

**KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN  
AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE  
BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Yasemin UYMAZ**

**Eskişehir, 2017**

**KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN  
AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE  
BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

**YASEMİN UYMAZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman : Prof. Dr. Arzu ERSÖZ**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Ocak, 2017**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Yasemin UYMAZ'ın “**Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması ve Biyoteknolojik Uygulamaları**” başlıklı Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi 04/01/2017 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği' nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Arzu ERSÖZ	.....
Üye : Doç. Dr. Lokman UZUN	.....
Üye : Yard. Doç. Dr. Özlem BİÇEN ÜNLÜER	.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun  
..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

### Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması ve Biyoteknolojik Uygulamaları

Yasemin UYMAZ

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Ocak, 2017

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Bu çalışmada, koyun karaciğerinden karbonik anhidraz (CA) enzimi, yeni bir afinite destek geliştirilerek saflaştırılmıştır. Bu tez kapsamında; öncelikle karbonik anhidraz enziminin inhibitörlerinden biri olan sülfonamid ile treonin aminoasidi arasındaki etkileşim mimik edilerek sülfonamid ve MA-Treonin ön-organizasyonu sonrası çapraz bağlayıcılar eşliğinde kriyojel kolon sentezlenmiştir. Sentezlenen kriyojel kolonun karakterizasyonu şişme testi, BET, FT-IR ve SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında, koyun karaciğerinden elde edilen ham ekstraktan CA enziminin Hızlı Protein Sıvı Kromatografi (FPLC) ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan CA enziminin Bradford yöntemi ile protein içeriği, UV spektrometrik ölçümler ile esteraz ve hidrataz aktivitesine göre optimum aktivite gösterdiği koşullar tespit edilmiş, Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi ile ikincil ve tersiyer yapılarındaki değişim değerlendirilmiş ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığı tayin edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Karbonik anhidraz, kriyojel kolon, sülfonamid, treonin, mimik etkileşim

## **ABSTRACT**

**Master of Science Thesis**

### **Purification of Carbonic Anhydrase Enzyme by Affinity Chromatography and Biotechnological Applications**

**Yasemin UYMAZ**

**Anadolu University**

**Graduate School of Sciences**

**Chemistry Program, January, 2017**

**Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ**

In this study, the carbonic anhydrase (CA) enzyme has been purified with a new affinity support developed from sheep liver. Within the scope of the study; the interaction between the sulfonamide, one of the inhibitors of CA enzyme, and threonine amino acid, has been mimicked and cryogel column has been synthesized in the presence of the sulfonamides and MA-threonine pre-organization with cross-proper linkers. Characterization of the synthesized cryogel column has been performed by swelling test, BET, FT-IR and SEM analysis.

In the next step of the study, the purification of CA enzyme has been realized by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) from crude extract obtained from sheep liver. The protein content of the purified enzyme has been determined by Bradford method, UV spectrometric measurements have been showed the optimum conditions for esterase and hydratase activity, Circular Dichroism (CD) Spectroscopy has been used to evaluate changes in secondary and tertiary structure and molecular weight has been determined by Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).

**Keywords:** Carbonic anhydrase, cryogel column, sulphonamide, threonine, mimic interaction

30/05/2017

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarda bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durum saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Yasemin UYMAZ

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca her konuda bilgi birikimi ve desteğini benden esirgemeyen, sabır ve hoşgörüsü ile her zaman yanımda olan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Arzu Ersöz'e

Teorik ve deneysel çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her zaman desteğini hissettiren değerli hocam Prof. Dr. Rıdvan Say'a

Tez çalışmalarım boyunca deneysel ve teorik olarak desteğinin yanı sıra ihtiyaç duyduğum her konuda yanımda olduğunu hissettiğim sevgili hocam Yard. Doç. Dr. Özlem Biçen Ünlüer'e

Lisans dönemimden bu yana bilimsel anlamda çok şey öğrendiğim ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım Doç. Dr. Sibel Emir Diltemiz ve Doç. Dr. Filiz Yılmaz'a

Çalışmalarını örnek aldığım ve aynı zamanda jüri komisyonumda yer alacak olan Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük ve Doç. Dr. Lokman Uzun'a

Tecrübelerini paylaşmaya açık olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam ve arkadaşım Uzman Dr. Rüstem Keçili'ye

Üniversite hayatım boyunca her zaman yanımda olan sevgili dostlarım Berfu Engin ve Burcu Yazıcı'ya

Yüksek lisans dönemimde tanıma şansını bulduğum sevgili dostlarım Ayça Bakır, Derya Karaarslan, Fatma Yediyıldız, Gözde Yavuz ve Semra Özgün Köse'ye

Sevgi, ilgi ve desteklerini her zaman hissettiğim Biyokimya Laboratuvarı ekibine

Kan bağından ziyade üniversite hayatım boyunca ev arkadaşım da olan, sevgi ve desteğini esirgemeyen sevgili ablam Ayşe Uymaz'a

Hayatımın her evresinde aldığım her kararda yanımda olan, maddi ve manevi her konuda fedakarlığını esirgemeyen anneme ve babama

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yasemin UYMAZ

Ocak 2017

## **İÇİNDEKİLER**

<b>BAŞLIK SAYFASI</b> .....	i
<b>JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI</b> .....	ii
<b>ÖZET</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ</b> .....	v
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	x
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. TEORİK BİLGİ</b>	
2.1. Enzimler .....	3
2.1.1. Enzimlerin yapısı ve genel özellikleri .....	3
2.1.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması .....	3
2.1.3. Enzimlerin spesifikliğı ve etki mekanizması.....	5
2.1.4. Enzim aktivitesi.....	7
2.1.4.1. Enzim aktivite birimleri.....	7
2.1.5. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler .....	7
2.1.5.1. Enzim derişimi .....	7
2.1.5.2. Substrat derişimi.....	8
2.1.5.3. pH .....	8
2.1.5.4. Sıcaklık.....	9
2.1.5.5. İnhibitörler.....	10
2.1.5.6. Enzim kinetiğı .....	10
2.1.6. Karbonik anhidraz .....	13



2.1.7. Afinite kromatografisi .....	15
2.1.8. Mimik kromatografik yöntemler .....	17
2.1.9. Kriyojeller .....	18
2.1.10. Hızlı protein sıvı kromatografisi .....	18
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>22</b>
3.1. Materyal .....	22
3.1.1. Kullanılan kimyasallar .....	22
3.1.2. Kullanılan cihazlar .....	22
3.2. Metod .....	23
3.2.1. Kriyojel temelli ayırma kolonlarının hazırlanması .....	23
3.2.1.1. Metakrilamidotreonin (MAThr) fonksiyonel monomerinin sentezi .....	23
3.2.1.2. MAThr-Sulfonamid biyomimetik kriyojel kolon hazırlanması .....	23
3.2.2. Karakterizasyon çalışmaları .....	23
3.2.2.1. Şişme testi .....	24
3.2.2.2. FT-IR analizi .....	24
3.2.2.3. Yüzey alanı ölçümü.....	24
3.2.2.4. Yüzey morfolojisi.....	24
3.2.3. Enzim üretimi ve ön deriştirilmesi.....	24
3.2.4. Enzim saflaştırılması.....	25
3.2.5. Enzimin protein içeriği ve aktivite tayini .....	25
3.2.5.1. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler ve kinetik incelemeler.....	26
3.2.6. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi.....	27
3.2.7. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS- PAGE) analizi .....	28

<b>4. BULGULAR</b> .....	29
4.1. MAThr-Sulfonamid ve Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid)'in	
Karakterizasyonu .....	29
4.1.1. MAThr-Sulfonamid'e Ait NMR spektrumu .....	29
4.1.2. Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid)'in FT-IR spektrumu.....	29
4.1.3. MAThr-Sulfonamid biyomimetik kriyojel kolonunun yüzey	
morfolojisi.....	30
4.1.4. MAThr-Sulfonamid biyomimetik kriyojel kolonunun şişme	
testi.....	30
4.1.5. Yüzey alanı ölçümü .....	31
4.2. Enzim örneklerinin protein içeriği ve aktivite tayini .....	31
4.2.1. Protein içeriği tayini .....	31
4.2.2. Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesi tayini .....	32
4.3. Enzim Saflaştırılması.....	32
4.3.1. FPLC Analizi.....	33
4.3.2. CA aktivitesini etkileyen faktörlerin incelenmesi.....	34
4.3.3.1. pH etkisi .....	34
4.3.3.2. Sıcaklık etkisi .....	35
4.3.3.3. Substrat derişimi etkisi .....	35
4.3.3. CA'nın $V_{mak}$ ve $K_m$ değerlerinin belirlenmesi.....	36
4.4. CD Spektrumu .....	37
4.5. SDS-PAGE Analizi.....	38
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	40
<b>KAYNAKLAR</b> .....	43
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	47

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Enzim katalizli bir reaksiyonun aktivasyon enerjisi üzerine etkisi .....	6
Şekil 2.2.	Enzim-Substrat bağlanması ve ürün oluşumu .....	6
Şekil 2.3.	Enzim derişiminin reaksiyon hızına etkisi .....	8
Şekil 2.4.	Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi.....	8
Şekil 2.5.	pH'ın reaksiyon hızına etkisi.....	9
Şekil 2.6.	Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi.....	9
Şekil 2.7.	Michaelis-Menten grafiği .....	12
Şekil 2.8.	Lineweaver-Burk grafiği .....	12
Şekil 2.9.	CA izoenzimlerinin katalitik bölgeleri .....	15
Şekil 2.10.	Sulfonamidin CA enzimi ve Treonin aminoasidi ile oluşturduğu etkileşimler.....	18
Şekil 2.11.	Makrogözenekli kriyojellerin oluşumunun gösterimi .....	19
Şekil 2.12.	FPLC cihazı ana bileşenleri.....	20
Şekil 3.1.	Çalışmalarda kullanılan FPLC cihazı.....	25
Şekil 4.1.	Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid)'in FT-IR spektrumu .....	29
Şekil 4.2.	Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid)'in SEM görüntüleri .....	30
Şekil 4.3.	Bradford standart grafiği .....	32
Şekil 4.4.	Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) kriyojel kolonu ile CA saflaştırılmasına ait kromatogram.....	34
Şekil 4.5.	pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.6.	Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.7.	Substrat derişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.8.	Lineweaver-Burk grafiği; $V_{\text{mak}}$ ve $K_m$ değerleri.....	37
Şekil 4.9.A.	Ticari CA enzimine ait CD spektrumu .....	38
Şekil 4.9.B.	Saflaştırılan CA enzimine ait CD spektrumu.....	38
Şekil 4.11.	SDS-PAGE görüntüsü.....	39

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Birbirine afinite gösteren bazı biyomoleküller.....	16
<b>Çizelge 4.1.</b> CA'ya ait saflaştırma tablosu .....	33

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- APS** : Amonyum persülfat
- CA** : Karbonik Anhidraz
- CD** : Dairesel Dikroizm Spektroskopisi
- FPLC** : Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi
- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : Bikarbonat İyonu
- HEMA** : Hidroksietilmetakrilat
- kDA** : Kilodalton
- K<sub>m</sub>** : Michealis-Menten Sabiti
- MAThr** : Metakrilamidotreonin
- MBA** : N'N, Metilenbisakrilamit
- PAGE** : Poliakrilamid Jel Elektroforez
- SDS** : Sodyum N-Dodesil Sülfat
- TEMED** : N,N,N',N'-Tetraetilmetilendiamin
- U** : Enzim Ünitesi
- V<sub>mak</sub>** : Maksimum reaksiyon hızı

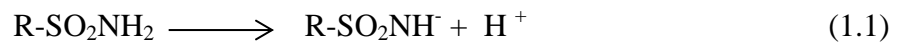
## 1. GİRİŞ

Biyoteknoloji; biyokimya, mikrobiyoloji, moleküler biyoloji, genetik bilimleri ve mühendislik dalını bünyesinde toplayan oldukça geniş bir araştırma dalıdır. Uygulama alanları insan sağlığına yönelik biyomoleküllerin sentezi, yapay organların geliştirilmesi, aşı üretimi ve insandaki genetik kusurların giderilmesi gibi çalışmalarını kapsamaktadır. Son yıllarda enzimoloji alanında, kanser gibi birçok hastalığın erken tanısına yönelik araştırmalar yapılmaktadır [1]. Çeşitli bitkisel, hücresel veya mikrobiyal kaynaklardan izole edilen hormon, antikor, protein ve enzim gibi moleküller biyoteknolojik ilerlemeler sayesinde klinik uygulamalarda biyosensör, tanı kiti, ilaç ham maddesi ve terapi ajanı gibi uygun formlarda kullanılmaktadır [2].

Enzimler; protein yapısında kompleks biyomoleküller olup tıp, gıda ve biyosensör gibi bir çok alanda yaygın kullanıma sahiptir. Bitki ile hayvan hücrelerinden ve mikrobiyal kaynaklardan pratik ve ekonomik yollarla saflaştırılabilmeleri uygulama alanlarını artırmaktadır [3].

Karbonik anhidraz (CA) (E.C. 4.2.1.1.), CO<sub>2</sub> ve bikarboatın (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) birbirlerine çevrilmesi reaksiyonlarını karbonik asit meydana getirmeden farklı bir yol izleyerek katalizler. CA, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve H<sup>+</sup> oluşturarak hem CO<sub>2</sub>'in uzaklaştırılmasında hem de asit-baz dengesinin korunmasında önemli rol oynamaktadır. CA, aktif bölgesinde Zn<sup>+2</sup> iyonu bulduran bir metalo-enzimdir ve enzimatik kataliz prensiplerinin aydınlatılmasında önemli bir rol oynamasının yanı sıra çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir. CA, ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiş, daha sonraki yıllarda ise insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükrüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve karakterize edilerek molekül kütlelerinin yaklaşık 29 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir [4, 5].

CA'nın en güçlü organik inhibitörleri aromatik ve heteroaromatik sulfonamidlerdir. Sulfonamidler, R-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> kimyasal yapısına sahiptir. Bu formüldeki R grupları, genellikle aromatik veya heteroaromatik halka sistemleridir.



denklemine göre kolaylıkla iyonik yapı kazanmaktadırlar. Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidler, bu hidrofilik bölgesine ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere sahiptir.

Sulfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle R-SO<sub>2</sub>NH<sup>-</sup> bileşimindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn<sup>+2</sup> ile iyonik ve/veya koordine kovalent bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur [6].

Bu çalışmada, koyun karaciğerinden izole edilen CA enzimi, inhibitörlerinden biri olan sulfonamidin, treonin ile arasındaki etkileşimi mimik etmek üzere sulfonamid ve metakrilamido-treonin (MA-Thr) ön-organizasyonu sonrası çapraz bağlayıcılar eşliğinde kriyojel kolon sentezlenmiş ve sonrasında Hızlı Protein Sıvı Kromatografi (FPLC) ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzimin esteraz ve hidrataz aktivitesine göre optimum aktivite gösterdiği koşullar tespit edilmiş, Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi ile ikincil ve tersiyer yapılarındaki değişim değerlendirilmiş, Sodyum Dodesil Sulfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığı tayin edilmiştir.

