $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ alınıp 200 mL saf suda çözüldü ve 250 mL' ye tamamlandı. |
| 10 mM stok $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0718 g alınıp 200 mL saf suda çözüldü ve 250 mL' ye tamamlandı |
| 10 mM stok $\text{AgNO}_3$                            | 0.0397 g $\text{AgNO}_3$ alınıp 200 mL saf suda çözüldü ve 250 mL' ye tamamlandı                           |

#### 2.4. Mersin Balığından Kan Örneklerinin Alınması ve Eritrosit Hemolizatının Hazırlanması

Araştırmada kullanılan balık kanı örnekleri Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi'nde bulunan onbeş adet mersin balığından, 2007 ve 2008 yılı Temmuz aylarında, elde edilmiştir. Balıkların boyları 75 cm-150 cm arasında olup, ortalama ağırlıkları 10kg-45kg arasında değişmektedir. Balıkların strese girmelerini önlemek için buldukları suyun içine 200 mL asetonunda 50 ppm benzokain çözümlenerek hazırlanmış olan narkoz çözeltisinden eklenip yeterince sakin hale gelen balıklardan sırayla kuyruk altından enjektörle girilerek kan numuneleri elde edilmiştir (Şekil 9).



Şekil 10. Mersin balığının benzokainli havuzda kan alınımına hazırlanması

Kan örnekleri pıhtılaşmayı önlemek amacıyla sitratlı şırıngalarla alınarak steril cam şişede toplanmıştır. +4°C’ de buz aküleriyle muhafaza edilerek laboratuara ulaştırılmıştır. Şekil 10’da mersin balığının kuyruk kısmından kan numunesinin nasıl alındığı görülmektedir.



Şekil 11. Mersin balığından kan örneklerinin alınması

Yaklaşık 15-20 mL’ lik tüplere konulan kan numuneleri, eritrositleri izole etmek amacıyla 2500 rpm’ de 15 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında kalan lökositler ve plazma tabakaları pipet aid yardımıyla uzaklaştırıldı. Daha sonra 1:2 oranında eritrositler serum fizyolojik (SF: %0.9 NaCl) ile üç kez yıkandı. Her bir yıkama sonrasında üst kısım atıldı. SF ile yıkanmış eritrositler üzerine hacimlerinin üç katı kadar +4°C’ de bekletilmiş soğuk su eklendi. Kan örnekleri +4°C’ de magnetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırılarak kanın tam olarak hemoliz olması sağlandı. Hemoliz sonucunda oluşan hücre zarı ve doku parçacıklarını ayrıca eritrosit dışındaki partikülleri uzaklaştırmak amacıyla, örnekler +4°C’ de 20.000 rpm’ de Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarında 40 dakika santrifüj edildi. Eritrosit hattı eğik bir çizgi çizecek şekilde tüpün içinde üst kısımda toplanmış hale geldi. Alt kısımda kalan hücre artıkları ve membran parçacıklarının alınmamasına dikkat edildi. Tüplerdeki hemolizatlar birleştirildikten sonra magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak, katı Tris eklenmesi suretiyle hemolizatın pH’ sı 8.7’ ye ayarlandı. Ertesi gün kolona tatbiki yapıldı. Daha önceden hazırlanmış olan afinite kolonu, hemolizat uygulanmasına kadar, üzerine 0.05M Tris-SO<sub>4</sub> eklenerek +4°C’ de muhafaza edildi.

## 2.5. Sefaroz-4B Afinite Kolonunun Hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktiveleştirilmiştir sefaro-4B matriksi ile hazırlanır. Bu dolgu materyaline L- tirozin kovalent olarak takılmış olup sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlenmiştir. Bu durumda tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmı oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik inhibitörü olup afinite jelinin yapısına girerek enzimin yüksek oranda saflaştırılmasına yardımcı olmaktadır (Arslan vd., 1996).

CNBr ile aktive edilmiş olan Sefaroz-4B matriksi üzerinde enzimin ligandı takıldı. Matrikse önce L-tirozin spacer arm (uzatıcı kol) takılır ve daha sonra sülfanilamid ise ligand olarak takıldı. Sülfanilamid CA' nın spesifik bir inhibitörü olup jelin yapısına bağlanarak enzimle yüksek oranda etkileşimi sağlamakta ve enzimin saflaştırılmasında en çok kullanılan yöntem olarak da bilinmektedir (Bülbül vd., 2003).

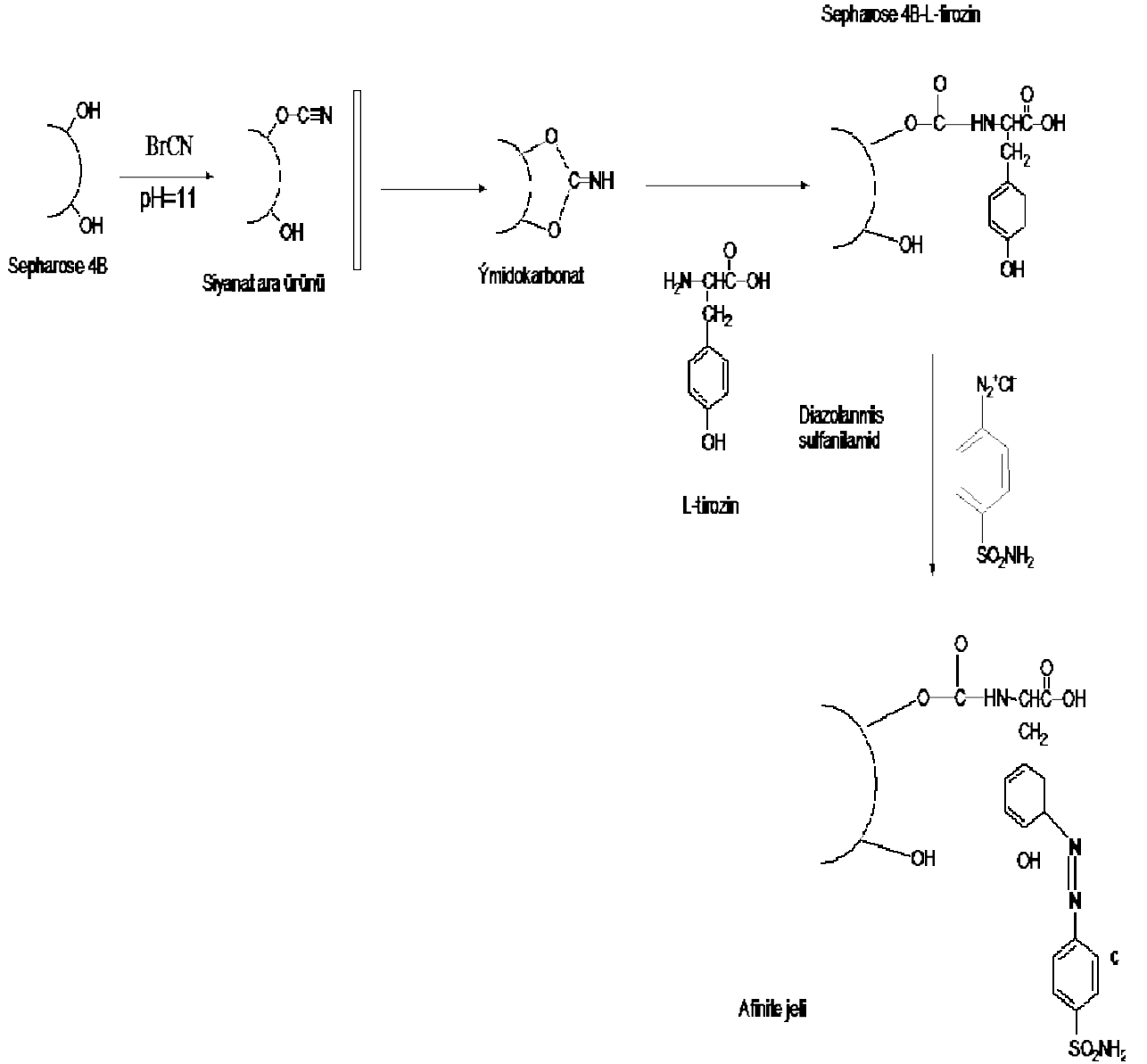
### 2.5.1. CNBr ile Aktive Edilmiş Sefaroz-4B'ye L-Tirozin Takılması

Ticari olarak satın alınan CNBr ile aktive edilmiş 5 gr Sefaroz 4B; 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile yıkanarak bir behere aktarıldı. 80 mg tirozin soğuk NaHCO<sub>3</sub> tamponunun 20 mL' sinde çözüldü ve behere ilave edildi. Yıkama, tirozin ilavesi ve karıştırma işlemleri çok hızlı olarak, 90 saniyeden fazla olmayacak şekilde yapıldı ve 4 ° C' de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 16 saat 4 ° C' de bekletildikten sonra bağlanmayan tirozinlerin uzaklaştırılması amacıyla pH=8.8 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile 280 nm' de absorban vermeyinceye kadar yıkama yapıldı. Böylece tirozin takılı jel elde edildi. Tirozin takılı jel aynı tamponun içine alınıp saklandı.

### 2.5.2.Sülfanilamid Kenetlenmesi

25 g sülfanilamid 0 ° C' de (buz banyosunda) 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü ve içine damla damla soğuk 75 mg NaNO<sub>2</sub> bulunan 5 mL sulu çözelti ilave edildi. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 mL Sefaroz 4B –L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1M NaOH ile pH=9.5'a çıkartılarak sabit tutuldu ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Süspansiyon daha sonra Buchner

hunisinden süzüldü, önce 1 L saf su sonra 200 mL 0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH=7.4) tamponu ile yıkandı. Bu işlemler sırasında jelin tamamen kurumamasına dikkat edilmelidir. Jel, yıkamaları takiben aynı tampon içersine alınarak kolona yüklenene dek + 4 °C' de bekletildi (Şekil 12; Soyut 2006).



Şekil 12. Diazolama ile sefaroze 4B-L-tirozine sulfanilamid takılması

## 2.6. Balık Hemolizatının Kolona Uygulanması

Sülfanilamid ile kenetlenmesi yapılan afinite jelinin üst kısmındaki çözelti dekante edilerek uzaklaştırılır ve jelle dengeleme tamponu (25 mM Tris/0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8.7) ilave edilir. Alt ucunda camdan oluşmuş süzme sistemi bulunan kolona dengeleme tamponu dolduruldu ve peristaltik pompa çalıştırılarak boruların tamponla dolması sağlandı. Tüm işlemler sırasında kolonun dış kısmına soğuk buz torbası bağlanmak suretiyle kolonun sıcaklığının yükselmemesine dikkat edildi. Sonra kolonun üst kısmı kapatılarak borunun ucu dengeleme tamponuna daldırılarak boru sisteminin tamponla dolması ve hava kabarcığının kalmaması sağlandı. Daha sonra peristaltik pompa dönüş hızı, elüat akış hızı 20 mL / saat olacak şekilde ayarlandı ve borunun ucu jel süspansiyonu içine daldırılarak jel kolona yavaşça yüklendi. Kolonun paketlenmesi esnasında jelde kabarcık ve çatlak oluşmamasına özen gösterildi. Jelin kolona tatbikini takiben jel dengeleme tamponu ile 24 saat dengelemeye bırakıldı. Bu sırada elüat akış hızı yine 20 mL/ saat olarak sabitlendi.

Mersin balığı eritrosit hemolizatının kolona uygulanması, borunun ucu dengeleme tamponundan çıkartılıp hemolizat içersine daldırılmasıyla yapılmıştır. Pompanın akış hızı yine 20 mL/saate ayarlanmıştır ve yükleme işlemi tamamlandıktan sonra sistemden yıkama tamponu geçirilerek hemolizattan kaynaklanan ve istenmeyen bileşikler kolondan uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde CA kolona tutturulmaktadır. Yıkama işlemine, hemoglobinin rengi kaybolduktan sonra, elüatın 280 nm' deki absorbansının 0.02' nin altına düşünceye kadar devam edilmesi gerekmektedir.

## 2.7. Karbonik Anhidraz Enziminin Elüsyonu

Karbonik anhidrazın eritrosit homejenatından izole edilmesinde üç farklı metod bulunmaktadır. Tercih edilen metodların ilki DEAE Sefadeksin pH 8.7'de karbonik anhidraza spesifik olarak adsorbsiyonuna dayalı olan metoddur. 0.05 M'lık pH 8.7'lik Tris klorür tamponuyla karbonik anhidrazlar kolondan ayrılabilir. Karbonik anhidraz sadece geri dönüşümlü karbondioksit hidrasyonu ve bikarbonat dehidratasyonunu katalizlemez ayrıca pek çok esteri de hidroliz eder. Enzim aktivitesi hem karbondioksit hidrasyonu ile bakılabildiği gibi aynı zamanda da p- nitro fenil asetatla da bakılabilir. Bu enzimin esteraz aktivitesi karbonik anhidrazla karşılaştırıldığında oldukça zayıf olmasına rağmen aktivite



oldukça kolay ve kesin olarak gözlenmektedir. Karbonik anhidraz diğer esterazlara çok az ya da hiç etki etmeyen sulfonamidler tarafından inhibe edildiğinden dolayı kolayca diğer esterazlardan ayrılabilir. Çalışmada karbonik anhidraz aktivitesi Wilbur- Anderson metoduyla CO<sub>2</sub> hidrasyonu ile yapılmıştır. Esteraz aktivitesi spektrofotometrik olarak *p*-nitro fenil asetat substratına karşı aktivitenin ölçümüne dayanır. Yapılan son çalışmalarda ve bizim yaptığımız çalışmada da ölçümler 348 nm’ de *p*-nitro fenol ve *p*-nitro fenolat iyonunun isobestik noktasında yapılmaktadır. Bu dalga boyu hem *p*-nitro fenol hem de *p*-nitro fenolat iyonunun ( $\epsilon=5,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) isobestik noktasıdır. Ayrıca *p*-nitro fenil asetat iyonu da zayıf bir şekilde absorblama yapmaktadır ( $\epsilon=0,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Bu değerler Bergman, Rimon ve Segel’de de oldukça yakındır (Armstrong vd., 1966).

Kolona tutturulmuş karbonik anhidraz II enziminin afinite kolonundan elüsyonu için (Aslan, 1996) tarafından kullanılan CA II elüsyon çözeltisi (0.1 M CH<sub>3</sub>COONa/ 0.5 M NaClO<sub>4</sub>, pH=5.6) tatbik edilmiştir ve 20 mL/saatlik akış hızında elüatlar 5 mL’ lik fraksiyonlar halinde bir fraksiyon toplayıcı yardımıyla alınmıştır ve 280 nm’ de absorbanslar okunmuştur. Elde edilen elüatlar bir sonraki işlem için + 4 °C’ de muhafaza edilmiştir.

Elüsyon işleminden sonra kolona tekrar dengeleme tamponu uygulanmıştır. Afinite jeli bir sonraki kullanıma kadar dengeleme tamponu içinde + 4 °C’ de bekletilmiştir.

## **2.8. Protein Tayini**

### **2.8.1. Kalitatif Protein Tayini**

Bu tayinin esası, proteinlerin yapısında bulunan aromatik tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm’de maksimum absorbans vermesine dayanan Warburg Metodu’na dayanmaktadır (Segel, 1975).

### **2.8.2. Kantitatif Protein Tayini (Bradford Yöntemi)**

Yöntem fosforik asitli ortamda negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinin üzerindeki pozitif yüklü proteinlere bağlanmasına dayanmaktadır. Boyanın kırmızı (Dalga boyu 465 nm) ve mavi (dalga boyu 595 nm) iki formu mevcuttur. Proteinin

bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Boya proteine çok hızlı bir şekilde bağlanır ve yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Afinite kromatografisi sonucu elde edilen eşit miktardaki enzim çözeltilerinde kantitatif protein miktarı bu yöntemle belirlenmektedir. Coomassie brilliant blue G-250'nin negatif yüke sahip olması nedeniyle protein üzerindeki pozitif yüke bağlanarak renk değişimi gözlenmektedir. Boyanın kırmızı rengi proteinin bağlanmasıyla maviye dönmektedir (Arslan vd., 1996).