## **2. TEORİK BİLGİ**

### **2.1. Enzimler**

Enzimler, canlı hücrelerde sentezlenerek vücudun canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan; büyüme, sindirim, solunum, kas kasılması gibi fiziksel ve kimyasal olayların oluşumunda rol oynayan biyomoleküllerdir. Aşağıdaki alt bölümlerde enzimlerin yapıları, özellikleri ve sınıflandırılmaları hakkında bilgi verilmiştir.

#### **2.1.1. Enzimlerin yapısı ve genel özellikleri**

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasında meydana gelen kimyasal reaksiyonları herhangi bir yan ürün oluşturmaksızın % 100 verimle hızlandırıcı etkiye sahip biyolojik katalizörlerdir.

Enzimlerin genel özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

1. Katalitik RNA moleküllerinin bir bölümü hariç tutulduğunda, bütün enzimler protein yapısındadır.
2. Enzimler tarafından aynı tür reaksiyonlar defalarca sentezlenebilir.
3. Bir enzim her zaman bir çeşit ya da aynı türden benzer reaksiyonları katalizler.
4. Katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürürler ve reaksiyonun daha kısa sürede dengeye ulaşmasını sağlarlar.
5. Canlı ortamda olduğu gibi cansız ortamlarda da işlev yaparlar.

#### **2.1.2. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması**

Enzimlerin etki ederek ürüne dönüştürdükleri maddelere substrat denir. Enzimler genel olarak substratlarının sonuna “az” ekinin getirilmesiyle (üreaz, lipaz, proteaz) ya da katalizledikleri reaksiyonu tanımlayacak şekilde (laktat dehidrogenaz, karbonik anhidraz) adlandırılır. Ancak bu isimler çoğu enzimin fonksiyonu hakkında eksik bilgi verdiği için dolayı, 1956 yılında Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Enzim Komitesi (IUBMB-EC) enzimleri sistematik olarak adlandırma konusunda çalışmalar başlatmış ve her bir enzim için dört rakamdan oluşan enzim kod numarası (E.C.) öngörmüştür. E.C. numarasındaki dört rakam sırasıyla enzimin ana sınıfını, alt sınıfını, alt-alt sınıfını, alt-alt sınıfındaki seri numarasını ifade etmektedir.

Enzimler katalizledikleri reaksiyon tür ve mekanizmalarına göre altı ana grupta toplanmaktadır. Bu gruplar aşağıda verilmiştir;



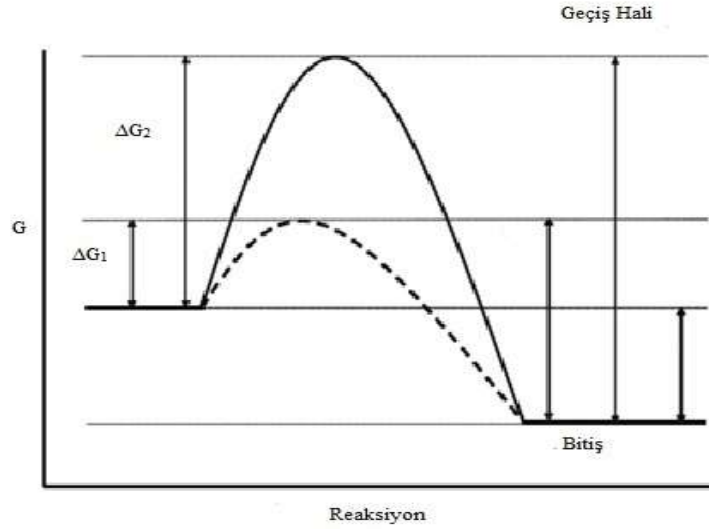
- 1. Oksidoredüktazlar:** Bu sınıfta toplanan enzimler substratlar arasında elektron veya hidrojen transferini sağlayarak oksidasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Oksidasyon olayının gerçekleştiği her tepkimede redaksiyon da gerçekleşeceğinden oksidoredüktazlar olarak adlandırılırlar. Geleneksel olarak verici (donör) molekül-dehidrogenaz, sistematik olarak ise alıcı oksidoredüktaz şeklinde adlandırılırken aldıkları EC kodu EC 1.1.1 ile başlamakta ve enzimin seri numarasına göre devam etmektedir.
- 2. Transferazlar:** Alıcı ve verici olarak davranan iki substrat arasında  $-CH_2$ ;  $CH-OH$ ,  $CH-NH_2$ ,  $NADH_2-NADPH_2$  gibi belirli grupların transferini sağlayan enzimler bu sınıfta toplanmaktadır.
- 3. Hidrolazlar:** Hidrolazlar, C-O, C-N, C-C, fosforik anhidrat ve bazı diğer kimyasal bağların hidrolitik olarak kırılmasını katalizleyen enzimlerdir. Hidroliz olayında, bir grubun alıcı olarak davranan su ( $H_2O$ ) molekülüne transfer olduğu bilindiğinden bu enzimlerin transferazlar olarak isimlendirilmesi de düşünülebilir. Ancak su molekülünün alıcı olarak davrandığı tepkimelerin keşfi daha eskilere dayandığından bu enzimler daha çok hidrolazlar olarak adlandırılmaktadır.
- 4. Liyazlar:** Bu sınıftaki enzimler, moleküllerdeki C-C, C-O, C-N gibi bağların hidroliz veya oksidasyon yoluyla değil eliminasyon yoluyla yıkımını katalizlerler. Tek bir substrata etki ettiklerinde bir grubun yapıdan ayrılmasıyla çift bağların veya halkaların elimine edilmesini veya çift bağlara bazı grupların ilave edilmesini sağlarlar.
- 5. İzomerazlar:** İzomerazlar bir moleküldeki yapısal ve geometrik değişimleri katalizleyen enzimlerdir. Katalizledikleri izomerasyon türlerine göre rasemaz, epimeraz, izomeraz, tautomeraz, mutaz ya da sikloizomeraz şeklinde adlandırılabilirler. Bazı durumlarda molekül içi oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizleseler de hem alıcı hem de verici aynı molekül olduğundan oksidoredüktaz yerine izomeraz olarak adlandırılırlar.
- 6. Ligazlar:** Bu sınıftaki enzimler, Adenozintrifosfat (ATP) veya benzeri bir trifosfat molekülündeki difosfat bağlarının hidrolizini katalizleyerek iki molekülün birbirine bağlanmasını sağlar [7].

### 2.1.3. Enzimlerin spesifikliği ve etki mekanizması

Enzimler substratlarına ve katalizledikleri reaksiyon türlerine göre son derece spesifiktirler. Genel olarak, bir enzim yalnızca bir kimyasal reaksiyonu ya da aynı tip benzer reaksiyonları katalizler. Enzimlerin spesifikliği bir kaç farklı başlık altında şu şekilde açıklanabilir :

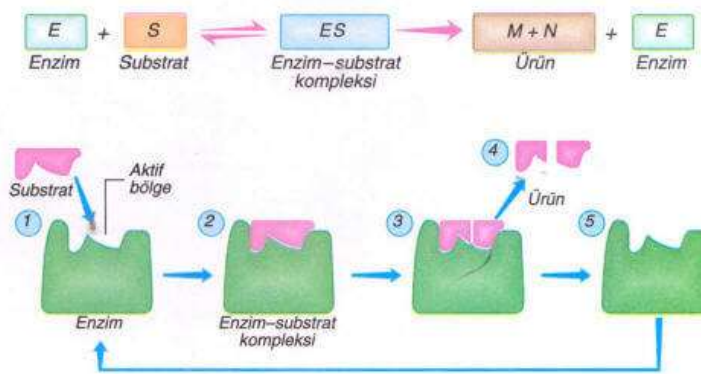
1. **Mutlak Spesifiklik:** Enzim yalnızca tek bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalizler.
2. **Grup Spesifikliği:** Enzim bir molekülde bulunan fosfat, metil ve amino gibi fonksiyonel grupların her birine etki eder.
3. **Bağ Spesifikliği:** Enzim bir moleküldeki fonksiyonel gruplar arasında bulunan bazı kimyasal bağlara (örneğin; proteinlerdeki peptid bağı, karbonhidratlardaki glikozid bağı) etki eder.
4. **Stereokimyasal Spesifiklik:** Enzim yalnızca bir molekülün sterik ve optik izomerleri (örneğin; glukozun D veya L formu) üzerinde etkilidir [8].

Enzimlerin etki mekanizması “Geçiş Durumu Teorisi” temel alınarak açıklanabilir. Geçiş Durumu Teorisine göre moleküllerin çarpışması sonucu gerçekteşen kimyasal reaksiyonlarda; uygun çarpışmaların hemen sonrasında geçiş hali adı verilen oldukça kararsız bir kompleks meydana gelir. Bu kompleksin sahip olduğu potansiyel enerji geçiş hali süresince artar ve reaksiyona giren moleküller ve oluşması beklenen ürünler arasında bir enerji bariyeri oluşturur. Reaksiyonun ürün oluşumu ile sonuçlanabilmesi için, reaktantların bu bariyeri aşacak enerjiye sahip çarpışmalar yapması gerekmektedir. Kimyasal reaksiyonların gerçekteşmesi için aşılması gereken bu enerji engeli aktivasyon enerjisi olarak adlandırılır (Şekil 2.1). Aktivasyon enerjisinin eşiği ne kadar yüksek olursa birim zaman içerisinde bu eşiği aşan moleküllerin sayısı da o oranda az olacaktır [9].



**Şekil 2.1.** Enzim katalizli bir reaksiyonun aktivasyon enerjisi üzerine etkisi;  $G$  serbest enerjiyi, sürekli çizgi katalizörsüz ilerleyen bir reaksiyonu, kesikli çizgi ise enzim katalizli reaksiyonu ifade etmektedir.  $\Delta G_1$  katalizörsüz reaksiyonun,  $\Delta G_2$  enzim katalizli reaksiyonun aşması gereken enerji bariyeridir [9].

Enzimler aktif bölgeleri ile substrata bağlanır ve anlık enzim-substrat kompleksi oluştururlar (Şekil 2.2). Bunun sonucunda substrat konformasyonel değişime uğrayarak yapısını bozar. Böylece reaktantların ürünlere dönüşmesi için aşmaları gereken enerji eşiği düşer, reaksiyon hızlanır. Enzim katalizi sayesinde hızlı bir şekilde ürüne dönüşen substrattan sonra enzim-substrat kompleksi de enzim-ürün kompleksine dönüşür ve enzimin kompleksten ayrılmasıyla ürün oluşumu sağlanır [10].



**Şekil 2.2.** Enzim-Substrat bağlanması ve ürün oluşumu [11].

Enzimler kimyasal reaksiyonlardan harcanmadan ve bozulmadan çıkarlar ve bu özellikleri sayesinde tekrar tekrar kullanılabilirler. Enzimle katalizlenen reaksiyonların

çoğu katalizlenmeyen reaksiyonlara göre  $10^{-3}$ - $10^{-8}$  kere daha hızlı ilerler ve tipik olarak her enzim molekülü saniyede 100-1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir.

#### **2.1.4. Enzim aktivitesi**

Enzimlerin katalizör olarak etkinliğinin belirlenebilmesi için bir çözeltideki toplam miktarı yerine ürüne dönüştürdüğü substrat miktarının ölçülmesi gerekir. Optimum reaksiyon koşullarında, birim zamanda, substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı enzim aktivitesi olarak tanımlanır.

##### **2.1.4.1. Enzim aktivite birimleri**

- a) **Enzim Ünitesi (U):** Oda koşullarında, bir dakikada, 1 mikromol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarını ifade eder.
- b) **Katal:** Uluslararası Enzim Komisyonu tarafından belirlenen ve oldukça büyük değerleri ifade eden katal; bir saniyede 1 mol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.
- c) **Spesifik Aktivite:** Enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanır ve 1 mg protein başına düşen enzim aktivitesi olarak tanımlanır.
- d) **Turnover Sayısı (Moleküler Aktivite):** Optimum koşullarda, bir saniyede bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısıdır [12].

#### **2.1.5. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler**

Enzim aktivitesini etkileyen başlıca etmenler enzim derişimi, substrat derişimi, sıcaklık, pH ve inhibitörlerdir.

##### **2.1.5.1. Enzim derişimi**

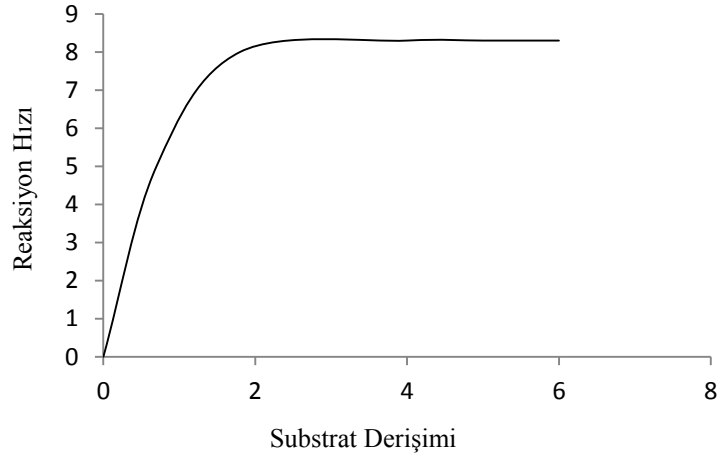
Enzim katalizli kimyasal reaksiyonların hızı, reaksiyon belirli bir noktaya gelene kadar enzim miktarı ile doğru orantılı olarak artar (Şekil 2.3). Fakat ortamdaki substrat tükendiğinde ürüne dönüştürülecek herhangi bir madde olmadığından dolayı enzim derişimi ne kadar artarsa artsın reaksiyon sabit bir hızla devam eder.



*Şekil 2.3. Enzim derişiminin reaksiyonun hızına etkisi*

### **2.1.5.2. Substrat Derişimi**

Enzim miktarı sabit tutulmak koşulu ile substrat miktarının artmasıyla reaksiyon önce belirgin bir şekilde hızlanır. Ancak enzimin aktif bölgeleri ortamdaki substratla doygun hale geldiğinde enzim ulaşabileceği maksimum hıza ( $V_{mak}$ ) ulaşır ve bu noktadan sonra reaksiyon sabit bir hızla devam eder (Şekil 2.4).