Önce standart protein çözeltileri hazırlanmıştır. Bunun için 1 mg/ mL BSA içeren stok proteinden 10, 25, 50, 75 ve 100 µL alınmıştır ve hacimler su ile 100 µL' ye tamamlanmıştır. Sonra tüplere 5 'er mL Coomassie reaktifi ilave edilmiştir ve vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra tüplerdeki çözeltilerin 595 nm' de absorbansları saf suya karşı okunmuştur.

## 2.9. Elüatlarda Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayini

Karbonik anhidraz aktivitesi monomerik, kolorometrik, elektrometrik olarak üç ayrı yöntemle hesaplanabilir. Bu çalışmada karbonik anhidraz aktivitesinin ölçümü için bir elektrometrik yöntem tanımlanmıştır. Karbondioksitle doyurulmuş aparatlar ve veronal tamponu otomatik olarak ölçülüp şırınga edilir ve pH değişimi cam bir elektrotla ölçülür. İndikatör konsantrasyonları inhibisyon etkisi nedeniyle %0-11 arasında tutulması uygundur. Bu yöntem ROUGHTON ve BOOTH yöntemlerinin modifikasyonudur. Dokularda genelde enzim konsantrasyonu kolorometrik yöntemle basitlikten dolayı da monomerik teknikler kullanılarak hesaplanır. Monomerik yöntemin dezavantajı indikatörlerin inhibitör etkisi olmasıdır (Wilbur ve Anderson, 1948).

Bu nedenle kolorometrik yöntemde karbonik anhidraz aktivitesine etki etmeyen veronol tamponu kullanılır ve brom timol mavisıyla bu işlem gerçekleştirilir (Roughton ve Booth, 1945).

Yukarıdada ifade edildiği gibi enzimin aktivitesi klasik olarak iki şekilde tayin edilmektedir. Bunlardan ilki enzimin fizyolojik substratı olan CO<sub>2</sub>' in kullanıldığı ve kolorimetrik bir test olan hidrataz aktivitesidir. İkincisi ise spektrometrik ölçümü dayanan ve substrat olarak *p*-nitrofenilasetatın kullanıldığı esteraz aktivitesidir.

### 2.9.1 Hidrataz Aktivitesi Tayini

Yöntem Maren ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve sonra pek çok bilim insanı tarafından modifiye edilen bir yöntemdir. Metodun temelinde substrat olarak bulunan CO<sub>2</sub>'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> iyonundan ileri gelen pH değişiminin (10 ve 7.4) brom timol mavisi indikatörlüğünde renginin değişim süresinin ölçümüne dayanmaktadır. Bu yöneme göre aktivite ölçümü aşağıdaki tablodaki sıraya göre yapılmaktadır. Ortamın pH' sının ayarlanmasında Veronal tamponu (0.025 M sodyum barbitol, pH=8.15) kullanılmaktadır. Substrat çözeltisi olarak doymun karbondioksit çözeltisi kullanılmıştır. Bunun için buz banyosu içinde saf suyun içine 40-50 dakika hızlı bir şekilde CO<sub>2</sub> geçirildikten sonra doymun hale gelmiş çözeltiden yine yavaş şekilde CO<sub>2</sub> geçirilmeye devam edilerek deneyde doymun çözeltisi kullanılmıştır (Maren.,1960). Yapılan hidrataz aktivitesi için pipetlemeler aşağıda verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Hidrataz aktivitesi için pipetlemeler

| Çözeltiler                     | Kontrol (mL) | Numune (mL) |
|--------------------------------|--------------|-------------|
| Veronal tamponu 0.025 M pH=8.2 | 2.0          | 2.0         |
| %0.04 bromtimol                | 0,1          | 0,1         |
| Numune                         | -            | 0.1         |
| Saf su                         | 0,9          | 0,8         |
| Doymun karbondioksit çözeltisi | 2.0          | 2.0         |

Substrat ilavesinden hemen sonra vorteksleme yapılarak ve çözeltinin renginin karıştırma anından itibaren maviden sarımsı yeşile dönmesine kadar geçen zaman kronometre ile tespit edilir. Enzim ünitesi enzimsiz reaksiyon süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanır. Enzim aktivitesi ise aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Bu aktivite "*Wilbur- Anderson Aktivitesi*" olarak bilinir (7).

$$EU = \frac{t_0 - t_1}{t_1} \quad (7)$$

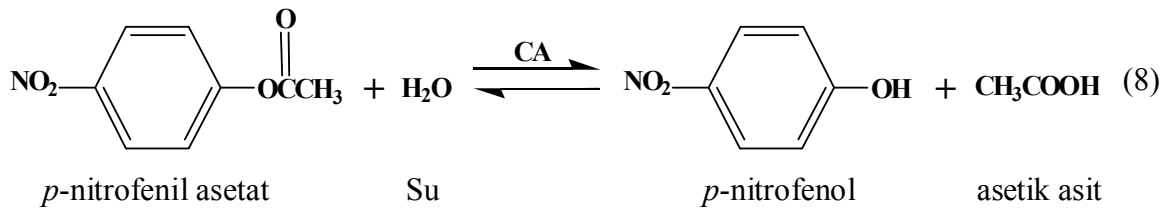
EU : Enzim ünitesi

t<sub>0</sub>: Enzimsiz denemede ölçülen süre

$t_1$ : Enzim varlığında ölçülen süre

### 2.9.2. Esteraz Aktivitesi Tayini

Enzim, substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesiyle *p*-nitrofenil asetatin *p*-nitrofenola dönüşüm reaksiyonu (8)'de görülmektedir.



Substratın 348 nm' deki absorbansının azalmasından aktivite tayin edilmektedir (Armstrong vd., 1966 , Verporte vd., 1967). Tayinde substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetat (P-NFA) günlük olarak taze hazırlanmıştır. Bunun için 27.2 mg substrat, 1 mL asetonda çözüldü ve çok hızlı karıştırılan 49 mL suya, çok yavaş olarak ilave edildi. 3 mM üzerinde konsantrasyonda *p*-nitro fenil asetat hazırlamak mümkün olmadığı için ve çözücü olarak kullanılan aseton enzime minimum zarar verdiği için *p*-nitro fenil asetatin asetonda çözülmesi tercih edilmektedir. Aktivite ölçümü için aşağıdaki tablodaki pipetleme işlemleri yapılmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Esteraz aktivitesi için pipetlemeler

| Çözeltiler                             | Kontrol (mL) | Numune (mL) |
|--|--------------|-------------|
| 1 MTris-SO <sub>4</sub> tamponu (pH=9) | 1.4          | 1.4         |
| 3 mM <i>p</i> -NFA                     | 1.0          | 1.0         |
| Saf su                                 | 0.6          | 0.5         |
| Enzim çözeltisi                        | -            | 0.1         |

Son pipetlemeden sonra her 15 saniyede bir absorbans ölçülmüştür ve 3 dakika sonra 25 °C’ de ve 348 nm’ de saf suya karşı absorbanstaki azalma tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi ve spesifik aktivite şöyle hesaplanmıştır (9,10).

$$EU = \frac{\Delta A_{348 \text{ nm}} \times 0.001}{5.4} \quad (\mu\text{M/dak}) \quad (9)$$

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{EU/\text{mL}}{\text{mg protein} / \text{mL}} \quad (10)$$

### 2.10. Spesifik Aktivite Tayini

Tüplerde toplanan elüatların 280 nm’ deki absorbansları kullanılan tampona karşı okunmuştur. Daha sonra protein bulunan tüplerde enzim aktivitesi esteraz ve hidrataz aktivitelere göre tayin edilerek miligram protein başına düşen enzim aktivitesi olarak spesifik aktivite belirlenmiştir. Spesifik aktivite enzim saflığının ölçüsü olarak kullanılmaktadır.

### 2.11. Diyaliz

Afinite kolonundan elde edilen elüatlarda bulunulabilecek kullanılan tampon çözeltilerden kaynaklanan yan ürünlerden kurtulmak amacıyla diyaliz işlemi yapılmıştır. 12 cm uzunlukta yeni açılan diyaliz torbası 1 L’ lik beher içine yerleştirildi ve 100 mM NaHCO<sub>3</sub> / 10 mM Na<sub>2</sub>.EDTA ( pH=7.4) tamponu ilave edildi ve 2 saat süreyle 60 ° C’ de yavaşça karıştırıldı. Diyaliz torbası saf suyla yıkanarak 1 saat 60 ° C’ de saf suyla karıştırıldı. Enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirilerek elüatlar, diyaliz torbasının alt kısmı mandallanarak, plastik pastör pipetiyle diyaliz torbasına aktarıldı. 10 mM EDTA/ 10 mM PBS çözelti karışımıyla 12 saat, daha sonra ise sadece 10 mM PBS ile diyalize tabi tutuldu. Diyaliz esnasında sıcaklık +4°C’de tutulmuş olup, ayrıca 2,5 saatlik aralıklarla tamponlar değiştirilmiştir.

### 2.12. Enzim Çözeltisinin Liyofilizasyonu

Afinite kolonundan elüe edilen ve sonra diyalizden geçirilen enzim çözeltisinin içindeki suyu uzaklaştırmak, konsantre hale getirmek ve en önemlisi numunenin uzun süre bozunmadan muhafaza edilmesi amacıyla dondurup ve kurutma (dry-freezing) yöntemi uygulandı. Sıvı azot ile enzim çözeltisi donduruldu ve vakum altında soğutmalı sistemde çözücüsü uçurularak derişik hale getirildi. Elde edilen derişik enzim çözeltisi eşit parçalar haline getirilerek (aligotlar) derin dondurucuda saklandı. Her bir kullanım için uygun tamponla çözmek suretiyle gerekli seyreltme işlemleri yapıldı.

### 2.13. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi

Karbonik anhidraz enziminin saflaşma derecesinin belirlenmesi ve yaklaşık moleküler ağırlığının belirlenmesi için % 12'lik SDS-poliakrilamid jel elektrofözezi (SDS-PAGE) uygulanmıştır (Laemmli, 1970).

Ayırma Jeli (toplam hacim 20 mL) 6.6 mL deiyonize su, 8.0 mL %30'luk akrilamid çözeltisi, 5.0 mL 1.5 M Tris-HCl tamponu (pH=8.8), 0.2 mL %10'luk SDS çözeltisi, 0.2 mL %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.008 mL TEMED karışımının hazırlanmasıyla elde edildi. TEMED ilave edildikten sonra karışım hızlı bir şekilde karıştırılarak bir şırınga yardımıyla levhalar arasına aktarıldı. Jelin üst yüzeyi düzgün olması için üzerine dikkatlice su ilave edilmiştir ve polimerizasyonun tamamlanması için 30 dakika beklenmiştir.

Ayırma jelinin donmasından sonra yükleme jeli hazırlanıp tatbik edilmiştir. Yükleme jeli (toplam hacim 5 mL ) 3.4 mL deiyonize su, 0.83 mL %30'luk akrilamid çözeltisi, 0.63 mL 1.0 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8), 0.05 mL %10'luk SDS çözeltisi, 0.05 mL %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.005 mL TEMED karışımının hazırlanmasıyla elde edilmiştir. TEMED ilave edildikten sonra karışım hızlı bir şekilde karıştırılarak bir şırınga yardımıyla levhalar arasına aktarıldı ve kuyucukları oluşturmak üzere tarak yerleştirilmiştir. Jelin donmasından sonra tarak yerinden çıkarılarak, birkaç kez jel dikkatlice saf suyla temizlenmiştir. Hazırlanan jel elektroförez düzeneğine yerleştirilerek, yürütme tamponu ilave edilmiştir. Protein standardı ve numuneler eşit hacimlerde alındıktan sonra kuyucuklara bir Hamilton şırıngasıyla aktarıldı. Elektroförez düzeneği

bir güç kaynağına bağlanarak, kuyucuk başına 2 mA akım uygulanacak şekilde güç kaynağı ayarlandı.

Jel, Coomassie brilliant blue R250 boyası ile 4 saat oda sıcaklığında boyandı. Jel yıkama çözeltisi ile birkaç kez muamele edilerek bantların belirlenmesi sağlandı. Jel % 20 gliserol içeren saf su içinde saklanmıştır.

## **2.14. Mersin Balığı Eritrositlerinden Saflaştırılan CA Enzimi ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar**

### **2.14.1. Optimum pH Çalışması**

Saf enzimin optimum pH çalışması için pH=6.0 ile 10.0 aralığında değişik pH' larda esteraz ve hidrataz aktiviteleri ile ölçülmüştür. pH=6.0' da fosfat tamponu pH=7.0- pH=9.0 arasında Tris-SO<sub>4</sub> tamponu ve pH=9.0' un üstünde ise Glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 15' de verilmektedir.

### **2.14.2. Optimum İyonik Şiddet Çalışması**

Bunun için aktivitenin optimum olduğu pH da 0.1 M ve 1 M' lik değişik iyonik şiddete sahip Tris-SO<sub>4</sub> tamponları kullanıldı. Enzim aktivitesi esteraz aktivitesi üzerinden incelenmiştir ve elde edilen optimum iyonik şiddet Şekil 17' de verilmektedir.

### **2.14.3. Optimum Sıcaklık Çalışması**

Enzimin uygun pH ve iyonik şiddete sahip değerlerinde 10 °C ile 50 °C arasında 5' er °C' lik sıcaklık farkları oluşturularak enzimin optimum pH' sında spektrofotometrik olarak esteraz aktivitesi ölçülmüştür. Optimum sıcaklık tayini için yapılan çalışma grafiği Şekil 16' da verilmektedir.

#### 2.14.4. *p*-Nitrofenil Asetat (*p*-NFA) Substratı İçin $K_m$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve $V_o$ Değerlerinin Bulunması

Mersin balığı eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesinin ölçümünde kullanılan *p*-NFA substratının  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tayininde en az 5 farklı substrat konsantrasyonunda ve paralel çalışılmak suretiyle esteraz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Değişen substrat konsantrasyonuna karşı hız Lineweaver–Burk grafiğine göre çizildi ve grafikten  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri bulunmuştur.

$k_{cat}$  birim zamanda 1 mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanır ve enzimin katalitik etkinliğini gösteren önemli bir sabittir. Aynı zamanda “*turnover sayısı*” olarak da bilinmektedir. Saflaştırılan enzim çözeltisinde protein tayini yapılarak toplam enzim miktarı ( $E_T$ ) bulundu ve  $k_{cat} = V_{max} / E_T$  den hesaplandı.  $V_o$  özgülük sabitinin bulunmasında ise  $V_o = k_{cat} / K_m$  formülünden yararlanıldı.  $V_o$  değeri, enzimin katalitik etkinliğinde veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasında kullanılan bir sabittir (Nelson ve Cox, 2005).  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  değerleri Tablo 8’de verilmektedir.

#### 2.14.5. CA’nın İnhibisyon Değerlerinin İncelenmesi

CA enziminin bilinen spesifik inhibitörleri sülfanilamid ve asetazolamid ile çevre kirliliğine yal açan ve bazı ağır metal iyonları ile pestisitlerin inhibisyon etkileri incelendi. İnhibisyon çalışmasında enzimin bilinen inhibitörlerinden asetazolamid ve sülfanilamid kullanıldı. En az 5 farklı inhibitör madde konsantrasyonda yapılan inhibisyon çalışmasında inhibitör konsantrasyonu ile % inhibisyon arasında bir grafik çizildi. İnhibitör madde ile % inhibisyon arasındaki ilişki Excell programında  $R^2$  değeri ve lineer denklem çıkarıldı.  $R^2$  değeri 0.0 ile 1.0 arasında değişmektedir. ( $y=ax+b$ ) doğru denkleminde % 50 inhibisyonu veren inhibitör konsantrasyonu  $IC_{50}$  belirlendi (Tablo 9).