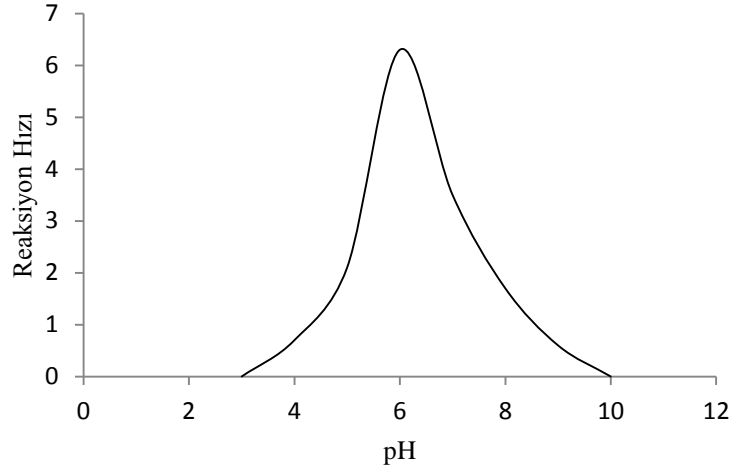


*Şekil 2.4. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi*

### **2.1.5.3. pH**

Enzimler protein yapısında maddeler olduklarından sahip oldukları amin ve karboksil grupları ortamın pH'ına göre farklı iyonlaşma dereceleri gösterir. Bu nedenle enzimin yapısında değişiklikler meydana gelebilir. Enzimler genellikle pH 5-9 arasında iyi çalışırlar ve her enzimin maksimum aktivite gösterdiği belirli bir pH değeri vardır.

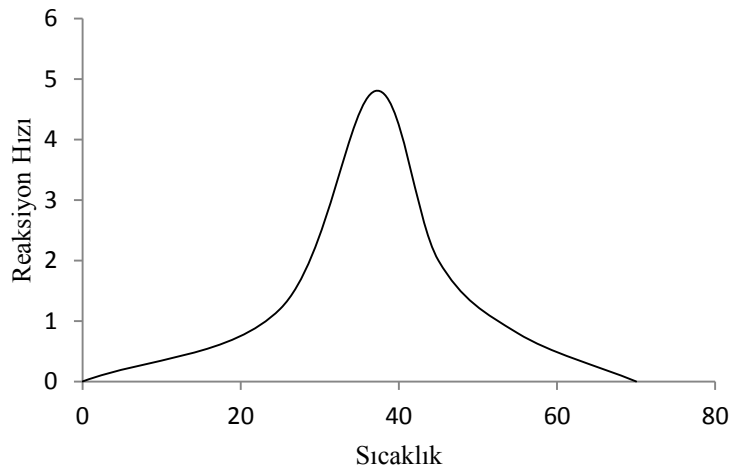
Bu değer o enzim için optimum pH'dır. Optimum değerin altındaki veya üstündeki pH derecelerinde enzimde protein yapısından dolayı denatürasyon meydana gelebilir ve enzim aktivitesini azaltabilir veya tamamen durdurabilir (Şekil 2.5).



*Şekil 2.5. pH'ın reaksiyon hızına etkisi*

#### **2.1.5.4. Sıcaklık**

Tüm kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzim katalizli reaksiyonlarda da sıcaklığın artmasıyla moleküller arasındaki etkin çarpıŐma sayısını artacağından reaksiyon hızı da artar. Ancak enzimlerin protein yapılarından dolayı yüksek sıcaklık değerlerinde i denatürasyona uğramalarına neden olduğundan reaksiyon hızında da azalma gözlenir (Şekil 2.6). Her enzimin maksimum verimle çalıştığı belirli bir sıcaklık değeri vardır ve bu değer o enzim için optimum sıcaklıktır.



*Şekil 2.6. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi*

### **2.1.5.5. İnhibitörler**

Enzimlerin bazı bileşikler tarafından hem in vivo hem de in vitro aktivitesinin azaltılması veya tamamen durdurulması olayına inhibisyon, buna neden olan bileşiklere de inhibitör adı verilir. İnhibitörler genellikle düşük molekül ağırlığına sahip bileşik ya da iyonlardır. Enzim inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur ve birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonunu bu yolla gerçekleştirir. Enzimlerin etki mekanizmalarının incelenmesinde inhibisyon olayından yararlanılır. Enzimatik inhibisyonu dönüşümlü (tersinir) ve dönüşümsüz (tersinmez) olmak üzere iki grupta incelenir. İnhibitör enzime kovalent bağlar ile bağlanmışsa enzim geri kazanılamaz ve dönüşümsüz (tersinmez) inhibisyon gerçekleşir. Dönüşümlü (tersinir) inhibisyonda ise inhibitör enzime tersinir bağlarla bağlanır ve böylece enzim tekrar serbest kalabilir. Tersinir inhibisyon; a) Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon b) Yarışmasız (Nonkompetitif) İnhibisyon ve c) Yarı yarışmalı (Unkompetitif) İnhibisyon olmak üzere üçe ayrılır. Yarışmalı inhibisyonda, inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substrat molekülünün enzime bağlanması önlenmiş olur. Ancak substrat derişiminin artırılmasıyla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabılır. Bu durumda, enzimin  $V_{\text{mak}}$  değeri değişmezken,  $K_m$  değeri artar. Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu nedenle substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu olmadığından substrat derişiminin artırılmasıyla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılamaz. Bu durumda, enzimin  $V_{\text{mak}}$  değeri azalırken,  $K_m$  değeri sabit kalır. İnhibitörün aktif bölge dışında herhangi bir yere bağlanarak, enzimin substrat ile reaksiyona girmesini engellediği durumlarda yarı yarışmalı inhibisyon söz konusudur.

### **2.1.5.6. Enzim Kinetiği**

Enzimler katalizledikleri reaksiyonların aynı yoldan daha hızlı bir şekilde ilerlemesini sağlamaktadır. Bir enzimin aktifliğinin ölçüsü ve aktivitesini etkileyen parametreler sayısal olarak kinetik çalışmalarla ifade edilmektedir.

Enzim kinetiği alanındaki ilk çalışmalar 1902 yılında Victor Henri, 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten isimli araştırmacılar tarafından yapılmıştır [13]. Michaelis ve Menten' in geliştirdiği teori, enzimlerin bir reaksiyonu nasıl hızlandırdığı ile ilgili olmayıp, enzim ve substrat arasında ürün oluşumundan önce gerçekleşen enzim-substrat kompleksinin (E.S) kinetik mekanizmasını açıklamaktadır.



Denklem 2.1' de verilen enzim katalizli reaksiyonda  $k_1$  ve  $k_{-1}$  ifadeleri sırasıyla ileri ve geri yönde ilerleyen tepkimelerin hız sabitleri,  $k_{cat}$  ise reaksiyonun katalitik hız sabitini ifade etmektedir. Michaelis-Menten' e göre tek substratlı bir enzimatik reaksiyonda enzim (E) ve substrat (S) bir araya gelir ve geçiş ürünü olan enzim-substrat kompleksini (E.S) oluşturur. Bu kompleks hem substrat ve serbest enzim hem de ürün (P) oluşumu yönünde ilerleyebilir. Ancak geri yöndeki (S ve serbest E oluşumu yönü) tepkimenin hızı ihmal edilebilecek kadar düşüktür. Sistem dengeye geldiğinde ise kısa bir süre E.S derişimi sabit iken E, S ve P derişimlerinde değişiklikler meydana gelir. E.S kompleksinin oluşum ve yıkım hızlarının eşit olduğu bu denge durumuna sabit durum adı verilir ve bu halde ölçülen reaksiyon başlangıç hızı, enzimin aktivitesini belirlemeye yardımcı olur. Michaelis ve Menten bu başlangıç durum hızını belirlemeye yönelik bir eşitlik (2.2.) türetmişlerdir [14].

$$V = \frac{V_{mak}[S]}{[S] + K_m} \quad (2.2.)$$

Reaksiyon ortamındaki enzim molekülleri substrat molekülleri ile tamamen doygun hale gelene kadar substrat miktarıyla reaksiyon hızı doğru orantılı olarak değişir. Enzim molekülleri bağlayabilecekleri maksimum miktarda substratı bağladığında reaksiyon da maksimum hıza ( $V_{mak}$ ) erişir. Denklem 2.2' de yer alan  $K_m$  ise enzimin aktif bölgesinin yarısını doyuran başka bir deyişle  $V_{mak}$  'ın yarısına eşit olan reaksiyon hızına karşılık gelen substrat derişimini ifade eden bir sabittir. Buna göre;

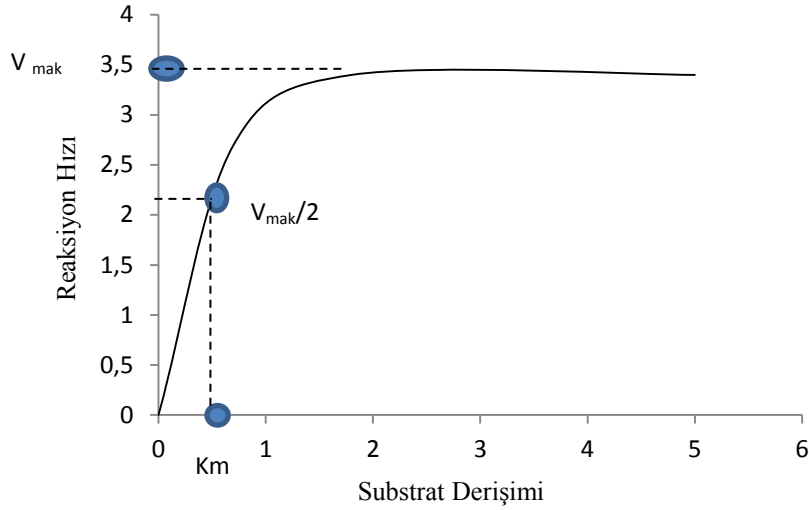
$$\begin{array}{l}
 [S]=K_m \text{ ise} \\
 V_o=V_{mak}/2' \text{ dir.}
 \end{array}$$

$K_m$ , her enzimin her substratı için sabit olan ve enzimin substratına olan afinitesi hakkında bilgi veren bir değerdir. Bir enzim ve substratı için belirlenen  $K_m$  değeri ne kadar düşük ise enzim substrata o kadar yüksek afinite gösterir. Başka bir deyişle, enzimler birden fazla madde ile reaksiyona girebilecek özellikte moleküllerdir ve enzim



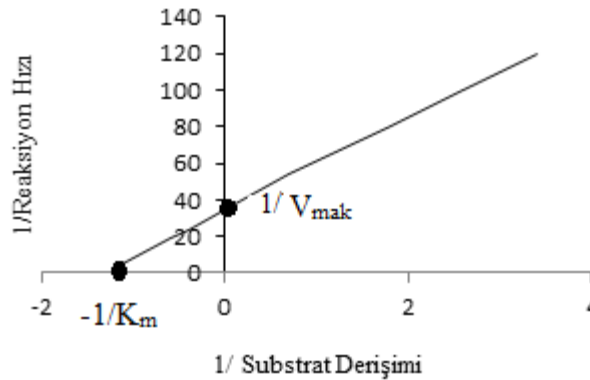
bunlardan hangisi ile maksimum aktivite hızına erişiyorsa o madde için ilgili enzimin doğal substratı olduğu söylenebilir [15].

Michaelis-Menten eşitliğine göre substrat derişimi ve reaksiyon hızı doğru orantılı bir artış göstermektedir. Reaksiyon hızına karşı çizilen substrat derişimi grafiği artan hiperbolik eğri şeklindedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Michaelis-Menten grafiği

1934 yılında Lineweaver ve Burk, Michaelis-Menten eğrisini düzenleyip, grafiği  $[S]^{-1}$  ve  $V^{-1}$  değerleriyle çizerek doğrusal hale getirmişlerdir (Şekil 2.8). Böylece enzim çalışmalarında  $V_{mak}$  ve  $K_m$  değerlerinin daha doğru bir şekilde belirlenmesini sağlamışlardır. Lineweaver-Burk grafiğine göre, doğrunun y (ordinat) eksenini kestiği nokta  $V_{mak}^{-1}$ ; x (apsis) eksenini kestiği nokta ise  $-K_m^{-1}$ 'dir [16].



Şekil 2.8. Lineweaver-Burk grafiği

### 2.1.6. Karbonik anhidraz (E.C. 4.2.1.1.)

Canlı organizmasında oldukça önemli bir metabolit olan CO<sub>2</sub>'in çevresel derişimi oldukça yüksektir ve karbonik asit (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> oluşumu ile dengededir. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'ın sulu çözeltilerdeki çözünürlüğü, lipitlerdeki çözünürlüğüne göre oldukça yüksekken CO<sub>2</sub>'nin iki türde de çözünürlüğü yüksektir. Bu özelliğinden dolayı CO<sub>2</sub> hücre içi ve dışına kolaylıkla difüze olur. Ancak HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'ın hücre membranından geçmesi için taşınması gerekir. Fizyolojik pH'ta CO<sub>2</sub>'nin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'e çevrimi çok yavaştır ve bir enzim tarafından katalize edilmesi gerekir. Enzimatik olarak CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'ın çevrilmesi sadece hücrel enzimlerin ihtiyaç duydukları seviyede hücrenin CO<sub>2</sub> miktarını artırmasında değil, hücrel proseslerin devamlılığı için uygun hücre içi CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> seviyelerinin devamında da hücreye yardımcı olur. Bu dönüşüm reaksiyonlarını katalizleyen "karbonik anhidraz, CA" enzimidir [4, 5].

CA enzimi, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> meydana getirmeden farklı bir yol izleyerek CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'in birbirlerine çevrilmesi reaksiyonlarını katalizler. CA, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve H<sup>+</sup> oluşturarak hem CO<sub>2</sub>'in uzaklaştırılmasında hem de asit-baz dengesinin korunmasında önemli rol oynamaktadır. CO<sub>2</sub>'in hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Ayrıca karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir [17, 18].

CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiş, daha sonraki yıllarda ise insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve karakterize edilerek molekül kütlesinin yaklaşık 29 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir [19].

CA canlılarda CO<sub>2</sub>'in hidratasyon ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'ın dehidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyerek bunun yanı sıra; böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi dokularında H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> birikiminde de rol almaktadır [20]. Ayrıca tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometrium dokularında da belirli miktarlarda bulunmaktadır. Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve karasal bitki kloroplastlarında oldukça önemli rolleri olduğu tespit edilmiştir [21, 22].

CA aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  iyonu bulunduran bir metaloenzimdir ve yavaş bir reaksiyon olan  $CO_2$ 'nin  $HCO_3^-$ 'e ve protona dönüşümünü katalizler. Karbonik anhidraz bu reaksiyonun hızını ileri derecede artırarak saniyede  $10^4 - 10^6$  reaksiyon hızına ulaştırır. CA, enzimatik kataliz prensiplerinin aydınlatılmasında önemli bir rol oynamanın yanısıra çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir. CA,  $CO_2$  ve  $HCO_3^-$  veya ortam pH'ına bağlı olarak bikarbonat ve karbonat iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlem bir molekül olan  $CO_2$ 'nin farklı açılara sahip piramidal yapıda  $H_2CO_3$  kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaş olduğundan dolayı CA, bu çok yavaş gerçekleşen dönüşüm reaksiyonlarını *in vivo* ve *in vitro* şartlarda son derece hızlı bir şekilde katalizlemektedir [17, 18].

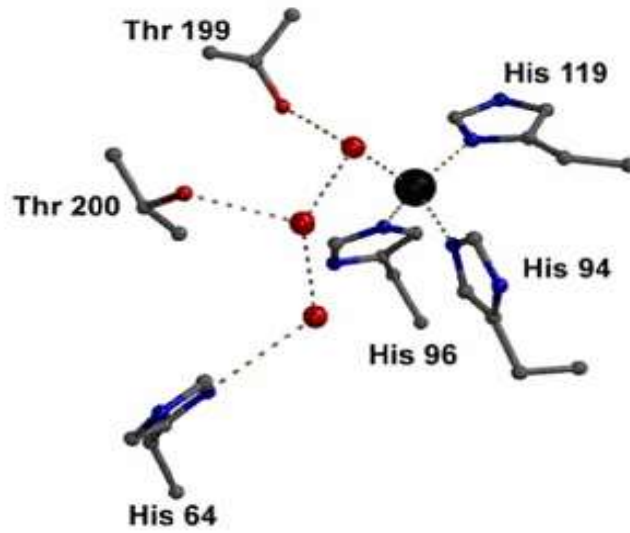
Prokaryot ve ökaryotlarda çok yaygın olarak bulunan CA izoenzimleri,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - olmak üzere evrimsel olarak birbirinden bağımsız 3 ayrı gen ailesi altında sınıflandırılmaktadır. Bu gen aileleri aminoasit dizilişleri açısından önemli sayılabilecek bir benzerlik göstermemektedir. Bunlar, omurgalılar, bakteriler, algler ve sitoplazmalı yeşil bitkilerde bulunan  $\alpha$ -CA'lar, çoğunlukla bakteriler, algler ile bazı bitkilerin kloroplastlarında bulunan  $\beta$ -CA'lar, bazı bakterilerde bulunan  $\gamma$ -CA'lardır [1]. CA izoenzimlerinin hepsinde ortak olan nokta, aktif bölgelerinde bir  $Zn^{2+}$  iyonu bulundurarak enzim yapısında metal bağlanma bölgesinde histidin aminoasitinin ligant oluşturmasıdır.  $Zn^{2+}$  iyonlarının görevi, doğrudan substrat molekülleriyle etkileşerek enzimin katalitik etkisini sağlamaktır [24, 25].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, yüksek omurgalılarda, çok farklı önemli fizyolojik roller sergileyen ve  $Zn^{2+}$  iyonu taşıyan değişik katalitik aktiviteleri olan 16 adet CA izoenzimi tanımlanmış bulunmaktadır. CA'nın, beş adet sitozolik formu (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII), beş adet hücre membranına bağlı izoenzimi (CA V, CA IX, CA XII, CA XIV, CA XV), iki tane mitokondriyal formu (CA VA, CA VB) ve bir adet salgılanan CA izozimi (CA VI) vardır. CA ilişkili proteinlerin, CARP'lar olarak adlandırılan 3 akatalitik formu daha bulunmaktadır. Bunlar; CA VIII, CA X, CA XI 'dir [26, 27].

CA izoenzimleri, solunum ve akciğerler ile metabolize dokular arasındaki  $CO_2/HCO_3^-$  dönüşümü, pH ve  $CO_2$  stabilitesi, çeşitli doku ve organlarda elektrolit

salgılanması, glukoneogenez ve üre sentezi (hayvanlarda) ve CO<sub>2</sub> bağımlılığı (bazı bitkilerde ve alglerde) gibi biyosentetik reaksiyonlar bu fonksiyonlar arasındadır. Bu özellikler, CA enzimlerini biyomedikal uygulamaları olan inhibitör ve aktivatörlerin dizaynında etkili kılmaktadır [28].

Enzimin aktif bölgesi oyuk şeklinde ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk molekülün merkezine kadar uzanır. Çinko iyonu bu oyğun alt kısmında bitişik halde ve tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119 'daki üç azot atomuyla koordine edilmiştir (Şekil 2.9). Ligandlar protein formundaki bir indirekt ligandın hidrojen bağı ile diğer gruplara bağlanmasıyla oluşurlar [29].



*Şekil 2.9. CA izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119) (Büyük küre Zn<sup>2+</sup> iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir.) [29].*

### 2.1.7. Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi, biyomoleküllerin uygun ligandlarla adsorpsiyon mekanizmasına göre ayrılmasını sağlayan bir sıvı kromatografi türüdür. Yüksek seçicilik, spesifik ayırma, verimli saflaştırma gibi avantajları sayesinde birçok biyolojik molekülün saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Afinite kromatografisinin çalışma prensibi biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, karbonhidratlar vb.) moleküler tanıma ve tanınma özelliğine dayanmaktadır. Bu yöntemde göre biri hedef molekül (saflaştırılacak madde) diğeri katı bir destek üzerine immobilize edilmiş bağlayıcı

molekül olmak üzere iki madde birbirini yapısal olarak tanımakta ve bunun sonucu olarak da elektrostatik, hidrofobik etkileşimlerle, Van Der Waals kuvvetleriyle veya Hidrojen bağları ile tersinir olarak bir araya gelmektedir [30]. Bu yöntem ile yapılan saflaştırma çalışmalarında Çizelge 2.1 'de verilen biyomoleküllerden ve bu moleküller arasındaki biyolojik etkileşimlerde yararlanılmaktadır.

*Çizelge 2.1 . Birbirine afinite gösteren bazı biyomoleküller*

<b>Biyotarıyıcı</b>	<b>Eşlenik Hedef Moleküller</b>
Enzim	Substrat, İnhibitör, Kofaktör
Antibadi	Antijen, virüs
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Nükleik asit	Nükleik asit polimeraz, histonlar, tamamlayıcı zincirler
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein
Glutation	GST (Glutation-S-Transferaz) füzyon protein

Afinite prensibine dayalı kromatografik saflaştırma sistemlerinde hedef molekülün bağlandığı madde ligand ve ligandın üzerine tutturulduğu katı materyal ise matriks olarak adlandırılır. Matriks kimyasal ve fiziksel olarak inert olmalı yani ligand ile herhangi bir etkileşime veya reaksiyona girmemelidir. Ligand ise saflaştırılacak moleküle spesifik davranmalı ve zayıf tersinir bağlarla bağlanmalıdır. Ligand ve hedef molekülün sterik engeller gibi bazı etkiler nedeniyle bağlanamadığı durumlarda uzatıcı kollar kullanılabilir. Uzatıcı kollar, ligand ve hedef molekülün bağlanmasını kolaylaştıran genellikle düz zincirli hidrokarbon türevleri olan küçük moleküllerdir [31].

Afinite kromatografisi pratik olarak uygulandığında saflaştırma işleminin üç basamakta tamamlandığı görülür. İlk aşamada hedef molekülü içeren numune kolondan (bir matrikse immobilize edilmiş liganddan oluşan sabit faz) uygun bir dengeleme (yıkama) tamponu ile geçirilir. İkinci aşamada hedef molekül sabit faza spesifik ve tersinir olarak bağlanır, ligand ile bağlanmayan türler kolonu terk eder. Son olarak hedef molekülün kolondan elüsyonu gerçekleştirilir. Bunun için afinite ortamına ya

kompetitif başka bir ligand ilave edilir ya da hareketli fazın iyonik şiddeti, pH' ı ya da polaritesi değiştirilir ve kolondan desorbe edilen biyomolekülün saf bir şekilde elde edilmesi sağlanır [32].

### 2.1.8. Mimik kromatografik materyaller

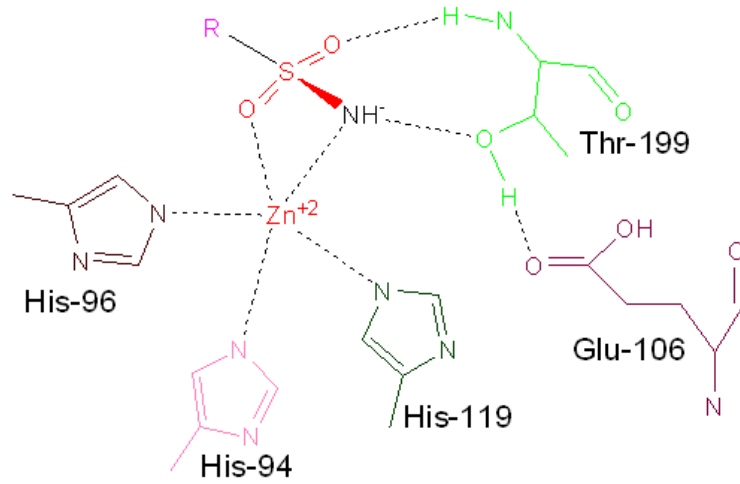
Enzimler, canlı sistemlerde benzersiz katalitik mikro ortamlar sunan oldukça etkili ve seçici tepkime katalizörleridir. Yapay bir katalizör ilk önce enzim yapıları ve işlevleri arasındaki ilişkileri taklit etmek ve anlamak için imal edilmiş ve enzimlerin benzersizliğinin yüksek katalitik etkinliğine nasıl katkıda bulunduğunu göstermektedir [33, 34]. Yapay katalizörlerin pragmatik kullanımı ile ilgili araştırmalar yavaş yavaş ısı istikrarsızlığı, organik çözücülerle uyumsuzluk gibi doğal enzimlerin kısıtlamalarını aşmak için bir yöntem olarak ucuz, kararlı ve yüksek etkili katalizörlerin hazırlanmasına kadar genişlemiştir. Son yıllarda siklodekstrin, metal kompleksleri, makromolekül iskeleleri (taç eteri ve porfirinler gibi), polimerler ve biyomoleküller (peptidler ve antikorlar gibi) de dahil olmak üzere farklı yapay katalizör türleri katalitik yetenekleri taklit etmek için inşa edilmiştir [35].

Mimik (yapay) enzimler, doğal enzimlerin işlevini taklit etmeyi amaçlayan biyomimetik kimyanın bir dalıdır [36]. Bir mimik enzim, bir enzimin moleküler yapısını, spektroskopik özelliklerini veya reaktivliğini modelleyen küçük bir molekül kompleksidir ve bazen biyolojik bulguları içeren kompleksler olarak da adlandırılır [37].

Kimyasal reaksiyonların enzim katalizi, yüksek seçicilikte gerçekleşir. Alt tabaka, enzim makromolekülünün aktif bölgesi olarak adlandırılan küçük bir bölümünde aktive edilir. Bu kısımda, substratın enzimdeki fonksiyonel gruplara yakın bir şekilde bağlanması kataliz basamağını oluşturur. Substrat bağlanması ile katalitik fonksiyonel grupları birleştirerek küçük moleküllerden benzer katalizörleri oluşturmak mümkündür.

CA enzimi inhibitörlerinden sülfonamid, hidrofilik bölgesine ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere sahiptir. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle R-SO<sub>2</sub>NH bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn<sup>+2</sup> ile iyonik bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle

inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur (Şekil 2.10). Sülfonamidin Treonin aminoasidi ile oluşturduğu hidrofilik etkileşimden yola çıkılarak, biyomimetik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde sülfonamidin, treonin ile arasındaki etkileşimi mimik etmek üzere sülfonamid ve MA-Thr [38] ön-organizasyonu sonrası çapraz bağlayıcılar eşliğinde kriyojel kolon sentezlenmiştir. Bu yöntem ile inhibitör ve mimik monomer bağlanarak, inhibitörün CA tanımlayıcı bölgesi ile afinite oluşturarak yeni bir mimik kromatografik materyal geliştirilmesi amaçlanmıştır.

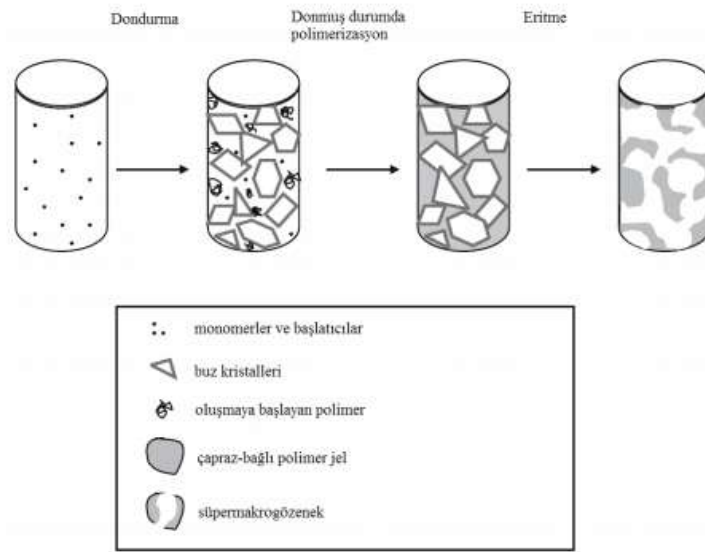


*Şekil 2.10. Sülfonamidin CA enzimi ve Treonin aminoasidi ile oluşturduğu etkileşimler*

### 2.1.9. Kriyojeller

“Kriyo, (cryo)” kelimesi eski yunancada “soğuk, buz” anlamlarına gelmektedir. Kriyojeller, monomerik veya polimerik başlatıcıların uygun çözücülerdeki çözeltilerinin dondurulması sırasında şekillenen, birbirine bağlantılı büyük gözeneklere sahip jel matrislerdir. Birbiri ile bağlantılı makro gözenekler ve süngerimsi morfoloji gibi özellikleri sayesinde difüzyonun etkin bir şekilde gerçekleşmesine ve nano veya mikro partiküllerin kütle transferine katkıda bulunurlar. Başka bir deyişle, gözenekli ve elastik yapıları sayesinde hareketli fazın kolondan geçmesi sırasında, kolonda oluşacak geri basıncı elimine edebilirler ve bu nedenle kromatografik sistemlerde kolon malzemesi olarak kullanıma uygundur. Kriyojellerin sahip olduğu bu avantaj özellikle biyomoleküllerin bozunmadan ve denatüre olmadan, kromatografik tekniklerle verimli bir şekilde saflaştırılmasına imkan sağlar [39, 40].

Kriyojellerin gözenek yapısı donma sıcaklığı, çözünen monomerlerin derişimi ve başlatıcı sistemin (amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametiletildiamin) bileşimi ile kontrol edilebilir [41]. Kimyasal reaksiyon (kriyojelleşme) hızının ve çözgen kristalizasyon hızının uygun şekilde kontrol edilmesi ile istenilen özelliklerde kriyojeller sentezlenebilir. Kriyojeller, büyüyen buz kristallerin porojen olarak ve erimeden sonra içten bağlı gözenekler için kalıp olarak davrandığı -10 ile -20 °C aralığındaki düşük sıcaklıklardaki sulu çözeltilerde hazırlanır. Reaksiyon karışımı donarken, donmuş monolitik buz kristalleri ve donmayan sıvı mikrofaz olarak adlandırılan donmamış bölge olmak üzere iki bölüm içerir. Kimyasal reaksiyon bu donmayan sıvı mikrofazda gerçekleşir. Reaktif içermeyen çözgen kristalleri donma sırasında büyür ve donmuş iskelet sistemi oluşuncaya kadar diğer kristaller ile kaynaşır (Şekil 2.11). Kriyojelleşmenin tamamlanmasından sonra erime ile sürekli makro gözenekli kanallara sahip bir sistem meydana gelmiş olur [39].