Sülfanilamid, asetazolamid ve ağır metal iyonlarından  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ , nin inhibisyonu esteraz aktivitesine göre;  $Ag^{+}$  nin inhibisyonu ise hidrataz aktivitesine göre tayin edilmiştir.  $Ag^{+}$  iyonları tayininde hidrataz aktivitesinin kullanılmasının nedeni reaksiyon ortamında tampondan gelen klorür iyonlarını çöktürmesi nedeniyledir.

Çalışmada kullanılan pestisitler DMSO’da çözüldü ve seyreltilmek suretiyle değişik pestisit konsantrasyonunda hidrataz aktivitesine göre inhibisyonları incelendi. İlk önce

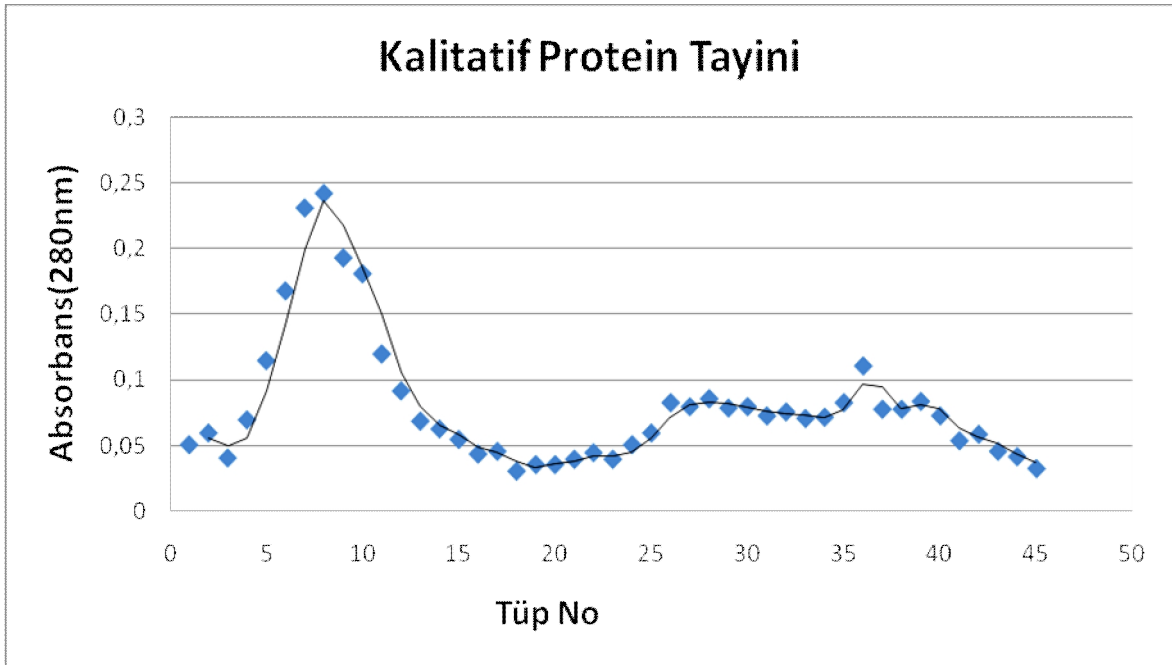


DMSO'nun inhibisyon etkisi incelenerek ve normal inhibitör değerlerinden çıkartılmak suretiyle çözücüden ileri gelen % inhibisyon da bertaraf edilmiş olmaktadır.

### 3. BULGULAR

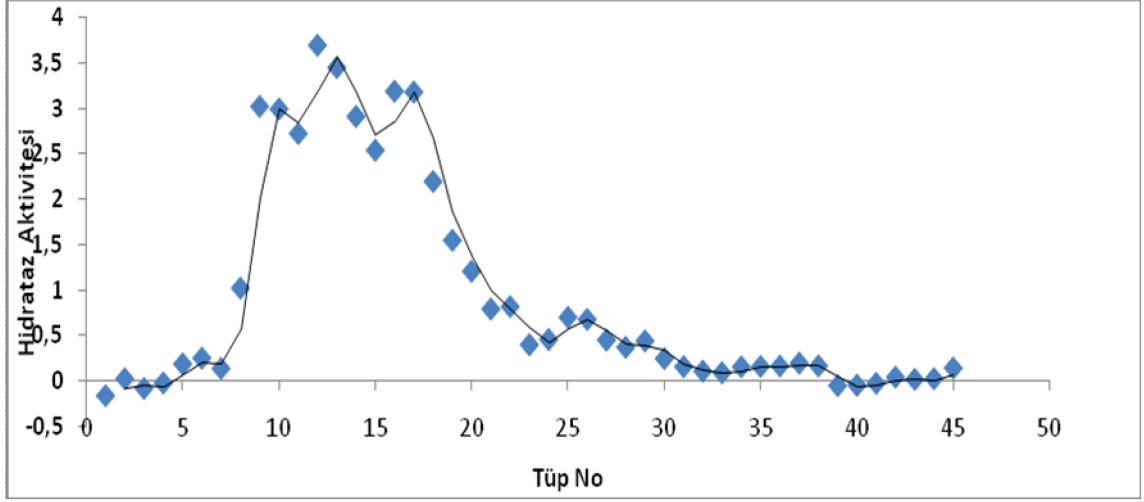
#### 3.1. Kalitatif Protein Tayini

Tayin proteinlerde bulunan aromatik triptofan ve tirozin amino asitlerinin 280 nm' de absorbands vermesi esasına dayanmaktadır (Segel, 1975). Afinite kolonundan elde edilen elüatların 280 nm' de kuvars küvetlerdeki absorbandsları Şekil 13' de verilmektedir.



Şekil 13. Elüatlarda tespit edilen kalitatif protein tayini

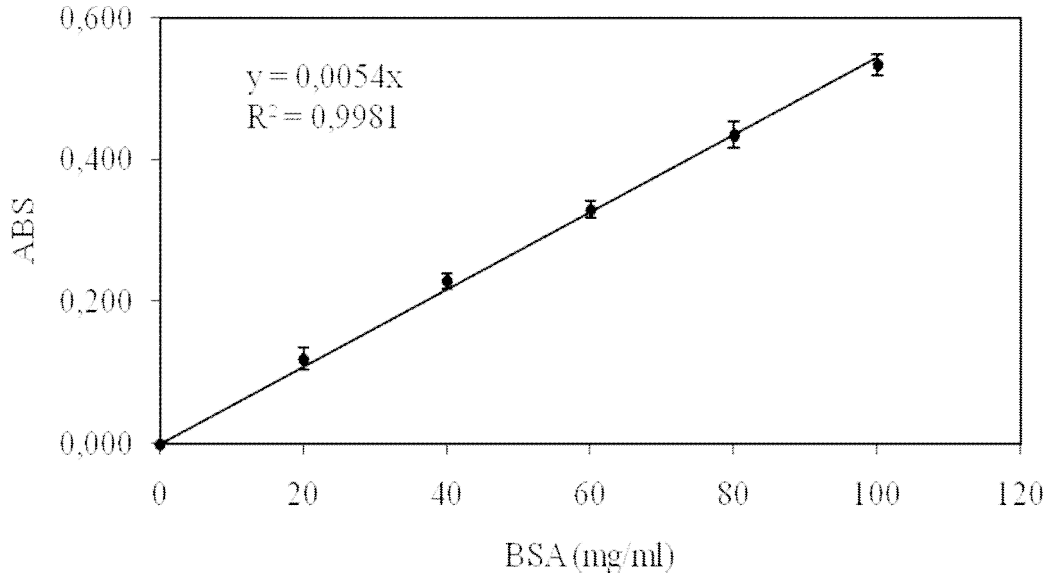
45-50 deney tüpünde toplanan elüatların 280 nm' deki absorbandslarına göre 5-15 nolu tüplerde ve 35-40 nolu tüplerde protein olduğu görülmektedir. Tüp numaralarına göre enzimin hidrataz aktivitesi tayin edildiğinde ise yine 8-17 nolu tüplerde yüksek hidrataz aktivitesinin olduğu 20. tüpten sonra aktivitenin bariz şekilde düştüğü ve 40. tüpten sonra kaybolduğu gösterilmektedir (Şekil 14).



Şekil 14. Elüatlarda tespit edilen CA' nın hidrataz aktivitesi

### 3.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Kantitatif protein tayini Bradford yöntemine göre Coomassie Brilliant Blue reaktifi kullanılarak tayin edildi. Standart grafik stok BSA' dan seyreltmeler yapılmak suretiyle hazırlandı ve Şekil 15'deki grafikte standart çalışma grafiği verilmektedir.



Şekil 15. Bradford yöntemine göre protein standart çalışma grafiği

### 3.3. CA' nın Mersin Balığı Eritrositlerinden Saflaştırması

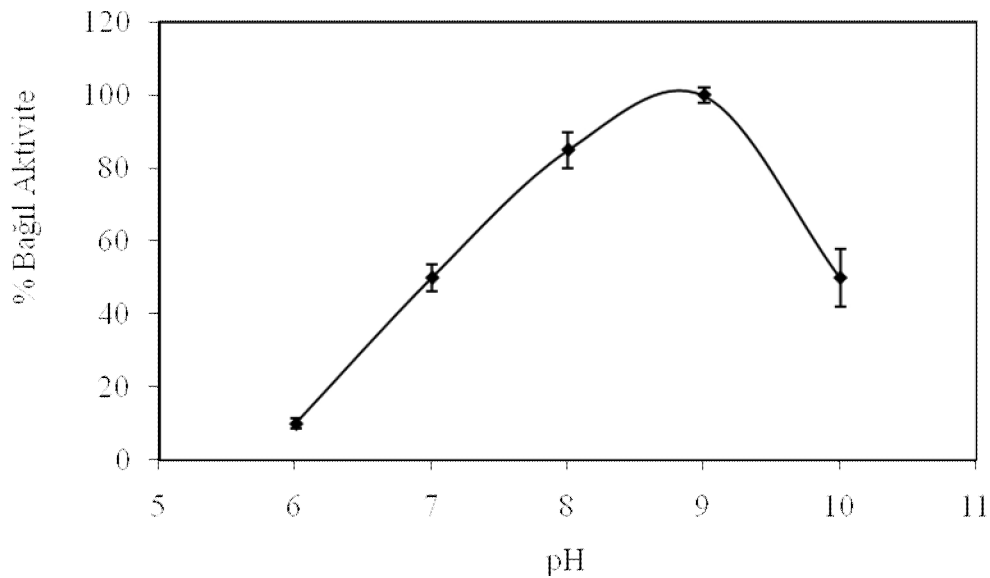
Balık eritrositlerinin SF ile yıkandıktan sonra eritrosit paketlerinin parçalanması ve yüksek devirli santrifüj ile ayrılmasından sonra uygulanan saflaştırma adımları ve elde edilen saflaştırma verileri Tablo 7'da verilmektedir.

Tablo 7. Mersin balığı eritrositlerinden CA enziminin saflaştırma tablosu

| Saflaştırma basamakları               | Toplam Hacim (ml) | Aktivite (EU/ml) | Protein miktarı (mg/ml) | Toplam protein (mg) | Toplam aktivite | Spesifik aktivite (EU/mg protein) | % Verim | Saflaştırma Katsayısı |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|-----------------------------------|---------|-----------------------|
| Eritrosit hemolizati                  | 62                | 55               | 1,1                     | 68,2                | 3410            | 50                                | 100     | 1                     |
| Sepharoz-4B Afinite kolonu ve Diyaliz | 4,6               | 205              | 0,0076                  | 0,035               | 943             | 26943                             | 29      | 539                   |

### 3.4. Mersin Balığı Eritrositlerinden Saflaştırılan CA' nın Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

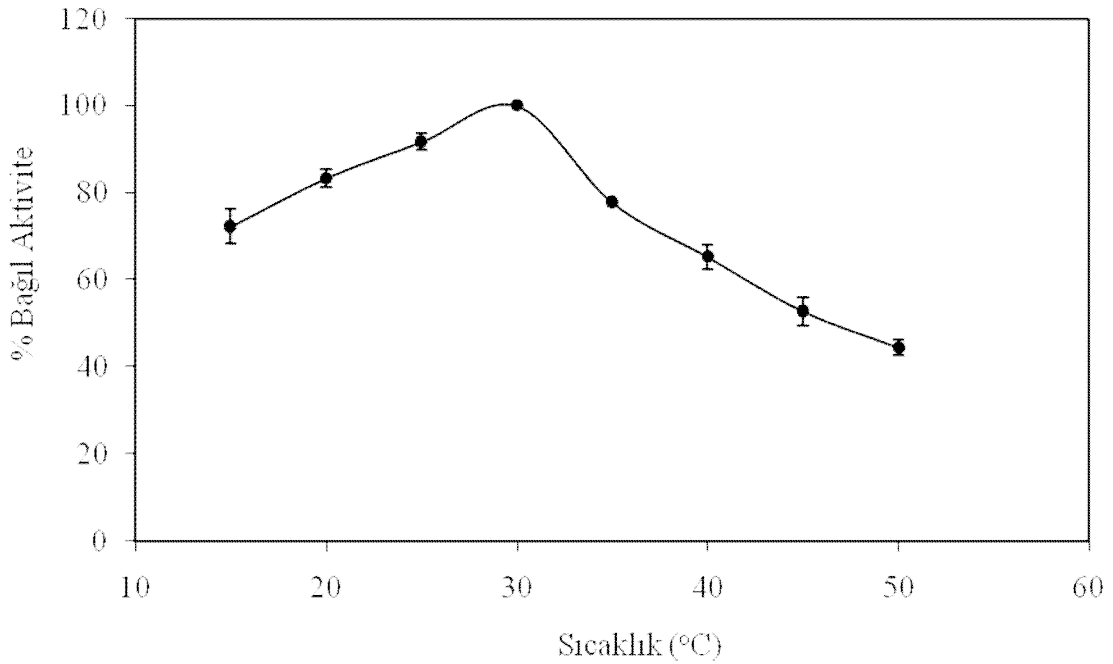
Mersin balığı eritrositlerinden saflaştırılan Karbonik anhidraz enziminin hangi pH' da maksimum aktivite verdiğini belirlemek için pH 6.0 ile pH 10.0 aralığında Tris tamponu kullanarak esteraz aktivitesi ölçüldü. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH 9.0 olarak tespit edildi (Şekil 16).