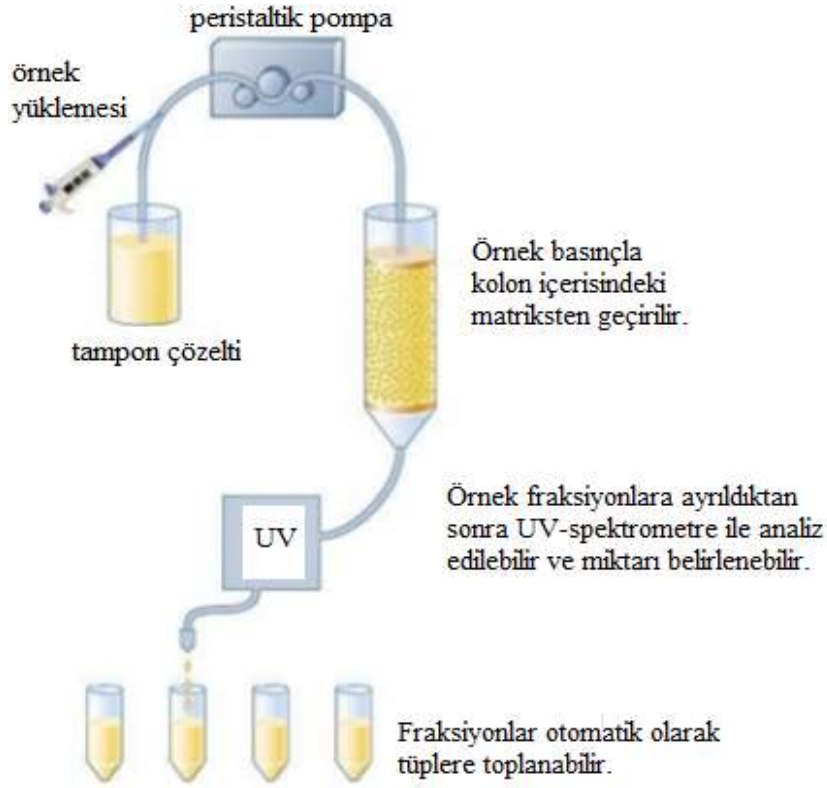
Şekil 2.11. Makrogözenekli kriyojellerin oluşumunun şematik gösterimi [2]

### 2.1.10. Hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC)

Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC), proteinlerin ayrıştırılması, saflaştırılması, nicel olarak belirlenmesi ve nitelendirilmesi, peptid vb. ayrımlarının gerçekleştirilmesi amacıyla geliştirilmiş sıvı kolon kromatografisi modelidir. Sistemin temeli basit bir kromatografik ayırma dayanmaktadır. Saflaştırılmak istenen enzim veya protein, uygun bir hareketli faz ile (tampon çözelti), hazırlanan kolonun üzerinden



geçirilir; kolona tutunmayan türler kolonu hemen terk ederken; kolona tersinir olarak tutunan numune elüsyon çözeltisi ile kolondan saf bir şekilde toplanır.



Şekil 2.12. FPLC cihazı ana bileşenleri [42]

Şekil 2.12. 'de görüldüğü gibi FPLC cihazı temel olarak; çözücü kabı, pompalar, enjeksiyon ünitesi, kolon, dedektör, fraksiyon toplama ünitesi ve bir de veri kaydediciden (bilgisayar) oluşmaktadır. Çözücü kaplarında kolonu şartlandırma çözeltisiyle, tutunan numuneyi kolondan sökme amaçlı elüsyon çözeltisi bulunur. Pompalar bu çözeltileri cihaza verilen komuta bağlı olarak önce enjeksiyon ünitesinden, ardından cihaza yüklenen numuneyi de alarak, belirli bir hızda kolondan geçirir. Kolonu sırayla terk eden türler dedektöre ulaşır ve belirli fraksiyonlarda örnek toplama ünitesindeki tüplerde toplanır. Bilgisayar ise dedektörden gelen sinyallere bağlı olarak oluşan piklerin kromatogram halinde görüntülenmesini sağlar.

FPLC kromatogramında gözlenen ilk pik kolona tutunmadan kolonu terk eden türlere aittir ve şartlandırma çözeltisiyle birlikte kolondan ayrılır. Kolon malzemesine afinite, hidrofobik etkileşim, iyonik yük ve büyüklük gibi çeşitli etkileşimlerle bağlanan

hedef molekül ise, sistemden elüsyon çözeltisinin geçirilmesi sonucu kolondan sökülür ve dedektöre ulaşır. Böylece kromatogramda ikinci bir pik daha oluşumu gözlenir. Bu pik FPLC cihazı ile tek basamakta saflaştırılan biyomoleküle aittir.

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kullanılan kimyasallar**

Bu çalışmada, sığır eritrositlerinden elde edilen ticari CA Sigma'dan temin edilmiştir. Enzim aktivitesi çalışmalarında kullanılan 4-nitrofenil asetat Sigma'dan; enzim örneklerinin protein içeriğinin belirlenmesinde faydalanılan Bradford Belirteci Amresco'dan, Sığır Serum Albumin (BSA) Sigma'dan alınmıştır. Jel elektroforez ve kriyojel kolon sentezleme işlemlerinde kullanılan Sodyum dodesilsülfat (SDS) Alfa Aesar'dan, N,N' Metilenbisakrilamid (MBA) Sigma Aldrich'den, Hidroksi etilmetakrilat (HEMA) Acros'dan, Amonyum persülfat (APS) ve Tetraetilmetilendiamin (TEMED) Sigma'dan, Coomassie Blue Appli Chem'den, Sulfonamid ve Akrilamid Merck' den temin edilmiştir. Çalışmaların kalan kısmında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup farklı firmalardan alınmıştır. Asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH) ve Sodyum hidroksit (NaOH) Riedel-de Haen firmasından, Metanol (CH<sub>3</sub>OH), Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), Sodyum fosfat monobazik, Potasyum fosfat dibazik Sigma' dan, Amonyum sülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Panreac'dan, Sodyum klorür (NaCl) Kimetsan'dan, Tris(hidroksimetil)aminometan ve Hidroklorik asit (HCl) Merck'den alınarak uygun koşullarda saklanmıştır. Saf su Thermo Scientific firmasından alınan saf su cihazından elde edilmiş olup iletkenliği 18 MΩ/cm'dir.

##### **3.1.2. Kullanılan cihazlar**

Bu çalışmada sentezlenen monomer ve polimerlerin karakterizasyonunda Perkin Elmer Spektrum 100 Fourier Dönüştürücü Infrared Spektrofotometre (FT-IR), yüzey morfolojisinin incelenmesinde Zeiss Ultra Plus Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve polimerlerin yüzey alanının belirlenmesinde Quantachrome Nova 2200E model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazı kullanılmıştır. Enzim saflaştırma işlemi AKTA P-920 UPC-900 model FPLC cihazı ile yapılmış, enzimin protein içeriği ve aktivitesi BioTek Synergy H1 ELISA Reader ile yapılan UV absorbans ölçümleri ile tayin edilmiştir. Saflaştırılan enzimin konformasyonel değişimleri Applied Photophysics-Chirascan Plus model CD Spektrofotometre cihazı ile belirlenmiştir. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) analizi ise Thermo Scientific

elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince hazırlanan tampon çözeltilerin pH' ları HANNA HI 2211 pH/ORP metre ile ölçülmüştür.

## **3.2. Metod**

### **3.2.1. Kriyojel temelli ayırma kolonlarının hazırlanması**

CA inhibitörlerinden sülfonamidin Treonin aminoasidi ile oluşturduğu etkileşim göz önünde bulundurularak biyomimetik bir yöntem geliştirilmesi amacıyla öncelikle MAThr fonksiyonel monomeri sentezlenmiştir. Ardından MAThr-sülfonamid ön organizasyonu sonrası biyomimetik kriyojel kolon hazırlanmıştır.

#### ***2.1.4.1. Metakrilamidotreonin (MAThr) fonksiyonel monomerinin sentezi***

MAThr monomerinin sentezi [38] için uygulanan prosedürde 5,52 mmol, 1 g treonin aminoasidi 1 M NaOH sulu çözeltisi içinde çözülmüştür. 25 mL 1,4-dioksan içerisinde 5,52 mmol, 1,033 g metakriloil benzotriazol (MA-Bt) çözülerek hazırlanan çözelti aminoasit çözeltisine yavaşça eklenerek oda sıcaklığına 10-20 dk. karıştırılmıştır. TLC ile reaksiyonun tamamlandığı belirlendikten sonra 1,4-dioksan vakum altında uçurulur. Geriye kalan kısım su ile seyreltildikten sonra etil asetat (3 x 50 mL) ile ekstrakte edilerek 1H-benzotriazol uzaklaştırılmıştır. Toplanan su fazı % 10 HCl sulu çözeltisi ile nötralize edilerek pH = 6-7 olarak ayarlanmıştır. Sulu faz döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmış ve % 87 verim ile MAThr beyaz mikrokristalleri elde edilmiştir. Sentezlenen monomer NMR ile karakterize edilmiştir.

#### ***2.1.4.2. MAThr-Sülfonamid biyomimetik kriyojel kolon hazırlanması***

260 µL HEMA monomeri ve 56,6 mg çapraz bağlayıcı MBA suda çözülerek 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından daha önce ön-organizasyon işlemine tabi tutulan MAThr-Sülfonamid (1:1, kütlece) 2000 ppm olacak şekilde çözeltiye ilave edilerek karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon 5 mL' lik şırınga içine alınarak bir süre buz banyosunda soğutulduktan sonra reaksiyon başlatıcı ajanlar; APS ve TEMED karışıma ilave edilmiştir. Polimerleşme başlayana kadar buz banyosunda tutulan karışım daha sonra -20 °C' de 16 saat bekletilmiş böylece polimerleşme tamamlanmıştır. Hazırlanan kolon yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra +4 dereceye alınarak kullanıma kadar C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH içerisinde saklanmıştır.

### **2.1.5. Karakterizasyon çalışmaları**

MAThr-Sulfonamid biyomimetik kriyojel kolonuna ait karakterizasyon çalışmaları sırasında kolonun su tutma kapasitesinin belirlenmesinde şişme testi yapılmıştır. Bunun yanı sıra FT-IR analizi, yüzey alanı ölçümü yapılmış ve yüzey morfolojisine ait görüntüler alınarak karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

#### **2.1.5.1. Şişme testi**

Bir önceki aşamada sentezlenen kriyojel kolonun [poli(HEMA- MAThr-Sulfonamid)] şişme kapasitesi aşağıdaki yöntem izlenerek belirlenmiştir.

Kuru polimer  $\pm 0.0001$  duyarlılıkla tartılmış ve 24 saat boyunca, oda sıcaklığında, 50 mL saf su içerisinde bekletilmiştir. Bir gün sonunda sudan çıkarılan polimerin yüzeyindeki su süzgeç kağıdı yardımı ile alındıktan sonra polimer tekrar tartılmıştır. Polimerin ilk ağırlığı ( $W_i$ ) ile son ağırlığı ( $W_s$ ) kaydedilerek ve Denklem 3.1 kullanılarak poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid)' in yüzde su tutma kapasitesi hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = \left[ \frac{W_s - W_i}{W_i} \right] \times 100 \quad (3.1.)$$

#### **2.1.5.2. FT-IR analizi**

poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) numunesinden yaklaşık 0.1-0.2 g kadar tartılmış, FT-IR cihazının bir modu ve parçası olan ATR başlığı ile her bir numunenin spektrumu alınmıştır.

#### **2.1.5.3. Yüzey alanı ölçümü**

Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) monoliti, BET cihazı kullanılarak sıvı azot sıcaklığında adsorbat olarak kullanılan azot gazıyla analize tabi tutulmuştur. Analiz sonucunda maddenin hangi basınçta ne kadar azot tuttuğunu gösteren “adsorpsiyon izotermi” elde edilerek kriyojelin spesifik yüzey alanı belirlenmiştir.

#### **2.1.5.4. Yüzey morfolojisi**

Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) monolitinden alınan bir kesit oda sıcaklığında kurutulmuş SEM cihazının örnek haznesine yerleştirilmiş ve vakum altında altın tabakası ile kaplanmıştır. Ardından taramalı elektron mikroskobu ile polimerin yüzey morfolojisine ait görüntüler alınmıştır.

### 2.1.6. Enzim üretimi ve ön deriştirilmesi

Koyun karaciğerinden elde edilen homojenat pH 7,5 Tris tamponunda 4 °C' de 10000 rpm devirle 30 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Homojenatın içerdiği proteinler % 55-70 aralığında (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile gradientli olarak çöktürülerek ortamdan ayrılmıştır.

### 2.1.7. Enzim saflaştırılması

Koyun karaciğerinden izole edilen poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) bağlı kriyojel kolonu üzerinden FPLC sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır (Şekil 3.1.). Kolonu yıkama, şartlandırma ve numuneyi kolona yükleme çözeltisi olarak 200 mM pH 6,8 fosfat tamponu, enzimin kolondan desorpsiyonunu sağlamak için ise 1 M NaCl içeren 200 mM pH 6,8 fosfat tamponu kullanılmıştır.



*Şekil 3.1. Çalışmalarda kullanılan FPLC cihazı*

### 2.1.8. Enzimin protein içeriği ve aktivite tayini

Koyun karaciğerinden izole edilen ham ekstrakt ve tuzla çöktürme sonrası deriştirilen örneklerin protein içeriği Bradford yöntemi [43] kullanılarak aşağıda özetlenen prosedüre göre belirlenmiştir.

Bu amaçla; Bradford belirteci ile 1:10 oranında, 10 dakika boyunca etkileştirilen numunelerin 595 nm' de UV absorbans ölçümleri yapılmıştır. Farklı derişimlerdeki BSA standart çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinin denkleminde ( $y=mx+n$ )

yola çıkılarak absorbanı bilinen numunelerin (y) içerdikleri protein miktarı (x) belirlenmiştir.

CA enziminin aktivitesi iki şekilde ölçülebilmektedir; birincisi, CA'nın fizyolojik aktivitesi olan CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesidir. İkincisi ise in vitro şartlarda gerçekleştirdiği spektrofotometrik olarak takip edilebilen esteraz aktivitesidir.

CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi [44], CO<sub>2</sub>'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> iyonundan ileri gelen pH değişimi (pH 8,3'ten 6,3'e düşmesi) sırasında geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

$$\text{units /mL enzyme} = (t_{\text{kör}} - t_{\text{test}}) / t_{\text{test}} \times V_{\text{enzim çözeltisi}} \quad (3.2.)$$

CA'nın esteraz aktivitesi [45], substratı olan p-nitrofenilasetatın p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz reaksiyonun 348 nm dalgaboyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

$$\text{Enzim Ünitesi} \left( \frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{(A_{\text{ü}} - A_0) \times 165 \times \text{df}}{50,07 \times \frac{1}{2} \times 10 \times 30} \quad (3.3.)$$

A<sub>ü</sub>: Ürünün absorbanı

A<sub>0</sub>: Kör örneğin absorbanı

df: Seyreltme Faktörü

50,07: Ürünün Ekstinksiyon Katsayısı

10 : Karışımdaki enzim hacmi (µL)

30: Reaksiyon süresi (saniye)

#### **2.1.8.1. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler ve kinetik incelemeler**

Saflaştırılan CA'nın aktivitesi, farklı pH (a) ve sıcaklık (b) aralıkları ile farklı enzim (c) ve substrat (d) derişimlerinde bölüm 3.2.1.' de açıklanan yöntemle ölçülmüştür.

- a) pH' ın enzimatik reaksiyonun hızına etkisinin incelenmesi için pH 3-9 aralığında hazırlanan tampon çözeltilerle CA aktivitesi tayin edilmiştir.
- b) Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisinin incelenmesi için 25-45 °C sıcaklık aralığında enzim aktivitesi ölçülmüştür.

- c) Saflaştırılan enzimin protein derişimi Bradford yöntemi ile belirlendikten sonra enzim örneği tayin sınırları içerisinde belirli oranlarda seyreltilmiş ve enzimin farklı derişimlerinin reaksiyon hızı üzerine etkisi incelenmiştir.
- d) Sabit sıcaklık, pH ve enzim derişiminde, substrat (p-NPA) derişimi gittikçe artırılarak çözeltiler hazırlanmış ve farklı substrat derişimlerine karşı enzimin aktivitesi ölçülerek reaksiyon hızındaki değişimler belirlenmiştir.

Enzim kinetiği çalışmaları dahilinde ise enzime ait  $V_{mak}$  ve  $K_m$  değerleri belirlenmiştir. Bunun için substrat derişimine karşı çizilen enzim aktivitesi grafiklerinden yararlanılmıştır (Michaelis Menten ve Lineweaver Burk). Bu grafiklere göre; enzimin maksimum aktivite gösterdiği değer CA enziminin maksimum hızını ( $V_{mak}$ ); enzimin maksimum hızının yarısına karşılık gelen substrat derişimi de  $K_m$  değerini vermektedir.  $K_m$ ; Menten sabiti olup enzimin substratına olan ilgisinin bir ölçüsüdür.

### 2.1.9. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi

Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi, moleküllere ait dairesele spektrumları belirli dalga boylarında ölçen spektroskopik bir yöntemdir. CD, dairesele polarize ışığın sola doğru olan absorpsiyonu ile sağa doğru olan absorpsiyonu arasındaki farktır.

$$\Delta A(\lambda) = A(\lambda)_{sol\ yönlü\ polarize\ ışık} - A(\lambda)_{sağ\ yönlü\ polarize\ ışık} \quad (3.4.)$$

( $\lambda$  = Dalga boyu)

CD spektroskopisi, proteinlerin ikincil yapılarının sıcaklık, pH değişimleri ve ortam koşullarına bağlı olarak değişimleri ve diğer moleküllerle etkileşimini incelemek amacıyla geliştirilmiş olup, makro moleküllerin yapısal, kinetik ve termodinamik özellikleri hakkında bilgi vermektedir. Spektrofotometrik ölçümler, elektronik geçişlerin gözlemlendiği elektromanyetik spektrumun görünür ve UV bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Ölçümler, proteinlerin ikincil yapılarına ait  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -



katlanmaları ve düzensiz sarmal yapılarının yanı sıra, tersiyer yapılarındaki aromatik grupların da varlığını gösteren bilgiler vermektedir.

CD spektroskopisinin genellikle biyomoleküllere uygulanmasının nedeni, moleküllerin sağa ve sola çevirici kiralitelerinden ileri gelir. Proteinlerin konformasyon değişikliklerinin ifade edilmesinde CD spektroskopisi oldukça önem taşımaktadır. Örneğin, sıcaklık, denatüre edici ajanlar ya da bu ajanların derişimleriyle proteinlerin ikincil yapılarındaki değişiklikleri incelemek amacıyla kullanımı yaygındır [46].

Bu çalışmada, koyun karaciğerinden poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) kriyojel kolon ile saflaştırılan CA enziminin CD spektroskopisi ile ticari CA enziminin CD spektroskopisi karşılaştırılarak enzimin saflaştırma işlemi sonrasında aktifliği belirlenmiştir.

#### **2.1.10. SDS-PAGE analizi**

SDS-PAGE analizi için öncelikle 29:1 oranında akrilamid-bis monomerleri ile, TEMED, APS, SDS ve pH 8.8 Tris tamponu kullanılarak % 10' luk poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Analizi yapılacak numunelerden 15' er  $\mu\text{L}$  alınarak her biri 15  $\mu\text{L}$  Coomassie Blue G boyası ile karıştırılarak, karışımın homojen bir şekilde gerçekleşmesi için numuneler bir süre ısıtılmıştır. Ardından tanka dökülen jelde uygun bir tarak ile eşit hacimde kuyucuklar açılmış, tank tampon çözelti ile doldurulmuş, numuneler açılan kuyucuklar üzerinden jele yüklenmiştir. Enzim örneklerinin jelde ilerlemesi için 15-35 mA akım kullanılmıştır. Analiz sonunda tanktan çıkarılan jel önce Coomassie Blue G boya çözeltisi içinde bekletilmiş daha sonra proteinlere ait bantların görüntülenmesi için belirli aralıklarla yıkama çözeltisi (35 mL asetik asit + 25 mL metanol) ile yıkanmıştır. Saflaştırılan CA'nın saflığı ve moleköl ağırlığı bu örneğe ait bant ile ticari CA'ya ait bantın karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MAThr ve Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid)'in karakterizasyonu

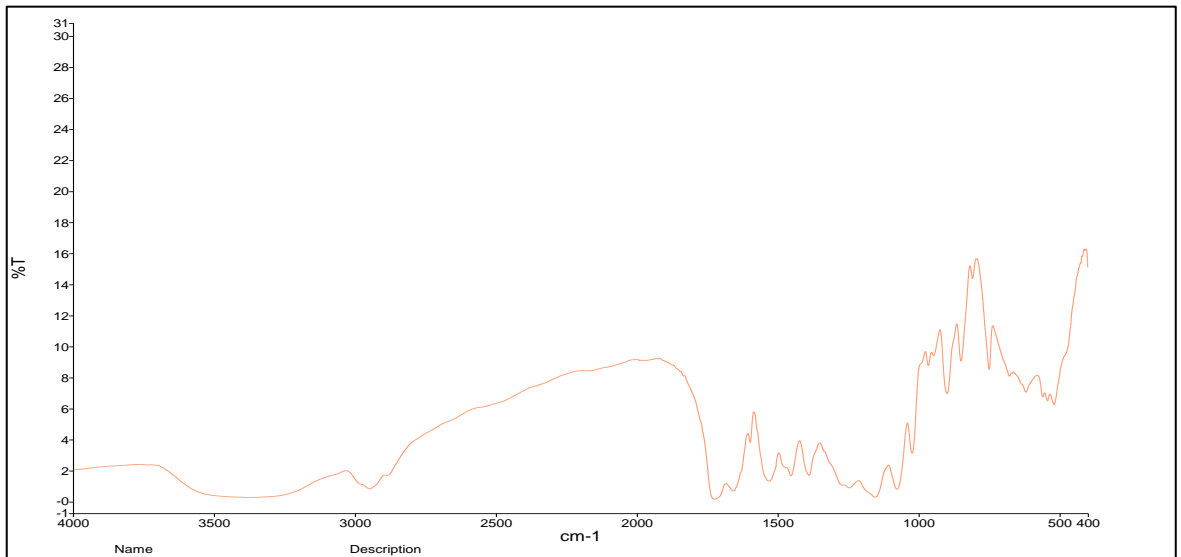
Biyomimetik olarak geliştirilen kriyojel kolonun karakterizasyon çalışmalarında öncelikle MAThr monomerine ait NMR spektrumu alınarak yorumlanmıştır. Ardından hazırlanan Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) kriyojelinin FT-IR spektrumu alınmış ve kolonun şişme testi, BET ve SEM analizleri yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

#### 4.1.1. MAThr monomerine ait NMR spektrumu

MAThr monomeri % 87 verim alınarak sentezlenmiştir. Sentezlenen monomerin 500 MHz' de  $^1\text{H}$  NMR spektrumuna göre, 7.20'de N-H, 5.67'de  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$ , 5.33'de  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$ , 3.90'da  $\text{HOCH}_2-\text{CH}-\text{NH}$ , 3.85'de  $\text{HOCH}(\text{CH}_3)-\text{CH}-\text{NH}$ , 1.90'da  $\text{CH}_3$ , 1.79'da  $\text{HOCH}(\text{CH}_3)-\text{CH}$ , 0.90'da  $\text{HOCH}(\text{CH}_3)-\text{CH}$  fonksiyonel gruplarındaki  $^1\text{H}$  atomlarını ifade eden pikler belirlenmiştir.

#### 4.1.2. Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid)'in FT-IR spektrumu

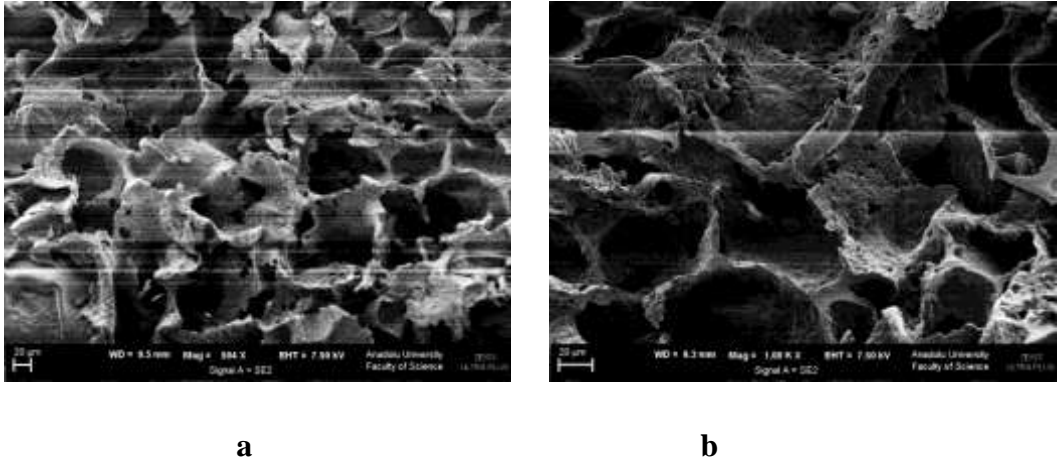
Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) kriyojelinde (Şekil 4.1)  $3200\text{ cm}^{-1}$  (-OH) ve  $1151\text{ cm}^{-1}$  (-CO-O-C) frekanslarında HEMA' daki fonksiyonel gruplara ait pikler görülmektedir. Bu pikler dışında  $1370\text{ cm}^{-1}$ 'de sulfonamid titreşimine ait karakteristik bant gözlenmektedir.



*Şekil 4.1. Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid)' in FT-IR spektrumu*

#### 4.1.3. MAThr-Sulfonamid biyomimetik kriyojel kolonun yüzey morfolojisi

Poli(HEMA-MAThr-Sulfoamid) monolitinin yüzey morfolojisi SEM cihazı kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.2' de SEM görüntüleri verilen çapraz bağlı polimerik yapı oldukça geniş gözeneklere ve bu gözenekler nedeniyle de oldukça büyük yüzey alanına sahiptir.



*Şekil 4.2. Poli(HEMA-MAThr-Sulfoamid)' in SEM görüntüleri (a, 504 X büyütme gücü; b, 1000 X büyütme gücü)*

Kolona 504 X ve 1000 X büyütme güçleri uygulandığında yaklaşık 20-80  $\mu\text{m}$  çap aralığında gözeneklere sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.2). Gözenekler birbirlerine bağlı ve kriyojel kolon üzerinde makro gözeneklerin yoğun olarak bulunduğu gözlenmektedir.

#### 4.1.4. MAThr-Sulfonamid biyomimetik kriyojel kolonun şişme testi

Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) monoliti hidrofilik özellik gösteren ve çapraz bağlar içeren bir polimerdir. Polimerik yapıda olması nedeniyle yüksek molekül ağırlığına sahiptir ve suda çözünmez. Ancak çapraz bağ derecesi ile hidrofilitesine bağlı olarak yapısına su alır ve şişme özelliği gösterir. Bu çalışmada sentezlenen kriyojel kolonun su tutma kapasitesi % 598,64 olarak hesaplanmıştır. Yüksek şişme derecesine sahip kriyojeller, aynı zamanda yüksek makro gözenekliliğe sahiptir. Bu durum, makro

gözeneklilik artışı ile bu gözeneklere adsorplanan su miktarının da fazla olması ile açıklanabilir.

#### **4.1.5. MAThr-Sulfonamid biyomimetik kriyojel kolonun yüzey alanı ölçümü**

Poli(HEMA-MAThr-Sulfoamid) kriyojel kolonunun BET cihazı ile 10 noktada yapılan spesifik yüzey alanı ölçümü sonucu kolonun spesifik yüzey alanı  $78,2 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  polimer bulunmuştur. Kriyojelin adsorpsiyon izotermi elde edilerek yapılan ölçümler, kolona farklı basınçlarda tutunan azot miktarı ve azot atomlarının çaplarına bağlı olarak hesaplanmıştır. Belirlenen değer, geliştirilen kriyojelin makrogözenekli yapısını belirtmektedir.

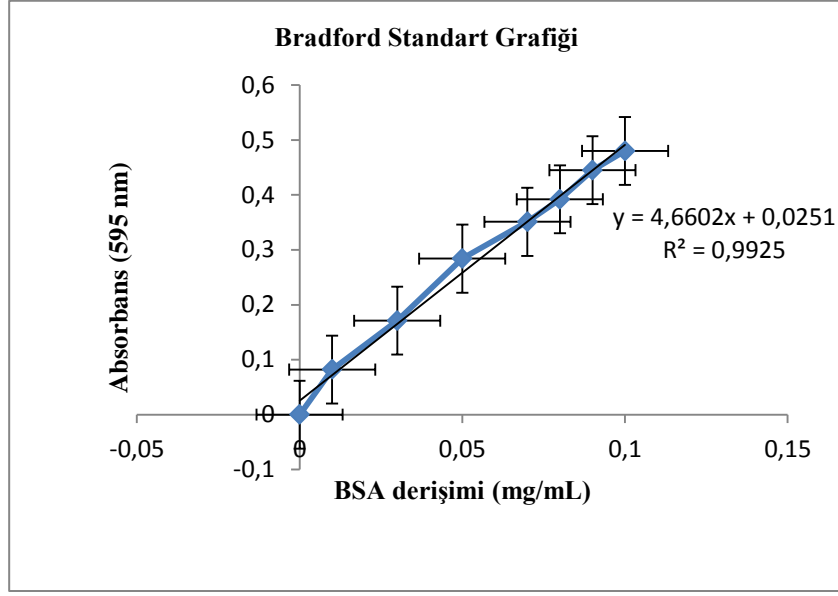
## **4.2. Enzim Örneklerinin Protein İçeriği ve Aktivite Tayini**

### **4.2.1. Protein içeriği tayini**

Koyun karaciğerinden elde edilen ham ekstrakt ile % 55 ve % 70 oranında  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürmesi yapılmış örneklerin Bradford yöntemiyle içerdikleri protein miktarı belirlenmiştir.

Bradford metodu herhangi bir örnek içerisindeki protein miktarının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Bradford ayracı olarak Commassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanılır ve maksimum absorpsiyon dalga boyu 465 nm (kırmızı) olan boya, proteinlerle bağlanarak maksimum absorpsiyonunu 595 nm' ye (mavi) kaydırmaktadır. Bu yöntemde enzim örneklerine boya belirteci eklendikten 2 dakika sonra renk oluşumu tamamlanır. Oluşan renk 1 saat kararlıdır.

Bu çalışmada, Bradford metoduna göre, fosfat tamponu içinde farklı derişimlerde standart protein (sığır serum albumin) içeren örnekler hazırlanmıştır ve bu örnekler Bradford belirteci ile 1:10 oranında reaksiyona sokularak maksimum dalgaboyu olan 595 nm 'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu veriler kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuş (Şekil 4.3.) ve saflaştırılan CA enziminin protein içeriği bu grafiğe göre belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Bradford standart grafiği

Şekildeki Bradford standart grafiğine Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) kriyojel kolonu ile amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından afinite sonrası saflaştırılan CA enziminin protein içeriği  $0,058 \text{ mgmL}^{-1}$  olarak tayin edilmiştir.

#### 4.2.2. Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesi tayini

$\text{CO}_2$ 'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan  $\text{H}^+$  iyonundan kaynaklanan pH değişiminin gözlemlendiği sırada geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanarak CA enzim aktivitesi 4,5 ünite/mL enzim olarak hesaplanmıştır.

$$\text{ünite /mL enzim} = (t_{\text{kör}} - t_{\text{test}}) / t_{\text{test}} \times V_{\text{enzim çözeltisi}} \quad (3.2)$$

$t_{\text{test}}$  : pH'ın 8,3'ten 6,3'e düşmesi için geçen süre

$$t_{\text{test}} = 10 \text{ s}$$

$$t_{\text{kör}} = 100 \text{ s}$$

$$V_{\text{enzim çözeltisi}} = 0,5 \text{ mL}$$

$$\text{CA enzim aktivitesi} = 4,5 \text{ ünite/mL enzim}$$

#### 4.3. Enzim Saflaştırılması

CA enziminin aktif bölgesinde inhibitörü olan sülfonamidi tanımlayıcı özelliğinden yola çıkılarak mimik kromatografik materyal olarak geliştirilen Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) biyomimetik kriyojel kolonu sentezlenerek koyun karaciğerinden FPLC cihazı saflaştırma gerçekleştirilmiş, enzim aktivitesini etkileyen faktörler incelenerek optimum şartlar belirlenmiştir. Saflaştırma sonrası CA ortamda bulunan diğer moleküllerden başarılı bir şekilde ayrılmış olup FPLC analizi sonrası toplanan numunenin protein içeriği ham ekstrakt ve amonyum sülfat çöktürülmüş örneklerle göre daha düşük, aktivitesi ise bu örneklerle göre daha yüksektir (Çizelge 4.1). Afinite kromatografisi ile saflaştırma sonrası enzimin spesifik aktivitesinde belirgin bir artış gözlenmiştir.

*Çizelge 4.1. CA'ya ait saflaştırma tablosu*

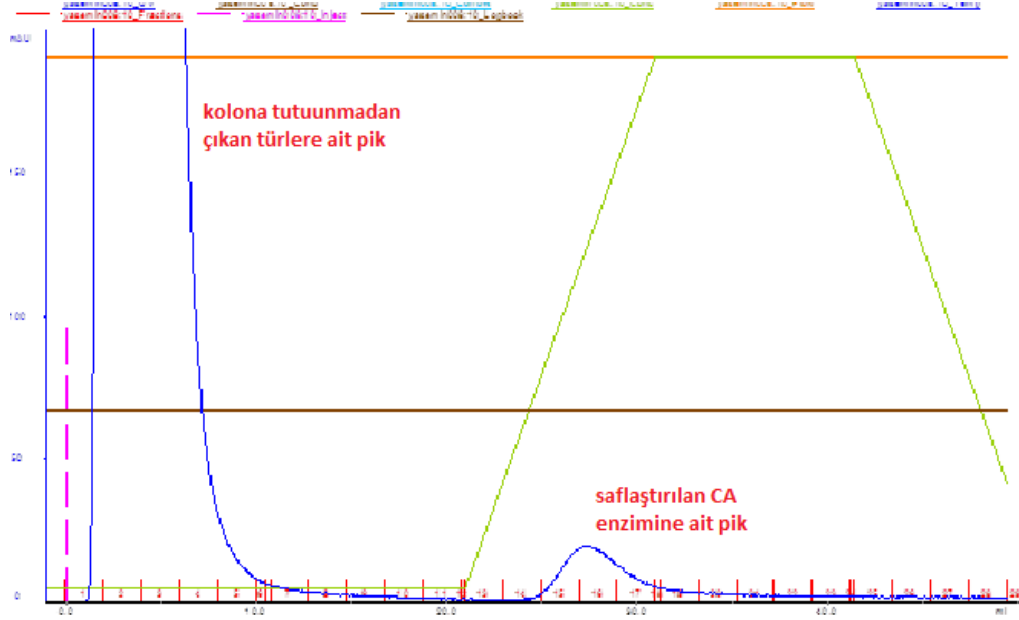
Numune	Toplam Protein (µg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (Umg <sup>-1</sup> )
Ham ekstrakt	3540	56,64 x 10 <sup>-3</sup>	0,016
% 55-70 Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası	1141	28,52 x 10 <sup>-3</sup>	0,025
Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) kriyojeli ile saflaştırma sonrası	58	2,61 x 10 <sup>-3</sup>	0,045

#### 4.3.1. FPLC analizi

Koyun karaciğerinden izole edilen CA, afinite kromatografisi ile FPLC cihazı kullanılarak saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisinde, saflaştırılmak istenen (hedef) enzimin spesifik olarak ilgi gösterdiği uygun bir molekül ligand olarak matrikse tutturulur ve enzimi bulunduran numune bu kolon üzerinden uygun pH' da hazırlanmış tampon çözelti ile geçirilir. Bu çalışmada CA enziminin inhibitörü olan sulfonamid bağlı kriyojel kolonlar hazırlanmıştır. CA enzimi sulfonamide karşı gösterdiği biyomimetik ve moleküler tanıma sonucu kolona tutunmuştur.

Şekil 4.4. 'teki kromatogramda görülen ilk pik kolona tutunmadan çıkan türleri ifade etmektedir. Elüsyon çözeltisi gradientli olarak kolondan geçirilmeye başlandıktan

sonra ise (yeşil çizgi kolondan geçen elüsyon çözeltisinin derişimini ifade etmektedir); kolona tersinir ve zayıf bağlarla tutunmuş olan CA enzimi kolondan ayrılmıştır. Kromatogramda görülen ikinci pik; saflaştırılan CA enzimine aittir.



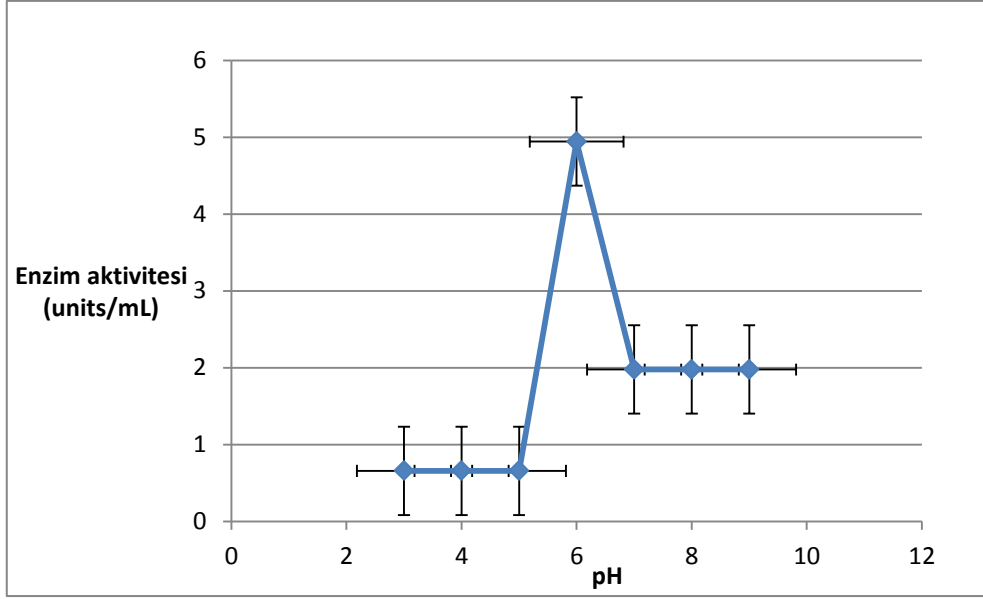
Şekil 4.4. Poli(HEMA-MATHr- Sulfonamid kriyojel kolonu ile CA saflaştırılmasına ait kromatogram

### 4.3.2. CA aktivitesini etkileyen faktörlerin incelenmesi

Saflaştırılan CA enziminin aktivitesini etkileyen faktörler, enzimin esteraz aktivite metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu metod, CA enziminin substratı olan p-nitrofenilasetatı 348 nm 'de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz etmesi esasına dayanmaktadır.

#### 4.3.2.1. pH etkisi

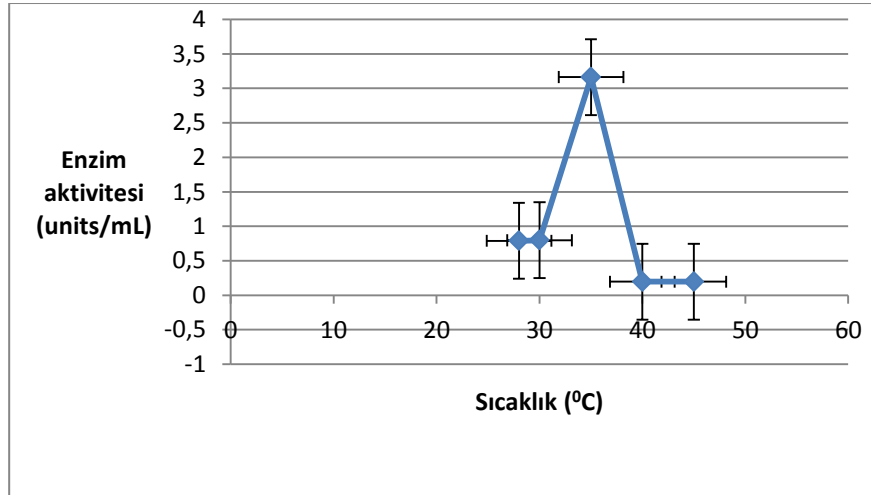
Saflaştırılan CA enziminin aktivitesi farklı pH' larda ölçülmüştür (Şekil 4.5.) pH 3-9 arası tampon çözeltiler kullanılarak yapılan analizlerde, enzimin her bir pH değerinde farklı aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri o enzim için optimum pH' dır. CA enzimi pH 6' da maksimum aktiviteye ulaşmaktadır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi

#### 4.3.2.2. Sıcaklık etkisi

Her enzimin maksimum verimle çalıştığı bir optimum sıcaklık değeri bulunmaktadır. Saflaştırılan CA enziminin 28-30-35-40- 45 °C aralığında aktivitesi ölçülmüş; enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 35 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).

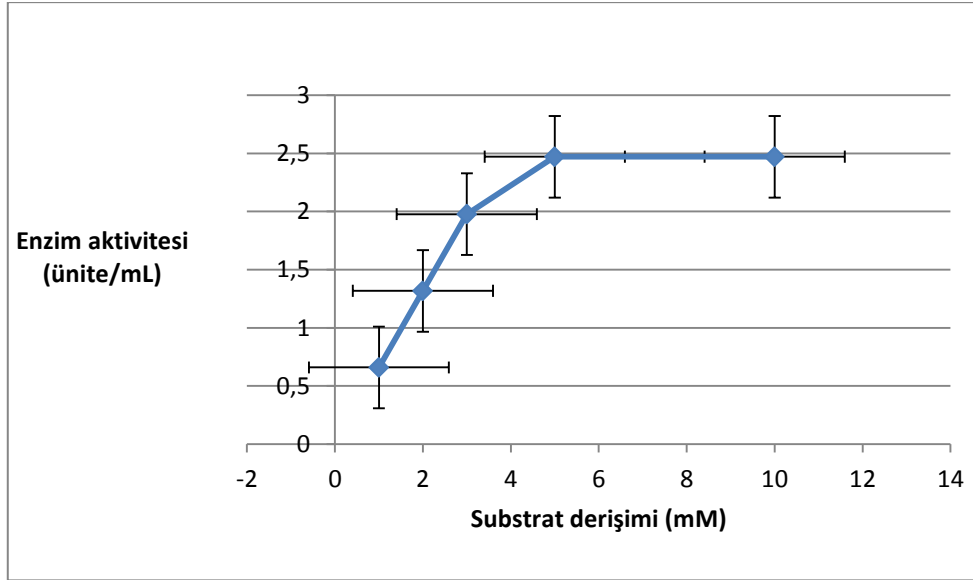


Şekil 4.6. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi



#### 4.3.2.3. Substrat derişimi etkisi

Düşük substrat derişimlerinde reaksiyon ortamındaki substrat miktarı arttıkça enzim daha fazla substrat bağlayarak enzim aktivitesi artış gösterecektir. Ancak yüksek substrat derişimlerinde, enzimin aktif bölgesi substrat molekülleriyle tamamen doygunluğa ulaşmış olacağından substrat miktarındaki artış enzim aktivitesine etki etmez ve reaksiyon sabit bir hızla ilerlemeye devam eder. 1-10 mM aralığındaki substrat derişimlerinde yapılan çalışmalar sonucunda 10 mM substrat derişiminde maksimum enzim aktivitesi gözlenmiş olup, bu nokta itibariyle substrat derişimi arttıkça enzim aktivitesinin stabil kaldığı görülmektedir (Şekil 4.7).