Şekil 16. Optimum pH çalışması grafiği

### 3.5. Mersin Balığı Eritrositlerinden Safılaştırılan CA' nın Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

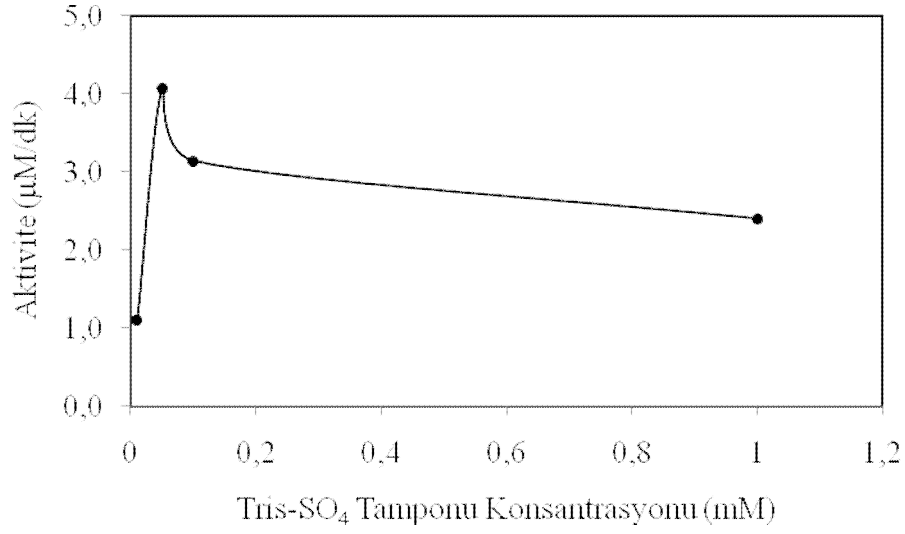
Mersin balığı eritrosit Karbonik anhidraz enzimin optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için 15 °C - 55 °C aralığında ve her 5 °C' de bir ölçüm yapmak suretiyle aktivite ölçülmüştür. Kontak termometre yardımıyla spektrofotometrenin yanında su banyosunda çalışma yapıldı. Enzimin 30 °C' de maksimum aktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 17). 45 °C' de aktivitenin yaklaşık % 55 oranında azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 17. Optimum sıcaklık çalışması grafiği

### 3.6. Mersin Balığı Eritrositlerinden Safılaştırılan CA'nın Optimum İyonik Şiddet Değerinin Belirlenmesi

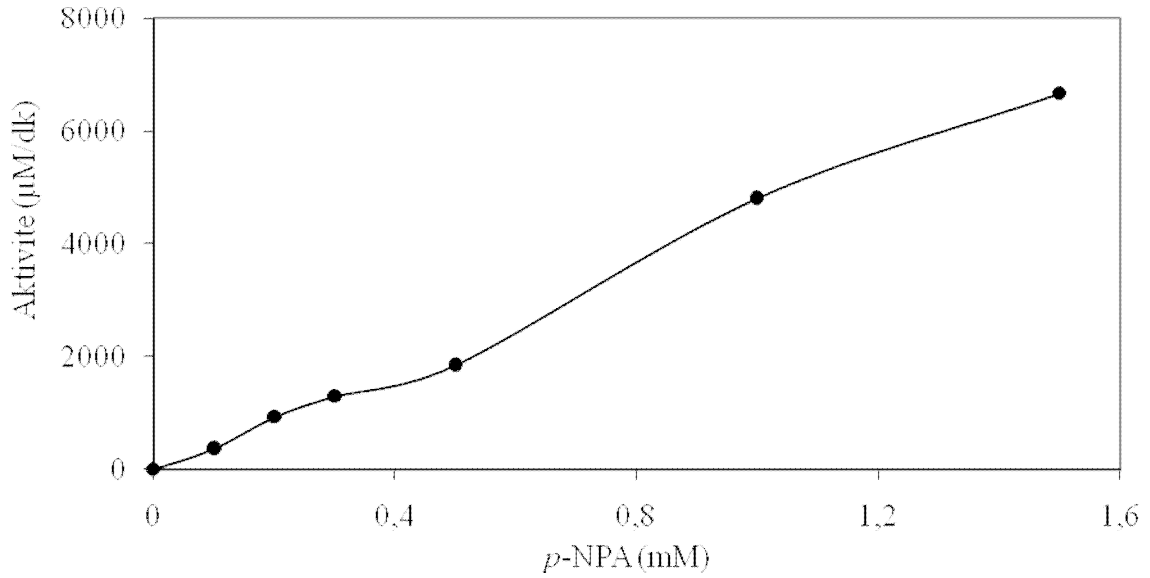
Karbonik anhidraz enziminin değişik iyonik şiddetlerde Tris tamponu kullanarak pH 9.0' da aktivite ölçüldü. Değişik Tris tamponu konsantrasyonlarında yapılan ölçümlerde elde edilen sonuçlar Şekil 18'de verilmektedir.



Şekil 18. Optimum iyonik şiddet çalışması grafiği

### 3.7. Mersin Balığı Eritrositlerinden Saflaştırılan CA Optimum Substrat Konsantrasyonun Belirlenmesi

Enzim konsantrasyonu sabit tutularak değişik substrat konsantrasyonlarında esteraz aktivitesi ölçüldü ve elde edilen değerler Şekil 19'deki grafikte verilmektedir.

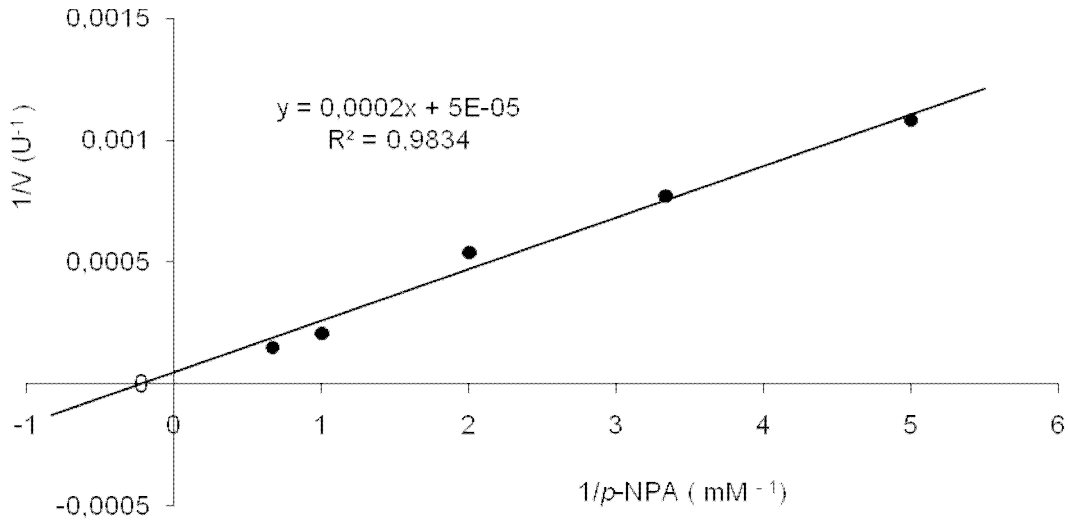


Şekil 19. Optimum substrat konsantrasyonu çalışma grafiği

*p*-nitrofenilasetat ile esteraz aktivitesi ölçümünde enzimin aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişim gösterdiğini ve Michealis-Menten grafiğine göre maksimum aktivitenin 1.5 mM konsantrasyonun üzerinde ulaşıldığı görülmektedir.

### 3.8. Mersin Balığı Eritrositlerinden Saflaştırılan CA'nın *p*-NPA İçin $K_m$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve $V_0$ ( $k_{cat}/K_m$ ) Değerlerinin Belirlenmesi

Değişik substrat konsantrasyonların yapılan esteraz aktivitesi ölçümü sonucu Michaelis-Menten grafiği (Şekil 19) ve Lineweaver-Burck grafiği (Şekil 20) çizildi. Enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri  $1/S$  ye karşı  $1/V$  olacak şekilde Lineweaver-Burck grafiği çizildi ve  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri grafikten bulundu. Buna göre enzimin *p*-NFA substratına karşı 30 °C' de, pH= 9.0' da ve doygun substrat konsantrasyonunda bulunan kinetik değerleri Tablo 8' de verilmektedir.



Şekil 20. Karbonik anhidrazın *p*-NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği

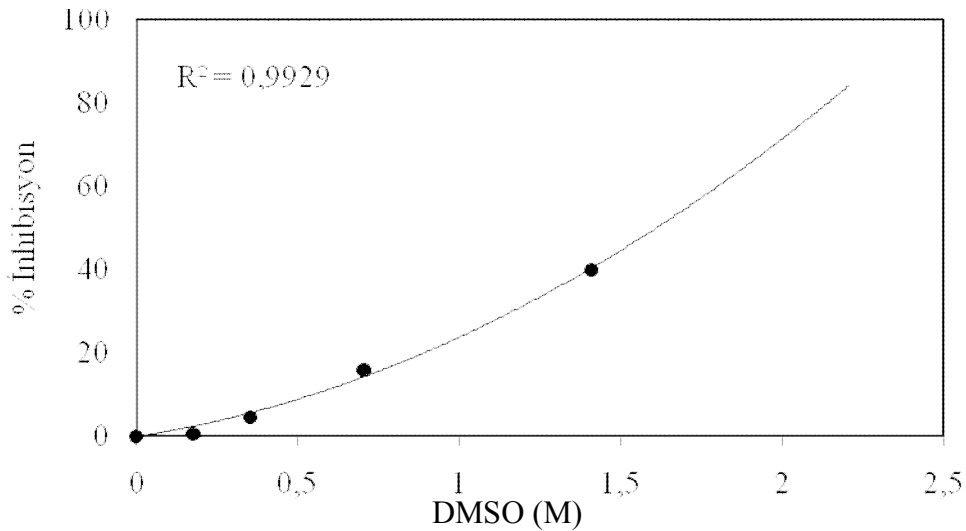
Enzimin katalitik gücünün göstergesi olan  $k_{cat}$  değeri  $k_{cat} = V_{max}/E_T$  formülüne göre belirlendi. Enzimlerin katalitik etkinliğini veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının bir yolu da reaksiyonlar için özgüllük sabitinin ( $V_0$ ) bulunmasıdır. Özgüllük sabiti  $V_0 = k_{cat}/K_m$  den hesaplandı.

Tablo 8. Mersin balığı eritrosit karbonik anhidrazının kinetik sabitleri

|                             | $V_{max}$  | $K_m$ | $k_{cat}$            | $k_{cat}/K_m$                                |
|-----------------------------|------------|-------|----------------------|--|
| <i>p</i> -nitrofenil asetat | 20(mM/dak) | 4 mM  | 20,8 s <sup>-1</sup> | 0.5 x10 <sup>4</sup> (1/μM.s <sup>-1</sup> ) |

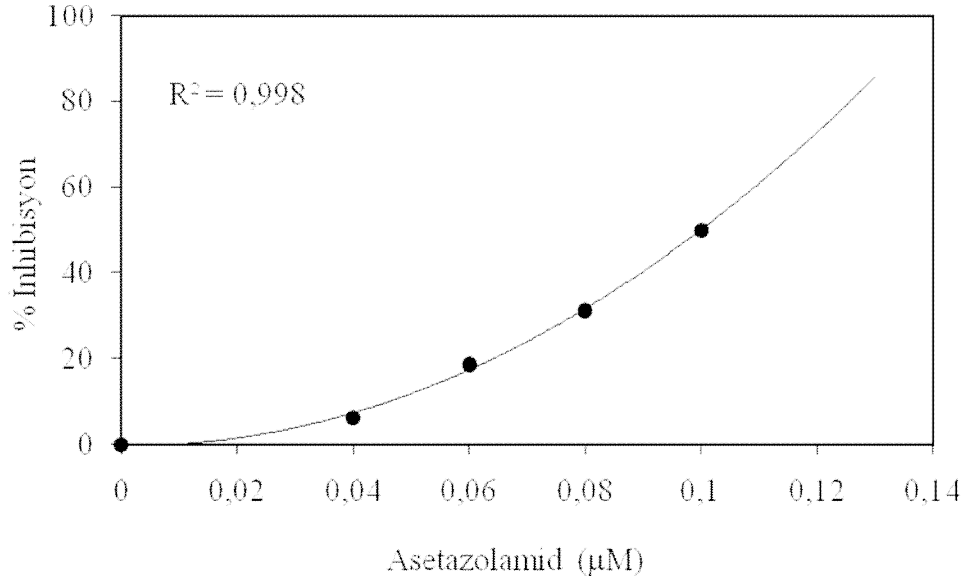
### 3.9. İnhibisyon Çalışmaları

İnhibisyon çalışmalarının bir kısmı esteraz bir kısmı ise hidrataz aktivitesine göre tayin edildi. İnhibisyon çalışmasında enzimin bilinen inhibitörlerinden asetazolamid ve sulfanilamid kullanıldı. Ayrıca suda çözünen bazı ağır metal tuzlarının ve pestisitlerin enzime inhibisyon etkileri incelendi. En az 4-5 farklı konsantrasyonda yapılan inhibisyon çalışması sonucunda inhibitör konsantrasyonu ile % inhibisyon arasında pozitif lineer bir korelasyon olduğu ( $R^2$ : 0.9 - 1.0) bulunmuştur. İnhibitör maddelerin enzimin aktivitesini % 50 azaltan inhibitör sabitleri ( $IC_{50}$ ) değerleri Tablo 9’ de verilmektedir. Enzimin bilinen inhibitörleri asetazolamid ve sulfanilamid yanında ağır metal iyonları ve pestisitler tarafından inhibe olduğu görülmektedir. Farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % inhibisyon değerleri Şekil 21’den Şekil 31’e kadar verilmektedir. Pestisitlerin en ideal çözücüsü olarak DMSO kullanıldı ve ilk önce çözücünün enzime inhibisyon etkisi belirlendi (Şekil 21). Çalışmada kullanılan pestisitlerin tümünün CA’ yı inhibe ettiği bulunmuştur.

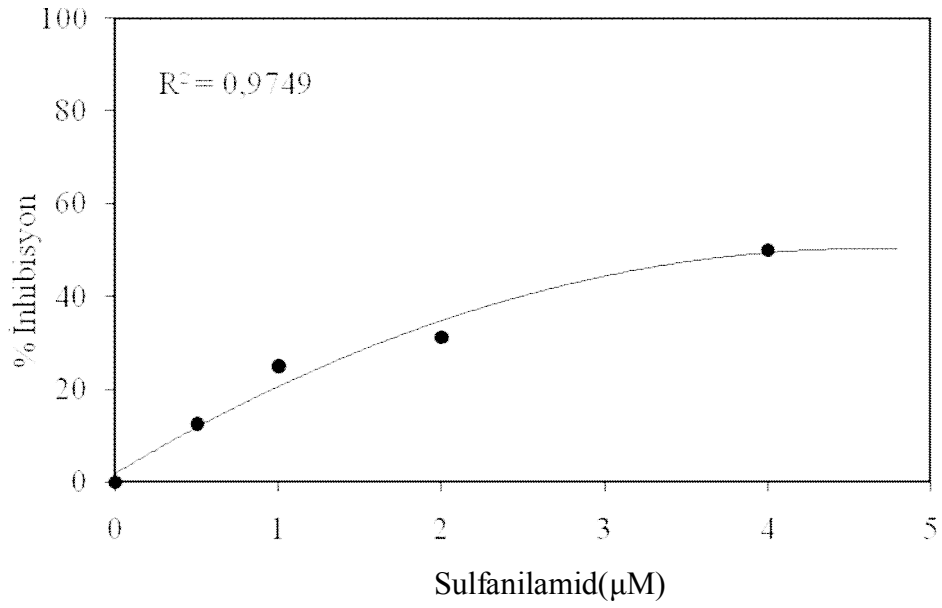


Şekil 21. Çözücü DMSO' nun inhibisyonu ( Hidrataz Aktivitesi)

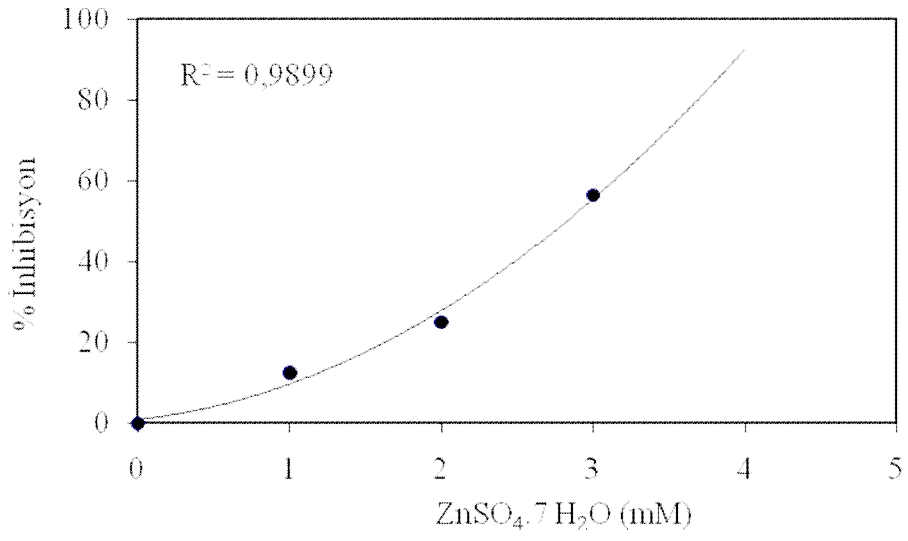




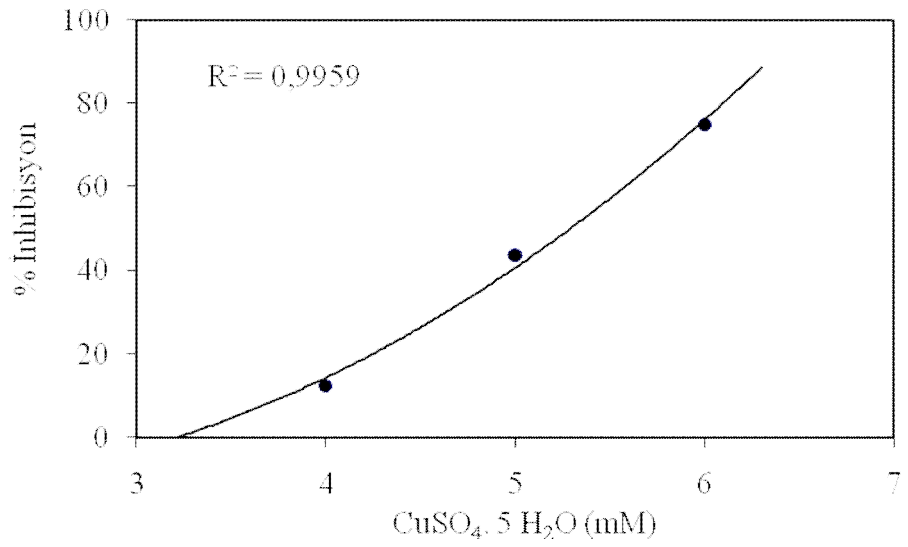
Şekil 22. Asetazolamid inhibisyonu (Esteraz Aktivitesi)



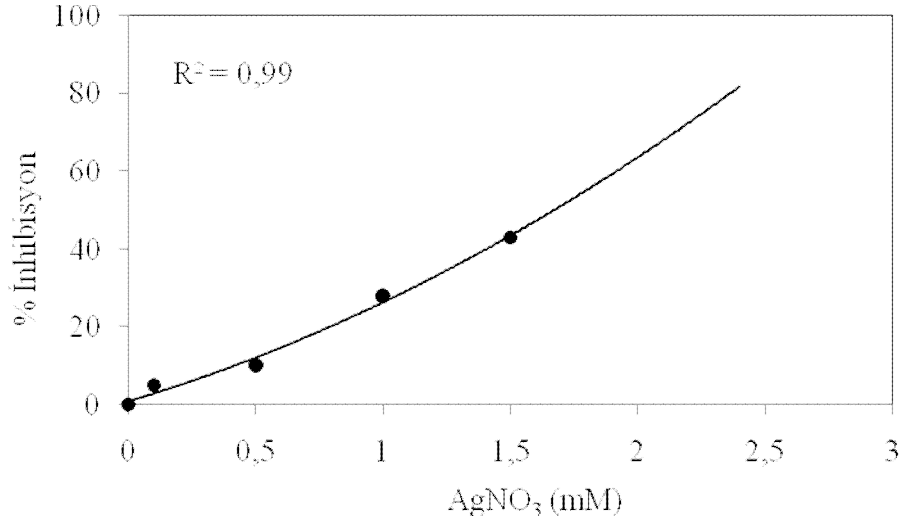
Şekil 23. Sulfanilamid inhibisyonu (Esteraz Aktivitesi)



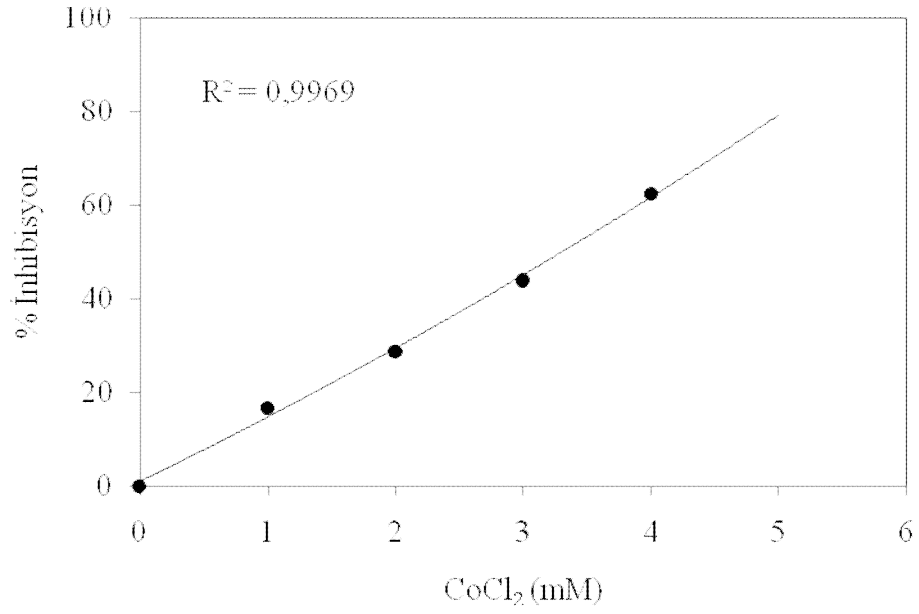
Şekil 24. Zn<sup>+2</sup> inhibisyonu (Esteraz Aktivitesi)



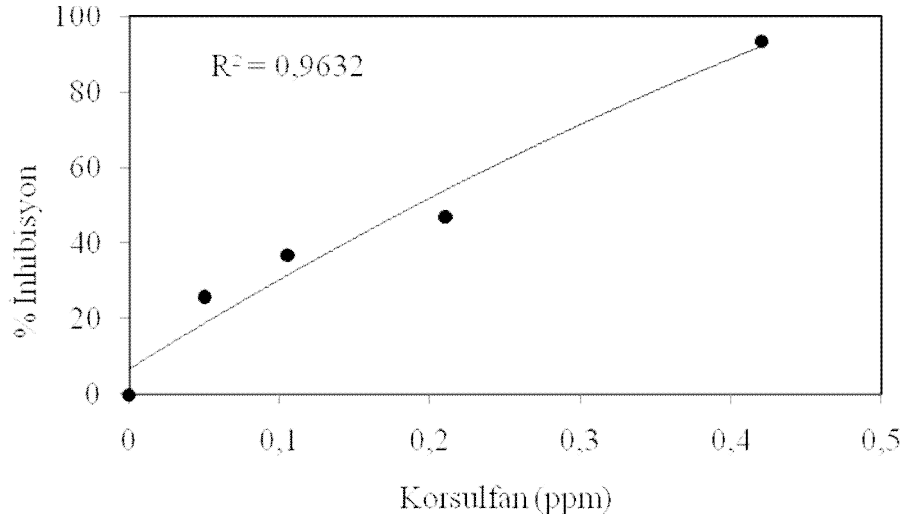
Şekil 25. Cu<sup>+2</sup> inhibisyonu (Esteraz Aktivitesi)



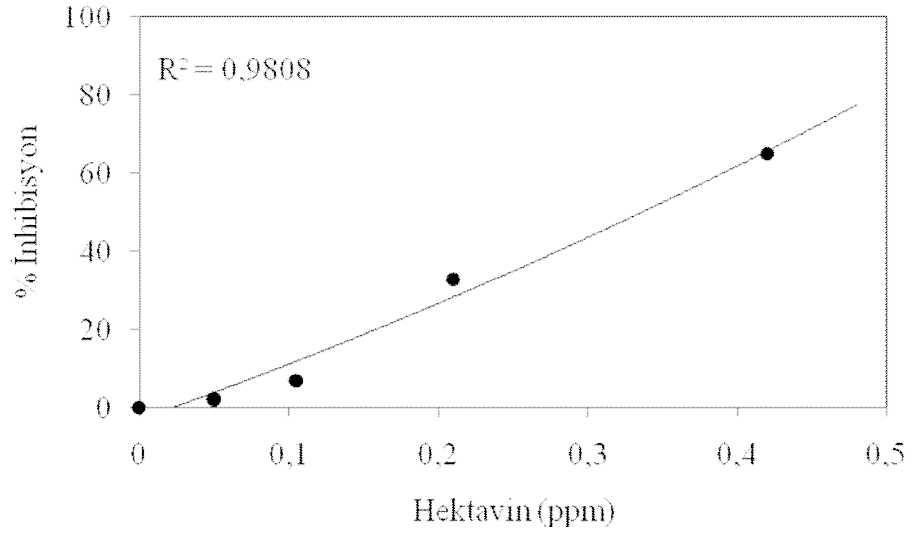
Şekil 26.  $\text{Ag}^+$  inhibisyonu (Hidrataz Aktivitesi)



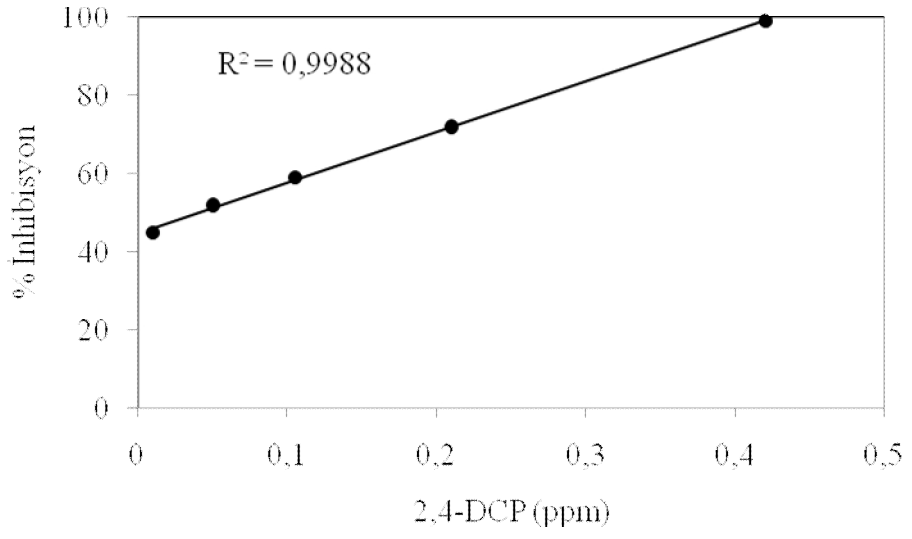
Şekil 27.  $\text{Co}^{+2}$  inhibisyonu (Esteraz Aktivitesi)



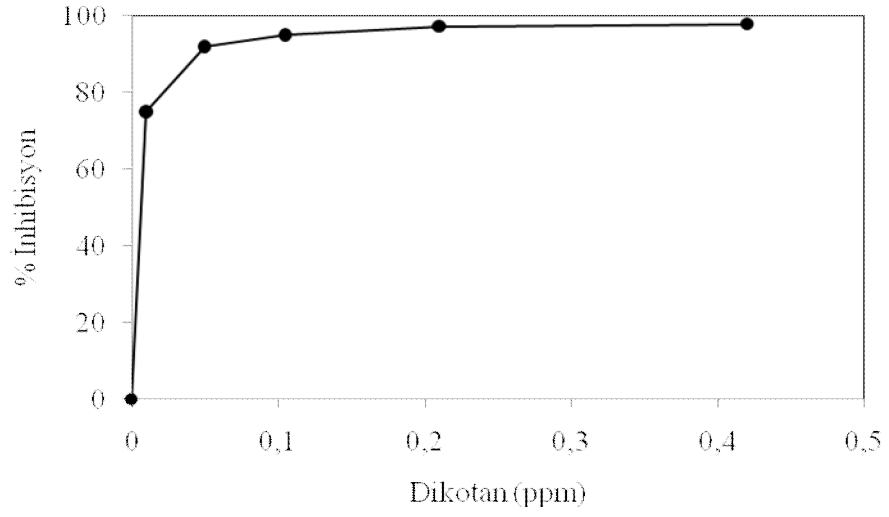
Şekil 28. Korsulfan inhibisyonu ( Hidrataz Aktivitesi)



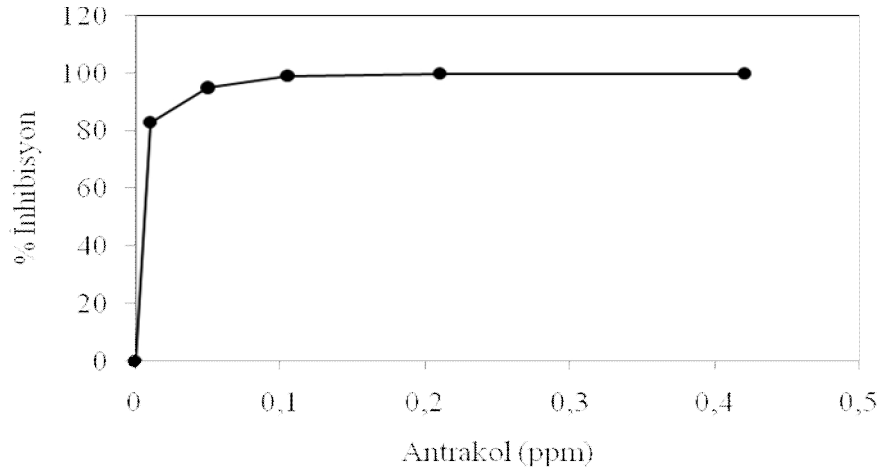
Şekil 29. Hektavin inhibisyonu ( Hidrataz Aktivitesi)



Şekil 30. 2,4-DCP inhibisyonu ( Hidrataz Aktivitesi)



Şekil 31. Dikotan inhibisyonu ( Hidrataz Aktivitesi)



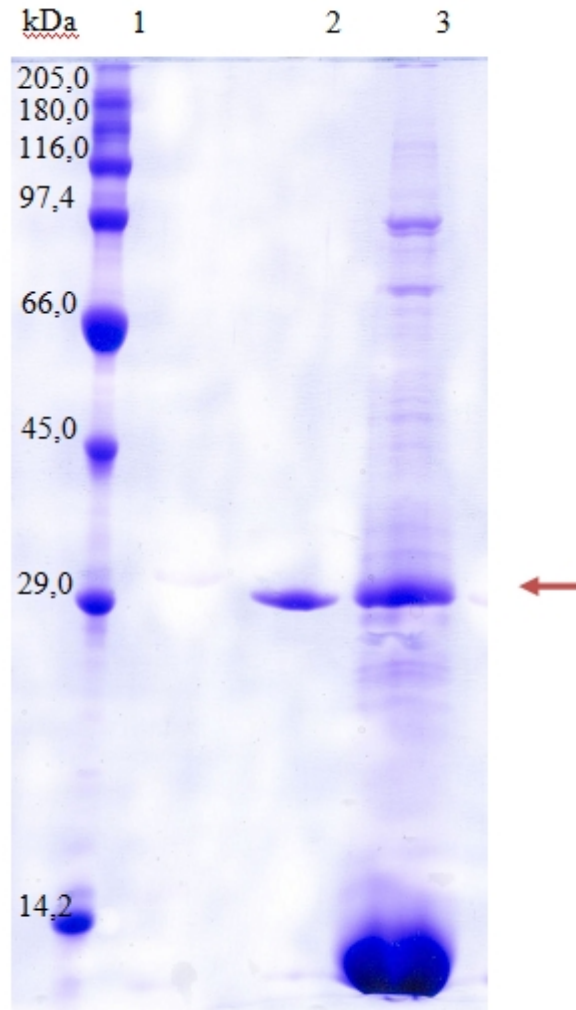
Şekil 32. Antrakol inhibisyonu ( Hidrataz Aktivitesi)

Tablo 9. Karbonik anhidraz için IC<sub>50</sub> inhibisyon değerleri

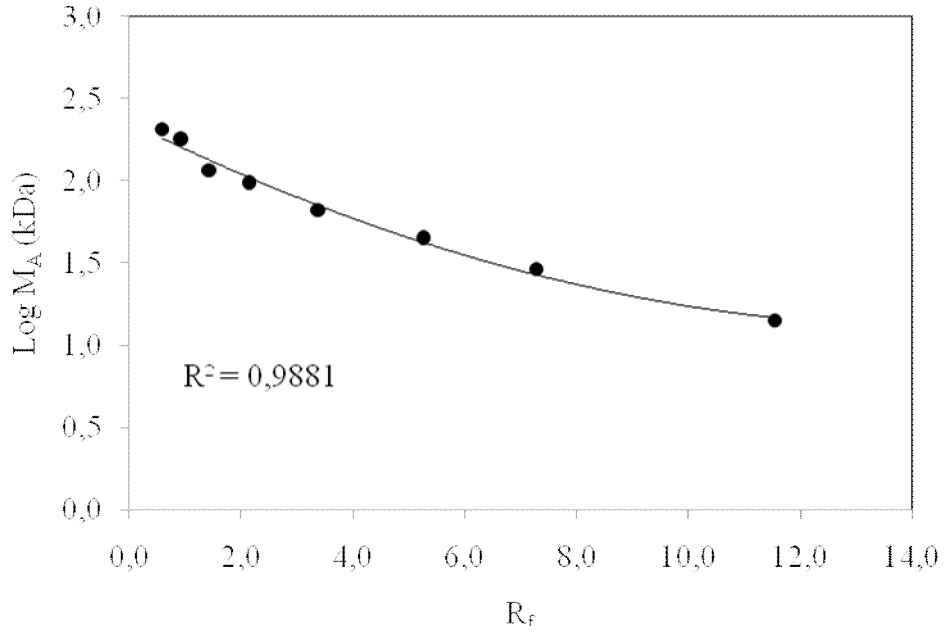
| İnhibitör madde adı                    | IC <sub>50</sub> | Kullanılan yöntem |
|--|------------------|-------------------|
| Asetazolamid                           | 0.1 µM           | esteraz           |
| Sulfanilamid                           | 4,0 µM           | esteraz           |
| ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O  | 2,8 mM           | esteraz           |
| CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O | 5.2 mM           | esteraz           |
| CoCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O   | 3,4 mM           | esteraz           |
| AgNO <sub>3</sub>                      | 1,7 mM           | hidrataz          |
| DMSO                                   | 1,6 M            | hidrataz          |
| 2,4-Diklorofenol (DCP)                 | 0,04 ppm         | hidrataz          |
| Dikotan (fungisit)                     | 0,005 ppm        | hidrataz          |
| Antrakol (fungisit)                    | 0,005 ppm        | hidrataz          |
| Korsulfan (insektisit)                 | 0,3 ppm          | hidrataz          |
| Hektavin (insektisit)                  | 0,8 ppm          | hidrataz          |

### 3.10. SDS-PAGE Elektroforez Bulguları

Enzimin saflığını kontrol etmek, alt birim sayılarını tespit etmek ve molekül kütlesi belirlemek için saflaştırılan enzim molekül ağırlıkları bilinen standart proteinleri ile SDS-PAGE elektroforezine tabii tutulmuştur. Standartların R<sub>f</sub> değerlerine göre yapılan tayinde Mersin balığı eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin molekül kütlesinin 29.0 kDa olduğu bulunmuştur (Şekil 33, Şekil 34).



Şekil 33. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. **1**: Standart proteinler [ $\alpha$ -Lactalbumin, bovine milk (14,2); Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes (29,0); Ovalbumin, chicken egg (45,0 kDa); Albumin, bovine serum (66,0 kDa); Phosphorylase B, rabbit muscle (97,4 kDa);  $\beta$ -Galactosidase, *E. coli* (116,0 kDa);  $\alpha_2$ - Macroglobulin (80,0 kDa); Myosin, Rabbit muscle (205,0 kDa)) **2**: Saflaştırılmış Mersin balığı eritrosit hemolizati, **3**: Eritrosit hemolizati



Şekil 34. SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile mersin balığı eritrosit CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart R<sub>f</sub> grafiği



#### 4. TARTIŞMA

Tüm canlı türlerinde mevcut olan ve üzerinde en çok çalışılan enzim olan Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1), canlı sistemlerde pH, su, elektrolit ve iyon transportu düzenleyicisi olarak rol alan bir enzimdir. Fizyolojik olarak karbondioksidin hidrasyonunu ve bikarbonatın dehidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizler. Enzim hemen hemen bütün dokularda mevcut olup hidrataz aktivitesinin yanında  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  birikiminde de rol almaktadır (Gülçin vd., 2004). Enzimin bitkilerde pH regülasyonun yanında Calvin çevriminde de önemli rol aldığı bilinmektedir (Jebanathirajah ve Coleman, 1998). Karbonik anhidraz I ve II enzimleri insan eritrositlerden izole edilen ilk enzimler olup izolasyonlarında en çok kullanılan yöntem afinite kromatografisidir. İlk defa 1970' lerde uygulanmaya başlanmış olan bu yöntemle sonraları karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir. Omurgalıların eritrositlerinde CA I izoenziminin aktivitesinin CA II' den daha düşük olduğu bildirilmektedir (Gervais ve Tufts, 1999). Ayrıca bu enzimler izoenzimler asetazolamid, iyodat ve bakır gibi inhibitörler tarafından farklı inhibisyona uğrama yönleriyle birbirinden farklılık gösterirler. Omurgalıların çok azının eritrositlerinde tek bir CA izoenzimi bulunur ( Sanyal vd., 1982). Karbonik anhidraz enziminin bugüne kadar 16 tane izoenziminin olduğu bildirilmektedir ve araştırmalar daha fazla izoenziminin olabileceği yönündedir (Esbaugh ve Tufts, 2007).

Karbonik anhidraz tüm omurgalılar gibi balıklarda da, metabolizma sonucu oluşan  $CO_2$ 'nin organizmada taşınmasında ve atılmasında çok kritik önemi olan bir enzimdir. Omurgalıların çoğunda kan  $CO_2$  hemen hemen aynı yolla taşınır ve atılır. Dokudan konsantrasyon gradientine göre diffüze olan  $CO_2$  eritrositlere girer ve orada  $HCO_3^-$  ve  $H^+$  ya CA tarafından katabolize olur. Oluşan protonların büyük kısmı Hb tarafından alınır(tamponlanır). Oluşan bikarbonat anyonlarının çoğu plazmadaki klorür iyonları ile pasif transportla hücre dışına çıkartılır. Dokudan organa  $CO_2$ ' in çoğu plazmada  $HCO_3^-$  olarak taşınır ve bu çevrim genel olarak dönüşümlüdür. Kan  $CO_2$ 'in transportunda iki önemli ajan eritrosit karbonik anhidrazı ve bant 3 adı verilen klorür-bikarbonat transport sistemidir. Omurgalıların çoğunda, kanda CA aktivitesi eritrositlerden ileri gelmektedir. Kan plazmasında CA aktivitesi yokluğunun plazmada herhangi bir CA inhibitörünün varlığından ileri geldiği düşünülmektedir (Gervais ve Tufts, 1999).

Karbonik anhidraz canlılar için hayati öneme sahip bir enzimdir. Enzim her canlı ve dokuda farklı izoenzime ve farklı kinetik özelliklere sahip bulunmaktadır. Enzimin canlı organizmada nerelerde ve hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl fonksiyon gösterdiğini belirlemek için her canlı türünde ve dokularında ayrı ayrı CA' nın saflaştırılıp karakterizasyonu üzerine binlerce çalışma bulunmaktadır. Ancak Mersin balığı eritrosit ve diğer dokularında bugüne kadar CA enziminin saflaştırılması ve karakterize edilmesi üzerine çalışmaya rastlanılmamaktadır. Literatürde CA aktivitesi en çok çalışılan balık gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) olup değişik dokularından CA izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Soyut ve Beydemir 2008). Gökkuşağı alabalığı bir tatlı su balığı olup, kültür balıkçılığı en çok yapılan balık türü olmasından dolayı, enzim çalışmalarında çok tercih edilmektedir.

Bu nedenle çalışmamızın amacı Mersin balığı eritrositlerindeki CA' nın yapısal ve kinetik özelliklerini incelemektir. Çalışmada mersin balığı dokularından balığı öldürmeden alabileceğimiz tek doku eritrosit dokusu olduğu için sadece eritrosit karbonik anhidrazı çalışılmıştır. Mersin balığı hem tatlı suda hem tuzlu suda yaşayabilen ve avcılığı yasak olan bir balık türüdür. Balık numuneleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi tarafından koruma altına alınan ve araştırma amaçlı bakılan balıklardan alınmıştır. Hafif anestezi (benzokain) uygulanan 15 adet mersin balığının kuyruk altından kalın enjektörle alınan balık kanı eritrositleri serum fizyolojik ile 3 kez yıkanmış ve eritrositler saf su ile hemoliz edilmiştir. Daha sonra 20.000 rpm' de 40 dakika soğutmalı santrifüjle santrifüj yapılarak eritrosit dışındaki partiküller çöktürülmüştür. CA enzimi mersin balığı eritrositlerinden Afinite Kromatografi ile saflaştırılmıştır ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. CA' nın saflaştırılmasında afinite kromatografisi dışında başka saflaştırma yöntemleri de bulunmaktadır ancak sülfanilamid takılı Sepharoz-4B kolunu kullanılarak yapılan saflaştırma yöntemi basit, kullanışlı ve yüksek verime sahip olması gibi özellikleri bakımından çok tercih edilmektedir (Hall ve Schaer, 1983). Nitekim CA metal afinite kromatografisi ile de Sepharose–iminodiacetate (IDA)-Zn<sup>2+</sup> kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır (Banarjee, 2004). Hazırlanan afinite kolonunda syanojen bromür ile aktive edilmiş Sepharoz-4B matriksine önce uzantı kolu olarak L- tirozin ve sonra sülfanilamid takılmıştır. Daha sonra dengeleme tamponu olarak 25 mM Tris/0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.7 geçirilmiştir. Eritrosit hemolizatında bulunan CA' lar kolona tutunduktan sonra CA dışında bulunan tüm kirlilik yıkama tamponu ile uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi hemoglobinin rengi 280 nm' de absorbanısı 0.02' nin altına ininceye kadar devam etmiştir.

Karbonik anhidraz elüsyon çözeltisiyle sonra CA' nın elüsyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yıkama çözeltisinde de hidrataz aktivitesine bakılmıştır ve CA aktivitesine rastlanılmamıştır. Elüsyon tamponu olarak pH 5.6'da 0.1 M CH<sub>3</sub>COONa/ 0.5 M NaClO<sub>4</sub> tampon kullanılmıştır. Elüsyonlar 5 ml' lik fraksiyonlar halinde fraksiyon kollektörde toplanılmıştır. Toplanan elüatlarda önce protein tayini Warburg yöntemine göre 280 nm' de absorbans okunarak sonra Bradford yöntemine göre Coomassie Brilliant Blue G-250 ile yapılmıştır (Şekil 14). Tüm tüplerde hidrataz aktivitesine bakılmıştır (Şekil 13). Daha sonra protein miktarı yüksek olan tüplerle hidrataz aktivitesi yüksek olan tüpler birleştirilmiştir. En yüksek protein miktarını ve en yüksek CA aktivitesine sahip tüpler tespit edildi ve spesifik aktiviteler ölçüldü. Daha sonra spesifik aktiviteler yüksek olan tüpler birleştirilerek son spesifik aktivite tespit edilerek saflaştırma tablosu hazırlanmıştır (Tablo 6). CA enzimi balık kanına göre yaklaşık 539 kat saflaştırıldı. Aynı saflaştırma yoluyla yapılan başka çalışmalarda karbonik anhidraz keçi (*Capra hircus*) eritrositlerinde 262 kat (Sinan vd. 2007), alabalık karaciğerinde 2260 kat (Soyut ve Beydemir, 2008), gökkuşacağı alabalık solungaçlarında 104.8 kat (Hisar vd., 2006) ve insan eritrositlerinden 646 kat (Hisar vd., 2003) saflaştırmışlardır. Literatürde mersin balığından CA saflaştırılması çalışmasına rastlayamadığımız için bulgularımızı karşılaştırma imkanımız olmamaktadır.

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde iki yöntem kullanılmıştır. Enzimin fizyolojik substratı olan CO<sub>2</sub>' nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> iyonunundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanan hidrataz yöntemi (Wilbur ve Anderson, 1948) kullanılmıştır. Diğer yöntem ise esteraz aktivitesi olup CA'nın ester bağı koparması esasına dayanmaktadır. Enzimin *p*-nitrofenil asetatı *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz etmesi sonucu 348 nm' de absorbans değişimi takip edilmektedir (Verpootre ve Mehta, 1967). CA'nın karakterizasyon çalışmalarında önce Michaelis-Menten sabitleri belirlenmiştir. Değişik substrat konsantrasyonlarında esteraz aktivitesi ölçülerek ve değişen substrat konsantrasyonuna karşı hız Michaelis-Menten (Şekil 18) ve Lineweaver-Burck' e (Şekil 20) göre çizilmiştir. Grafiklerden saflaştırılmış enzimin pH= 9.0 ve 30 ° C' de *p*-nitrofenil asetata karşı K<sub>m</sub> değeri 4 mM ve V<sub>max</sub>' sı ise 20 mM/dakika olarak tespit edilmiştir. Turna balığı eritrosit CA'sının *p*-nitrofenilasetat için K<sub>m</sub> değerinin 8.4 mM olduğu rapor edilmiştir (Gervais vd. 1999). Gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinden saflaştırılan CA' nın K<sub>m</sub> değerinin 0.66 mM (Soyut ve Beydemir, 2008),

solungaçlarından saflaştırılan CA' nın  $K_m$  değerinin 8.13 mM (Hisar vd., 2006) olduğu bildirilmektedir. *p*-nitrofenil asetata karşı bulduğumuz  $K_m$  değerlerinin literatürdeki diğer CA' ların  $K_m$  değerlerinden biraz yüksek olduğu görülmüştür. Bunun anlamı mersin balığı eritrosit CA sınıfının *p*-NPA' a karşı ilgisinin az olduğudur. Nitekim enzim saflaştırma tablosu hazırlanırken de enzimin aktivitesi doğal substratı olan CO<sub>2</sub> kullanılarak da (hidrataz aktivitesi) ölçülmüştür.

Daha sonra enzimin saflığını ve molekül kütesini belirlemek için sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Molekül ağırlığı bilinen standart proteinler kullanılarak tayin yapılmıştır (Şekil. 4.21). Rf değerleri tespit edilerek log  $M_k$ -Rf standart grafiği çizilerek (Şekil 32) ve molekül ağırlığı tespit edilmiştir. Elektroforez bulgularına göre enzimin yaklaşık molekül ağırlığının 29.0 kDa olduğu tespit edilmiştir. Zebrafish (*Danio rerio*) balığında yapılan bir çalışmada bizim bulgularımıza benzer şekilde balığın eritrosit CA' sınıfının 29 kDa ağırlığında ve tek alt birimden oluştuğu bildirilmektedir (Peterson vd. 1997). Nitekim yapılan başka çalışmalarda CA' nın molekül ağırlığını SDS-PAGE' e göre alabalık karaciğerinde 29.4 kDa ve jel filtrasyon tekniğine göre ise 3.0 kDa olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Soyut ve Beydemir, 2008). Yapılan bir başka çalışmada yine Gökkuşluğu alabalık solungaçlarından izole edilen CA' nın molekül ağırlığının SDS-PAGE ile 28.0 kDa ve jel filtrasyon kromatografisi ile 27.0 kDa ağırlığında olduğu bildirilmektedir (Hisar vd., 2006). Mersin balığı eritrositlerinden saflaştırılan enzimin optimum pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değerlerini belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Enzimin esteraz aktivitesine göre pH 9.0' da maksimum aktivite gösterdiği bulunmuştur. CA' nın esteraz aktivitesi klasik olarak pH 7.0 ölçülmektedir. Saflaştırmadan hemen sonra yapılan aktivite çalışmasında enzimin sadece hidrataz aktivitesi gösterdiği ve fakat esteraz aktivitesini pH 7.0' de göstermediği görülmüştür. Ancak daha sonra pH 9.0' da çalışıldığında esteraz aktivitesinin olduğu belirlenmiş ve optimizasyon çalışmalarına bu pH' da devam edilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde Soyut ve Beydemir (2008) gökkuşluğu alabalığında CA aktivitesini pH 9.0' da; Demir vd., (2005) sığır mide iç duvarı CA' sınıfını pH 7.5 de; Hisar vd., (2006) gökkuşluğu alabalık solungaçlarında pH 9.5' da ölçmüşlerdir. CA II, III, IV, V ve VII izoenzimlerinde pH 8' in üzerine çıkıldığında hidrataz aktivitesinin arttığı ve bu artışın pH 8.0' de proton alıcı olarak rol alan amino asit residülerinin varlığından ileri geldiği bildirilmektedir (Qian vd., 1999).

Enzimin molekülü tarafından 1 saniyede ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısına  $k_{cat}$  adı verilir. Turnover sayısı olarak bilinen bu değer enzimin etkinliğini göstermektedir (Nelson ve Cox, 2005).  $k_{cat}$  değeri bazı kitaplarda  $K_3$  olarak da adlandırılmaktadır. Eğer bir reaksiyonda birden fazla basamak varsa ve bu basamaklardan bir tanesi hız sınırlayıcı basamak ise  $k_{cat}$  bu hız sabitine eşittir. Mersin balığı eritrosit CA' sının *p*-nitrofenilasetat substratı için  $k_{cat}$  değeri  $k_{cat} = V_{max}/E_T$  formülüne göre hesaplanmıştır ve  $20,8 \text{ s}^{-1}$  olarak bulundu.

Mersin balığı eritrosit CA' sı için bulunan  $k_{cat}$  değeri fizyolojik olmayan bir substrat olan *p*-nitrofenil asetat için düşük bulunmuştur. Literatürde değişik kaynaklardan saflaştırılan CA nın  $k_{cat}$  değerleri ise gökkuşuğu alabalık karaciğer CA' sında *p*-nitrofenol için  $32,8 \text{ s}^{-1}$  (Soyut ve Beydemir, 2008), turna balığı (*Amia cavla*) eritrositlerinde  $\text{CO}_2$  kullanarak hidrataz aktivitesine karşı bulunan  $k_{cat}$  değeri  $5,1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  bulunduğu (Gervais vd. 1999) bildirilmektedir.

Genel olarak CA' nın daha çok tek alt birim halinde bulunduğu fakat bazı kaynaklarda birden fazla alt birim içerdiği bildirilmektedir. Nitekim insan ve sığır eritrositlerinde bulunan CA' nın tek alt birimden, köpek balığında ise molekül ağırlığı 36,0 kDa ve 40,0 kDa olan iki alt birimden (Maynard ve Coleman, 1971), kloroplastlarda bulunan CA' nın altı alt birimden oluştuğu bildirilmektedir (Özdemir vd. 1997). Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık değerini belirlemek için  $15^\circ \text{C}$  - $55^\circ \text{C}$  arasındaki sıcaklıklarda, her  $5^\circ \text{C}$ ' de bir sıcaklığı artırmak suretiyle ölçüm yapılmıştır. Enzimin optimum sıcaklığının  $30^\circ \text{C}$  olduğu belirlenmiştir. CA enzimi optimum sıcaklığı değişik canlı organizmalarda ve dokularda değişim göstermektedir. Soyut (2006)' da gökkuşuğu alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularında optimum sıcaklığın  $40^\circ \text{C}$  olduğunu, alabalık göz lenslerinde optimum sıcaklığın ise  $22,5^\circ \text{C}$  olduğunu tespit etmişlerdir (Hisar vd., 2006).

Saflaştırılan enzimin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddeti tespit etmek için 0,1 M ve 1 M' lık Tris- $\text{SO}_4$  tamponları kullanılmıştır ve 0,05 M lık Tris- $\text{SO}_4$  tamponunda en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil.4.6). Beydemir vd. (2006)' da gökkuşuğu alabalık göz lensinde 0,025 M Tris- $\text{SO}_4$  tamponunda ve  $\text{pH}=7,2$  olarak tespit etmişlerdir.

İnsan CA-II inhibitörleri bugün klinikte glom kom tedavisinde ve CA-XII inhibitörleri kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Sülfanilamid ve asetazolamid en yaygın kullanılan inhibitörlerdir (Innocenti vd., 2007). Çalışmada mersin balığından saflaştırılan CA enzimi

üzerine inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. İnhibisyon değerleri sadece enzimi % 50 inhibe eden inhibitör madde miktarı cinsinden  $IC_{50}$  olarak tespit edilmiştir. Yeterince fazla miktarda saf enzim elde edilemediğinden inhibisyon sabiti  $K_i$  değerleri tespit edilememiştir. Dolayısıyla inhibisyon tipi belirlenememiştir. Değişik inhibitör madde konsantrasyonlarında çalışma yapmak suretiyle  $IC_{50}$  değerleri tespit edilmiştir.  $IC_{50}$  değeri literatüre çok yaygın şekilde kullanılan bir değer olup, yüksek  $IC_{50}$  değeri düşük inhibisyonu ve düşük  $IC_{50}$  değeri ise yüksek inhibisyon varlığını göstermektedir. Enzimin klasik inhibitörleri olan sülfanilamid ve azolamid için bulunan  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 0,1 mM ve 3.94 mM olup esterez aktivitesine göre tespit edilmiştir. Gökkuşığı alabalığında yapılan bir çalışmada sülfanilamid için  $K_i$  değerinin 3.94 mM olduğu ve yarışmasız inhibitör olduğu bildirilmektedir (Hisar, 2006). CA enziminin çevre kirliliği oluşturan unsurlara karşı rolünü tespit etmek amacıyla bazı ağır metal iyonlarına ve pestisitlere karşı aktivitesi ölçülmüştür. Çalışmada sınırlı sayıda ağır metal tuzu kullanmamızın sebebi ağır metal tuzlarının suda çözünmeşi ve enzim çözeltisine ilave edildiğinde çökelek oluşturmalarından ileri gelmektedir. Örneğin Alüminyum tuzları deney ortamına ilave edildiklerinde çökelek oluşturmuşlardır.  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve  $Ag^{+}$  tuzlarının değişen konsantrasyonlarda (sırasıyla 2.8 mM, 5.2 mM, 3.4 mM ve 1.7 mM) inhibisyon yaptığı esterez aktivitesine göre tespit edilmiştir. Gökkuşığı alabalığında yapılan bir çalışmada  $Co^{+2}$ , nin yarışmasız,  $Cu^{+2}$ , nin yarışmalı,  $Zn^{+2}$ , nin yarı yarışmalı,  $Ag^{+}$ , nin yarışmasız inhibisyon gösterdiği bildirilmektedir (Söyüt, 2006). Christensen ve Tucker (1976)' da balıklar üzerine yaptıkları çalışmada  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının CA' yı yaklaşık  $10^{-6}$  M gibi çok düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiğini bildirmektedirler. Rainbow trout karaciğer CA' sında yapılan çalışmada  $IC_{50}$  değerleri  $Co^{+2}$  için 0.05 mM,  $Cu^{+2}$  için 30 mM,  $Zn^{+2}$  için 47.1 mM ve  $Ag^{+}$  için 0.01 mM olarak bulunmuştur (Soyut ve Beydemir, 2008). Bunun yanında insan CA II' sında yapılan çalışmada  $Co^{+2}$  ve  $Hg^{+2}$  iyonlarının yüksek konsantrasyonlarda ( $K_i$  3.91 ve 1.42) inhibisyon gösterdiği bildirilmektedir (Ekinci, vd. 2007). Metal iyonları gibi ağır metal iyonları düşük miktarlarda zararsız olabilirken yüksek miktarlarda çok ciddi tahriplere yol açabilmektedirler. Her iyon her canlıda farklı konsantrasyonlarda inhibisyon gösterebilmektedir. Ağır metal iyonları, özellikle proteinlerin sistein-SH, tirozin-OH ve arginin, guanidin gibi fonksiyonel gruplarına etki ederek proteinlerin yapısını değiştirebilmektedirler. Özellikle enzimlerin aktif merkezlerinde yer alan sistein amino

asitleriyle ağır metal iyonları birleşerek merkaptan bileşikleri oluşturmak suretiyle enzim aktivitesinde kaybolma gözlenir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Pestisitler genel olarak zararlı organizmaları ortadan kaldırmak ya da mücadele etmek için kullanılan çeşitli kimyasal maddelerdir. Organofosfatlı, klorofenol ve karbamatlı bileşikler olan pestisitler genel olarak toksik özelliğe sahip olup sadece zararlı organizmaları değil diğer canlılara da etki etmektedirler. Pestisitler ağır metaller gibi doza bağlı olarak etki gösteren maddelerdir. Bazıları çok düşük konsantrasyonlarda toksik etki gösterirken bazıları ise yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiye sahiptirler (Isık, 2004). Çalışmamızda herbisit, insektisit ve fungusit olarak çok sık kullanılan 5 ayrı pestisit Mersin balığı CA'sı üzerine etkisi incelenmiştir. Suda çözünmeyen ve diğer çözücülerde çok zor çözünen pestisitler DMSO'de çözülmüştür. CA'nın pestisit inhibisyon çalışması hidrataz aktivitesine göre tayin edilmiştir ve DMSO'ün CA'ya % inhibisyon değeri pestisit % inhibisyon değerinden çıkarılarak hesaplamalar yapılmıştır. Yani çözücü körü kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan pestisitlerin molekül ağırlıkları tam olarak tesbit edilemediğinden IC<sub>50</sub> değerleri ppm (mg/mL) cinsinden hesaplanmıştır. Sonuç olarak 2,4-diklofenol, Korsulfan™ ve Hektavin™, Dikotan™ (dithiocarbamate) ile Antracol™ (N,N'-(1,2-Propylen) thioharnstof) maddelerinin inhibitör olarak rol oynadıkları görülmüştür. Dikotan ve antrakol çok düşük konsantrasyonlarda da inhibitör etkisi göstermiştir (IC<sub>50</sub> 0.05 ppm). 2,4 diklorofenolün Mersin balığı CA'sı üzerinde etkili bir inhibitör olduğu daha sonra sırasıyla korsulfanın ve hektavinin etkili olduğu bulunmuştur. *Oncorhynchus mykiss* ve *Cyprinus carpio carpio*' dan elde edilen CA' larda değişik türde pestisitlerin değişen oranlarda CA' yı inhibe ettikleri bildirilmektedir (Doğan, 2005). Bir keçi türü olan (*Capra hircus*) eritrositlerinden saflaştırılan CA' da yapılan çalışmalarda Nuarimol™, Fenarimol™ ve 2,4- diklofenol pestisitlerinin IC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 0.352, 0.924 ve 2.04 mM olduğu, enzimi inhibe ettikleri ancak paration-metilin ise tersine enzimi aktive ettiği bildirilmektedir (Sinan vd. 2007).

Ağır metal iyonları ve pestisitler önemli derecede çevre kirliliği oluşturan ajanlardır. Yapılan çalışmada mersin balığından izole ettiğimiz eritrosit CA' sı üzerinde çeşitli metal iyonları ve pestisitlerin inhibitör madde olarak etki gösterdikleri görülmüştür.

## 5. SONUÇLAR

Tatlı su ve tuzlu suda yaşayabilen bir balık türü olan ve nesli giderek azalan Mersin balığı (acipenser gueldenstaedti) eritrositlerinden Afinite kromatografisi yöntemine göre karbonik anhidraz enzimi ilk kez saflaştırılmıştır. CA kinetik özellikleri ve çevre kirletici bazı ajanlara karşı ilgisi çalışılmıştır. Sepharose 4B affinite kolonundan enzim balık kanına göre 539 kat saflaştırılmıştır ve molekül kütesinin SDS- PAGE elektroforezine göre 29 kDa olduğu tespit edilmiştir. Enzimin *p*-nitrofenil asetat substratına karşı  $K_m$  değeri 4 mM ve  $V_{max}$  değeri ise 20 mM/ dak. olarak tespit edilmiştir. Enzimin pH 9.0'da, 30 °C' de, 0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> tamponunda optimum aktivite değerlerine sahip olduğu ve  $k_{cat}$  değerinin 20.8 s<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Enzimin klasik inhibitörleri olan sülfanilamid ve asetazolamid inhibitörlerine karşı bulunan IC<sub>50</sub> değerleri literatürle uyumlu olup 4.0 µM ve 0.1 µM olarak tespit edilmiştir. CA' nın tek bir alt birimden oluştuğu, 29 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu, fizyolojik substratının CO<sub>2</sub> olduğu ve *p*-NFA karşı ilgisinin nisbeten düşük olduğu, enzimin klasik inhibitörleri sülfanilamid, asetazolamid yanında ağır metal iyonları ile bazı pestisitler tarafından da inhibisyona uğradığı bulunmuştur. Enzimin Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> ve Ag<sup>+</sup> ağır metal iyonları ve pestisitler tarafından inhibisyona uğradığı tesbit edilmiştir. Enzimin Türkiye'de sıkça kullanılan bazı pestisitler (2,4-dikloföfenol, Korsulfan™, Hektavin™, Dikotan™ ve Antracol™) tarafından inhibe olduğunun tespiti önem taşımaktadır. Bu da nesli tükenmekte olan Mersin Balıklarının korunması açısından önem taşımaktadır.



## 6. ÖNERİLER

CA enzimleri insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim özelliğindedir. Asetazolamid, brinzolamid, dorzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçların karbonik anhidrazların inhibitörleri olduğu bilinmektedir (Bülbül vd., 2002). Mersin balığı eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması çalışmasında amaçlardan biri de böyle bir çalışma yapmaktır. İnsanlarda glukoma göz rahatsızlığının tedavisinde de CA inhibitörlerinin kullanıldığı bilinmektedir (Gülçin vd., 2004).

Bunların yanı sıra pek çok kimyasal maddenin, enzimin aktivitesini azalttığı hatta durdurduğu bilinmektedir. Bu çalışmada enzimin mersin balığından afinite kromatografisi ile saflaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca enzimin inhibisyonu incelenecektir. Nihai hedef ise bulunması beklenen inhibitör maddelerin tıbbi alanlarda da kullanılabilmesidir.

Mersin balığı eritrositlerinden ilk kez saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin sadece eritrositlerde değil aynı zamanda da karaciğer, böbrek, kas ve solungaç dokularından da saflaştırılıp kinetik özelliklerinin aydınlatılması, enzimin alt birim sayısının doğal elektroforetik yöntemler kullanılarak aydınlatılması, enzimin gerçek molekül kütlesinin tespiti için jel filtrasyon kromatografisinin de uygulanması, eritrositlerin yıkanması esnasında elde edilen plazmanın başka balık çalışmalarındakine benzer şekilde inhibisyon etkisinin olup olmadığının araştırılması, çevresel kirlilik oluşturan çeşitli deterjan, gübreler ve sanayi atıklarında CA inhibisyonu araştırılması, eritrositlerde CA' dan başka enzimlerin de saflaştırılıp kinetik özelliklerinin ortaya konmaları başka yüksek lisans ve doktora tezlerine konu olabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Acierno, R., Maffia, M., Rollo, M. ve Storelli, C., 1997. Buffer Capacity in The Blood of the Hemaglobinless Antarctic Fish *Chionadraco Hamatus*, Comp. Biochem. Physiol, 118, 989-992.
- Alber, B. E. ve Feery J. G., 1994. A Carbonic Anhydrase from the Archaeon *Methlinsarcina Thermophila.*, Proc. Nati. Acad. Sci.,91, 6909-6913.
- Albert L., 1988. Lehninger Biochemistry, Worth Publishers Inc., New York.
- Aras, K. ve Erşen G., 1988. Klinik Biokimya, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd., Ankara.
- Armstrong, J. M., Myers, D.V., Verporte, J.A. ve Edsall, J.T., 1966. Purification and Properties of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases, The Journal of Biological Chemistry, 241, 5137-5145.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 1996. A New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase İsozymes by Affinity Chromatography, Turkish Journal Of Medical Sciences, 26, 163-166.
- Banerjee, A. L., Swanson, M., Mallik, S. ve Srivastava, D.K., 2004. Purification of Recombinant Human Carbonic Anhydrase-II by Metal Affinity Chromatography without Incorporating Histidine Tags, Protein Expression And Purification, 37, 2, 450-454.
- Becker, B., 1954. Decrease in İntraocular Pressure in Man by a Carbonic Anhydrase İnhibitor (Diamox), Am. J. Ophthalmol., 37, 13-17.
- Beydemir, Ş., Çiftçi M., Özmen, İ., Büyük, M., Özdemir, H. ve Küfrevioğlu Ö.İ., 2000. Effects of Some Medical Drugs on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes in Vitro and Fro Rat Erythrocytes Invivo, Pharmacological Research, 42, 185-191.
- Bradford Marion M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Brauner, C. J. ve Randall, D. J., 1998. The Linkage Between Oxygen and Carbon Dioxide, In Fish Physiology, 17, 283-319.
- Bülbül M., Saraçoğlu N., Küfrevioğlu İ. ve Çiftçi M., 2002. Bile Acid Derivatives of 5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as New Carbonic Anhydrase İnhibitors: Synthesis and Investigation of İnhibition, Bioorganic and Medical Chemistry, 10, 2561-2567.

- Bülbül, M. Hisar , O., Beydemr, B., Çiftçi, M. ve Küfreviölu, Ö.İ., 2003. The in Vitro and in Vivo Inhibitory Effects of Some Sulfonamide Derivatives on Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Erythrocyte Carbonic Anhydrase Activity, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 18, 4, 371–375.
- Champe, P.C., 1987. Lippincott's Illustrated Reviews, Biochemistry, J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Coleman, J.E., 1967. Mechanism of Action of Carbonic Anhydrase Substrate, Sulfonamide and Anion Binding, The J. of Biological Chemistry, 242 , 6212-5219.
- Czaplicka, M., 2003. The Science of the Total Environment, 332, 21- 39.
- Demir N., Demir Y. ve Coşkun F., 2000. Purification and Characterization of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocyte Plasma Membrane, Turk J Med Sci, 31, 477-482.
- DeVoe, H. ve Kistiakowsky, G. B.,1961. The Enzyme Kinetics of Carbonic Anhydrase from Bovine and Human Erythrocytes, J. Am. Chem. Soc., 83, 274-280.
- Doğan, S., 2005. The in Vitro Effects of Some Pesticides on Carbonic Anhydrase Activity of *Oncorhynchus Mykiss* and *Cyprinus Carpio Carpio* Fish, Journal of Hazardous Materials, A132, 171–176.
- Ekinci, D., Beydemir, Ş. ve Küfrevioğlu Ö.İ., 2007. In Vitro Inhibitory Effects of Some Heavy Metals on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 22, 6, 745–750.
- Esbaugh, A.J. ve Tufts, B.L., 2007. Evidence for a Carbonic Anhydrase-Related Protein in The Brain of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*), Comp. Biochem. Physiol, Part D, 2, 287–294.
- Gervais, M.R. ve Tufts, B. L., 1999. Characterization of Carbonic Anhydrase and Anion Exchange in The Erythrocytes of Bowfin (*Amia Calva*), A Primitive Air-Breathing Fish, Comp. Biochem. Physiol, Part A 123, 343–350.
- Gözükara, E.M., 1990. Biyokimya, Ofset Pepianat Ltd. Şti., Ankara.
- Gülçin, I., Beydemir, S. ve Büyükkokuroğlu, M.E., 2004. In Vitro And in Vivo Effects of Dantrolene on Carbonic Anhydrase Enzyme Activities, Biol. Pharm. Bull, 27, 613-616.
- Hage, D., 2006. Handbook of Affinity Chromatography–Chromatographic Science Series, 92, 944.
- Hall, G.E. ve Schraer, R., 1983. Characterisation of a High Activity Carbonic Anhydrase Isozyme Purified from Erythrocytes of *Salmo Gairdneri*, Comp. Biochem. Phys., 75B, 81-92.

- Haris, E. ve Angal, S., 1990. Protein Purification Applications: a Practical Approach, Oxford University Pres, 179.
- Hisar, O., 2002. Gökkuşığı Alabalık Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Antibiyotiklerin Enzim Aktivitesine Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Fen-Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Hisar, O., Hisar, Ş.A., Küfrevioğlu Ö.İ. ve Yanık, T., 2003. Inhibitory Effects of Some Antibiotics on Activity of Carbonic Anhydrase from Rainbow Trout Erythrocytes in Vitro and in Vivo. Journal of Aquatic Animal Health, 15, 3, 221-228.
- Hisar, O., Beydemir, Ş., Bülbül, M. ve Yanık, T., 2006. Kinetic Properties of Carbonic Anhydrase Purified from Gills of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Journal of Applied Animal Research, 30, 2. 185-188.
- Innocenti, A., Vullo, D., Pastorek, J., Scozzafava, J., Pastorekova, S., Nishimoric, I. ve Supuran, C. T., 2007. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Transmembrane Isozymes XII (Cancer-Associated) and XIV with Anions, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 17, 1532–1537.
- Innocenti, A., Zimmerman, S., F., Scozzafava, A. ve Supuran, C.T., 2004. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Inhibition of the Zinc and Cobalt C-Class Enzyme from the Archaeon *Methanosarcina Thermophila* with Anions, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 14, 3327–3331.
- Isık, S. Kockar, F., Ozensoy, O. ve Arslan, O., 2004. Diverential in Vitro Effects of Some Pesticides on CA Activities from Some Freshwater and Seawater Fish Erythrocytes, Fresen. Environ. Bull., 13, 1, 25–29.
- Jebanathirajah J.A. ve Coleman, J.R., 1998. Association of Carbonic Anhdrase with a Calvin Cycle Enzyme Complex in *Nicotiana Tabacum*, Planta, 204, 177-82.
- Kaur, P.I., Smitha, R., Aggarwal, D. ve Kapil, M., 2002. Acetazolamide: Future Perspective in Topical Glaukoma Therapeutics, International Journal of Pharmaceutics, 248, 1-14.
- Kayaalp, S.O., (Editör ), 2002. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10. Baskı, Hacettepe Taş, Ankara.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ., 2000. Biyokimya, İkinci Baskı, Aktif Yayınevi, 634 s.
- Kernohan, J. C., 1964. The Activity of Carbonic Anhydrase in İmidazole Buffers, Biochim. Biophys. Acta, 81, 346-356.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 259, 680-5.

- Lessard, J., Val, A., Aota, S. ve Randal, D., 1994. Why is There No Carbonic Anhydrase Activity Available to Fish Plasma?, The Journal of Experimental Biology, 31198, 31-38.
- Lionetto, M.G. Giordano, M.E., Vilella, S. ve Schettino, T., 2000. Inhibition of Enzymatic Activities by Cadmium, Aquatic Toxicolog, 48, 561-571.
- Maren, T.H., 1960. A Simplifield Micromethod for the Determination of Carbonic Anhydrase and Its Inhibitors, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 130, 26.
- Maynard, J. R. ve Coleman, J.E., 1971. Elasmobranch Carbonic Anhydrase. Purification and Properties of the Enzyme from Two Species of Shark. J. Biol. Chem., 246 14, 4455.
- Meldrum, N. ve Roughton FJW., 1933. Carbonic Anhydrase: Its Preparation and Properties, J Physiol, 80, 113-142.
- Nelson, D. ve Cox, M., 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, 1152 s.
- Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.I. Nalbantoğlu, B., Demir, N. ve Bakan, N., 1997. The Inhibition Kinetics of Bovine and Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase Isoenzymes with Some Active Cations, Turk J.I Med. Sci, 27, 559-563.
- Özensoy, Ö. ve Supuran T.C., 2007. Carbonic Anhydrase IX as Prognostic Marker for Tumor Progression and as a Target for Novel Antitumor Drugs, Turk J. Biochem., 32, 3, 130-134.
- Perry, S. F., Wood, C. M., Walsh, P. J. ve Thomas, S., 1996. Fish Red Blood Cell Carbon Dioxide *Excretion* In Vitro: A Comparative Study, Comp. Biochem. Physiol, 113A, 121-130.
- Peterson, R. E. Tu, C. ve Linser, P.J., 1997. Isolation and Characterisation of a Carbonic Anhydrase Homologue from the Zebrafish (*Danio rerio*), Journal Molecul. Evol, 448, 432-439.
- Polat F.M. ve Nalbantoğlu B., 2002. In Vitro Esterase Activity of Carbonic Anhydrase on Total Esterase Activity Level in Serum, Turk J Med Sci, 32, 299-302.
- Puscas, I., Puscas, C., Coltau, M., Baican, M. ve Domuta, G., 2000. The serum of Carcinoma Patients Powerfully Activates Carbonic Anhydrase II, Experimental Oncology, 22, 162-164.
- Qian, S.M., Earnhardt, J.N., Wadhwa, N.R., Tu, C., Laipis, P.J. ve Silverman, D.N., 1999. Proton Transfer to Residues of Basic Pka During Catalysis by Carbonic Anhydrase, Biochemica Biophysica Acta, 14341-5.

- Roughton, J.W. ve Booth, V.H., 1945. The Effect of Substrate Concentration, pH and other Factors upon the Activity of Carbonic Anhydrase, The Journal of Biological Chemistry, 40, 309.
- Sanyal, G., Swenson, E. R., Pessah, N. I. ve Maren, T. H., 1982. The Carbon Dioxide Hydration Activity of Skeletal Muscle Carbonic Anhydrase, Molecular Pharmacology, 22, 211-220.
- Segel, I. H., 1975. Enzyme Kinetics, John Wiley and Sons, New York, USA.
- Severinghaus, J.W., Hamilton, N.F. ve Cotev, S., 1969. Carbonic Acid Production and the Role of Carbonic Anhydrase in Decarboxylation in Brain, Biochem. J., 114, 703.
- Sinan, S., Gencer, N., Turan, Y. ve Aslan, O., 2007. In Vitro Inhibition of the Carbonic Anhydrase From Saanen Goat (*Capra Hircus*) with Pesticides, Pesticide Biochemistry and Physiology, 88, 307-311.
- Smith, K. S., Jakubzick, C., Whittam, T. S. ve Ferry J. G., 1999. Carbonic Anhydrase is an Ancient Enzyme Widespread in Prokaryotes, Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 26, 15184-15189.
- Soyut, H. ve Beydemir, S. 2008. Purification and Some Kinetic Properties of Carbonic Anhydrase from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Liver and Metal Inhibition, Protein and Peptide Letters, 15-55, (8), 528-535.
- Söyüt, H., 2006. Gökkuşığı Alabalık Dokularından Elde Edilen Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tohse H. ve Mugiya, Y. 2001. Effect of Enzyme and Anion Transport Inhibitors on in Vitro Incorporation of Inorganic Carbon and Calcium into Endolymph and Otoliths in Salmon (*Oncorhynchus masou*), Comp. Biochem. Physiol. Part A, 128, 177-184.
- Tripp, B.C., Smith, K. ve Ferry, J. G., 2001. Minireview: Carbonic anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme, The Journal of Biological Chemistry, 276, 52, 48615-48618.
- Tufts, B.L., Estabaugh, A. ve Lung, S.G., 2003. Comparative Physiology and Molecular Evolution of Carbonic Anhydrase in the Erythrocytes of Early Vertebrates, Comp. Biochem. Physiol. Part A, 136, 259-269.
- URL-1, [www.wikipedia.org/wiki](http://www.wikipedia.org/wiki), Karbonik Anhidraz, 15 Mart 2009.
- URL-2, [www.sumae.gov.tr](http://www.sumae.gov.tr), Yunus, 02.04.2002.
- URL-3, [www.wikipedia.org/wiki](http://www.wikipedia.org/wiki), Pestisit, 20 Nisan 2009.

URL-4, [www.wikipedia.org/wiki](http://www.wikipedia.org/wiki), Pestisit, 22 Nisan 2009.

Verporte, J.A., Mehta, S. T. ve Edsall, J., 1967. Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C, Biol.Chem, 242,4221-4229.

Voet, D. ve Voet, J.G. 2003. Biochemistry, ed. John Wiley & Sons, Inc, 3rd. USA, P.459.

Wilbur, K.M. ve Anderson, N.G., 1948. Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase, J Biol Chem, 176, 147–154.

Yıldız, D., Tilkan, E., Gökçe, C. ve Demirak, A., 2004. Deniz Çayıruları (*posidonia oceanica*) Kullanılarak Sulu Çözeltilerden 2,4-Diklorofenolün Adsorpsiyonla Uzaklaştırılması, 21. Ulusal Kimya Kongresi, Malatya.

## ÖZGEÇMİŞ

Kimyager Fatma YAYLACI KARAHALİL, 1978 yılında ailenin ilk çocuğu olarak Ardeşen/RİZE’de doğmuştur. İlk ve orta öğrenimini Ardeşen’de tamamladıktan sonra 1995 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nü kazanmıştır. Lisans öğrenimini 1999 yılında tamamlayarak, 2000 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. Bir yıl İngilizce eğitimi aldıktan sonra, Ardeşen Kalem Dersanesi’nde Kimya Öğretmeni olarak çalışmıştır. 2004 yılında “Bazı Ağaç Kabuklarından Elde Edilen Metanolik Ekstraktların Radikal Temizleme Aktiviteleri” adlı tez ile Yüksek Lisans öğrenimini tamamlayan Yaylacı Karahalil, aynı yıl doktora öğrenimine başlamıştır. Yüksek Lisans ve doktora öğrenimi süresince, bilim dalı ile ilgili konularda ele alınmış bildiri ve makaleleri bulunmaktadır.

Lisans öğrenimi süresince, fakülte masa tenisi ve voleybol takımında yer alarak çok sayıda şampiyonluk yaşamış, 2004 yılında TÜBİTAK tarafından organize edilen “Milli Parklarda Çevre Eğitime” katılmıştır. Halen kök hücre üretimi, kanser aşuları ve kordon kanı bankacılığı konularında çalışmalarda bulunan ATİ Teknoloji Gen ve Hücre Tedavileri Merkezi bünyesinde Üretim Birimi elemanı olarak çalışmaktadır.

Kimyagerler Derneğine üye olan Yaylacı Karahalil, evli ve bir çocuk annesi olup, iyi derecede İngilizce bilmektedir.