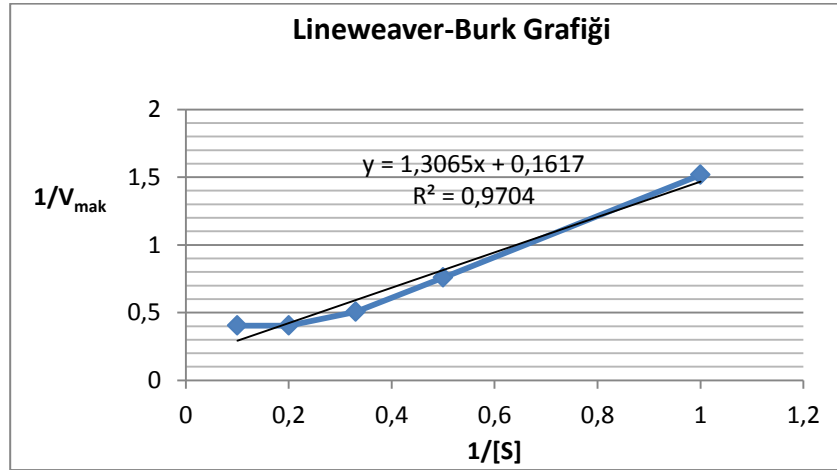


Şekil 4.7. Substrat derişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi

#### 4.3.3. CA'nın $V_{\text{mak}}$ ve $K_m$ değerlerinin belirlenmesi

CA enziminin farklı substrat derişimlerine karşı aktivitesi belirlenmiştir. Enzim bağlayabileceği maksimum miktarda substratı bağladığında reaksiyon maksimum hıza ulaşmakta ve ulaşılan değer CA enzimi için  $V_{\text{mak}}$  olmaktadır.  $V_{\text{mak}}/2$ 'ye karşılık gelen substrat derişimi ise  $K_m$  olarak ifade edilmektedir. Bu değerler; substrat derişimine karşı çizilen enzim aktivitesi veya reaksiyon hızı grafiği (Michaelis-Menten) parabolik özellikte olduğundan Lineweaver-Burk grafiği çizilerek belirlenmektedir. Şekil 4.8.'de yer alan verilere göre  $V_{\text{mak}}$  değeri  $6,184 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $K_m$  değeri ise  $8,079 \text{ mM}$  olarak

bulunmuştur.  $K_m$ , enzimin aktif bölgelerinin yarısının doldurulduğu substrat derişimidir. Yapılan çalışmalar sonucunda  $K_m$  değerleri 0.000001 ile 0.1 M arasında değerler almaktadır.  $K_m$ , enzimin substrata olan afinitesini göstermektedir [47].  $K_m$ , enzim ile substratının karşılıklı etkileşimini karakterize eden sabit bir değerdir.  $K_m$  değeri düşük olan bir enzim, substratı için yüksek bir afinite gösterir ve enzim düşük bir substrat derişiminde maksimum hıza değerinde doyunluğa ulaşır.  $K_m$  değeri  $10^{-6}$  M ( $10^{-3}$  mM) ve daha düşük olan enzimler yüksek afiniteli enzimlerdir.  $K_m$  değeri büyük olan enzim, substratı için düşük bir afinite gösterir ve enzimin yarı doyunluğa ulaşması için daha fazla substrat derişimi gerekmektedir.  $V_{mak}$  değeri ise, enzimin substrata doydugu ve katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir. Buna göre, literatürdeki değerler ile karşılaştırıldığında yeni bir biyomimetik kolon materyali olan Poli(HEMA-MATHr-Sulfonamid) geliştirilerek saflaştırılan CA enziminin, substratı olan 4-nitrofenilasetata olan afinitesi oldukça yüksek olup, düşük substrat derişimlerinde maksimum hıza ulaşıldığı yani enzimin doymuş olduğu görülmektedir.

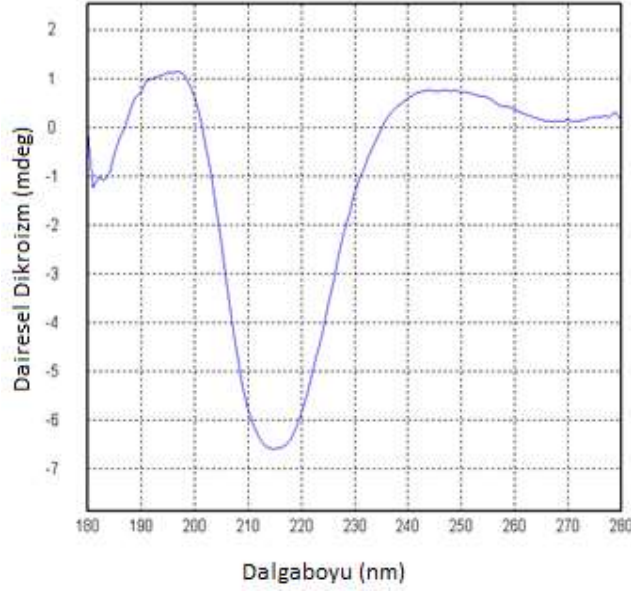


Şekil 4.8. Lineweaver-Burk grafiği;  $V_{mak}$  ve  $K_m$  değerleri

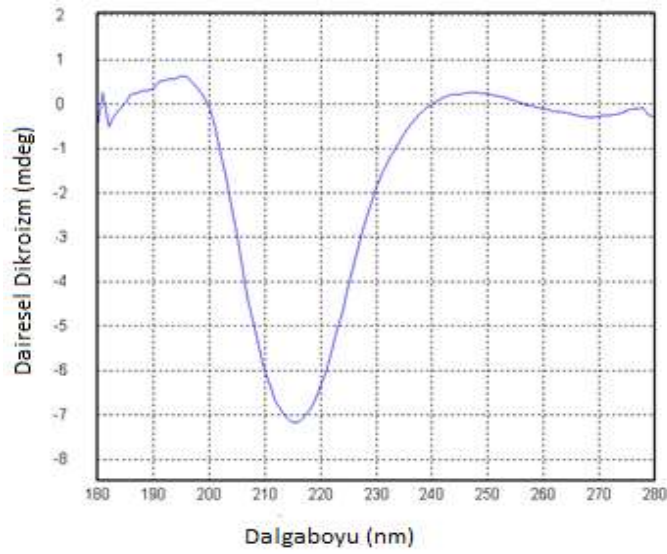
#### 4.4. CD Spektrumu

Ticari CA ve saflaştırılan CA enziminin CD spektroskopisi ile gerçekleştirilen çalışmalarda, ticari CA enzimi için (Şekil 4.9.A.), 190-200 nm ve 210-230 nm arasında gelen pik CA enziminin ikincil yapısındaki  $\alpha$ -helix katlanmalarını, saflaştırılan CA enziminin (Şekil 4.9.B) CD spektrumunda ise, 190-200 nm ve 210-230 nm arasında gelen pikler saf yapıda da  $\alpha$ -helix katlanmasının bozunmadığını dolayısıyla enzimin saflaştırma sonrasında da aktif olduğunu kanıtlamaktadır. Bu sonuç, geliştirilen kolonun

bu enzimin saflaştırılması için uygun olduğunu göstermekte ve aktivite deneylerini desteklemektedir.



**A**



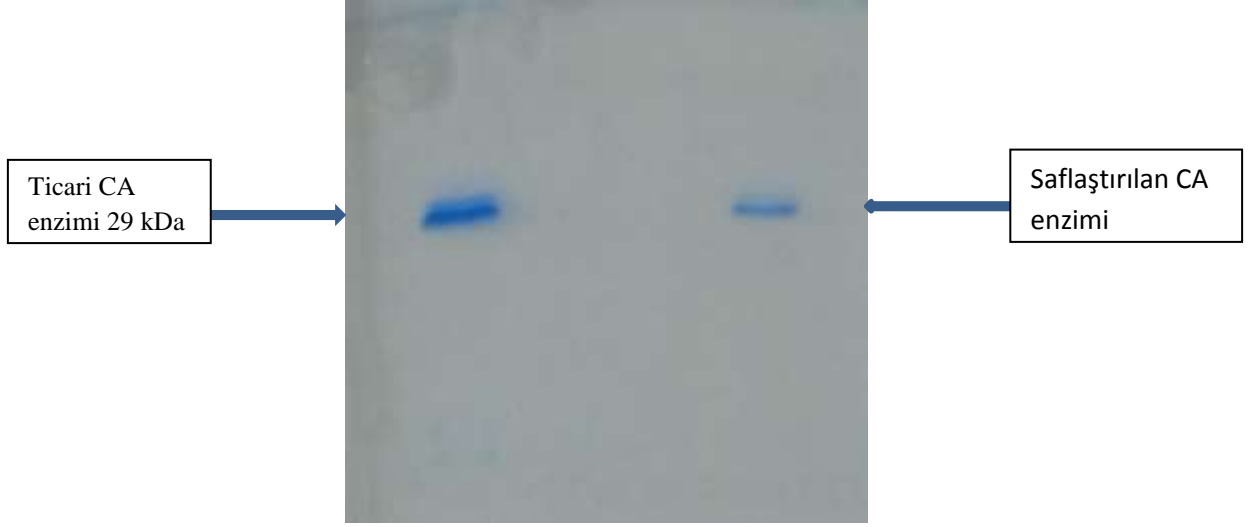
**B**

*Şekil 4.9. A. Ticari CA enzimine ait CD spektrumu, B. Saflaştırılan CA enzimine ait CD spektrumu*

#### 4.5. SDS-PAGE Analizi

Koyun karaciğerinden izole edilerek afinite kromatografisi ile saflaştırılan CA enziminin saflığı SDS-PAGE analizi yapılarak belirlenmiştir. Örnek %10' luk poliakrilamid jelde, denatüre edici ajan SDS varlığında yürütülmüş ve tek bir bant

gözenmiştir. Bu bant ticari CA enzime ait bant ile karşılaştırıldığında aynı yerde geldiği gözlenmiştir. Buradan, saflaştırılan CA enziminin molekül ağırlığının yaklaşık olarak 29 kDa olduğu sonucuna varılabilir.



*Şekil 4.10. SDS-PAGE görüntüsü*

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada CA enzimi, yeni bir biyomimetik kromatografi materyali olan Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) kriyojel kolonu geliştirilerek koyun karaciğeri dokusundan saflaştırılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında sentezlenen MAThr monomeri ile CA inhibitörlerinden biri olan sülfonamidin ön-organizasyonu gerçekleştirilerek, çapraz bağlayıcı MBA varlığında HEMA monomeri ile dondurma işlemi ile polimerleştirilerek biyomimetik afinite kolonu hazırlanmıştır. Boşluklu yapı ve geniş gözeneklere sahip kriyojel kolonlar, kromatografik sistemlerde düşük basınçlarda çalışmaya olanak tanıyarak enzimin bozunmadan saflaştırılmasını sağlamaktadır. Poli(HEMA-MAThr-Sülfonamid) kriyojel kolonunun SEM görüntüleri incelendiğinde gözeneklerin birbirlerine bağlı ve yoğun olarak bulunduğu gözlenmiştir. Kriyojel kolonun BET cihazı ile yapılan spesifik yüzey alanı ölçümleri polimerin yüzey alanının  $78,2 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  polimer olduğunu göstermiştir. Kolonun FT-IR analizi ise CA enzimini tanımlayıcı ve hidrofobik etkileşimlerle  $\text{Zn}^{+2}$ , ye bağlanan sülfonamide ait karakteristik pikleri göstermektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise koyun karaciğer dokusundan CA enzimi izole edilerek, FPLC ile yapılan tek enjeksiyon kromatografik saflaştırma sonucu elde edilen enzim örneğinin saflığı, aktivite ölçümleri ve SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi 4,5 ünite/mL enzim olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE analizi sonucu jelde gözlenen ticari örneğe ait bant ile saflaştırılan örneğe ait bant yaklaşık olarak aynı yerde gelmiştir.

Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 29 kDa olarak belirlenmiş olup, tek bant gözlenmesi enzim saflaştırma işleminin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Ticari ve saflaştırılan enzimin CD spektrumları incelendiğinde enzimin saflaştırma sonrasında bozunmadığı ve aktif kaldığı görülmüştür.

Çalışmanın son aşamasında; enzim aktivitesini etkileyen faktörler incelenmiş, enzime ait  $V_{\text{mak}}$  ve  $K_m$  değerleri bulunmuştur. CA enzimi maksimum aktiviteyi  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta, pH 6 ortamında göstermiştir. Enzim için Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanan  $V_{\text{mak}}$  değeri  $6,184 \mu\text{moldak}^{-1}$ ,  $K_m$  değeri ise  $8,079 \text{ mM}$  şeklindedir.  $K_m$  değeri enzimin maksimum hızının yarısına karşılık gelen substrat derişimini ifade

etmektedir ve bir enzimin substratına olan ilgisini göstermektedir.  $K_m$  değerleri geniş bir aralıktadır (0.000001 - 0.1 M) ve enzim için substratın bağlanma ve afinite kuvvetini temsil eder [47].  $K_m$ , enzimin substratına karşı olan ilgisini gösteren ve bir enzim için enzim ile substratın karşılıklı etkileşimini karakterize eden sabit bir değerdir.  $K_m$  değeri düşük olan bir enzim, substratı için yüksek bir afinite gösterir ve enzim düşük bir substrat derişiminde doyararak maksimum hıza ulaşır.  $K_m$  değeri  $10^{-6}$  M ( $10^{-3}$  mM) ve daha düşük olan enzimler yüksek afiniteli enzimlerdir ve bu enzimler metabolizma için büyük önemi taşır.  $K_m$  değeri büyük olan enzim, substratı için düşük bir afinite gösterir ve enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat derişimi gerekmektedir. Substrat derişiminin artmasıyla enzim moleküllerinin hepsinin ES kompleksi oluşturduğu noktada reaksiyon hızı maksimumdur ( $V_{mak}$ ) ve bu noktadan sonra substrat derişiminin artışı ile reaksiyon hızı artmaz.  $V_{mak}$  değeri enzimin substrata doydugu ve katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir.

Afinite jel kromatografisi kullanılarak Sepharose-4B-L-tirozin-sulfonamid ile gökkuşığı alabalığı solungaçlarından saflaştırılan CA'nın 4-nitrofenilasetat substratı için  $K_m$  değeri  $8,13 \text{ mmolL}^{-1}$ ,  $V_{mak}$  değeri ise  $2,10 \text{ } \mu\text{mol}^{-1}$  olarak bulunmuştur [48]. Afinite jel kromatografisi kullanılarak Sepharose-4B-L-tirozin-sulfonamid ile teleost balığı karaciğerinden saflaştırılan CA'nın 4-nitrofenilasetat substratı için  $K_m$  değeri  $0,44 \text{ mmolL}^{-1}$ ,  $V_{mak}$  değeri ise  $0,249 \text{ } \mu\text{mol}^{-1}$  dir [49].

Farklı metodlar ve enzim kaynakları seçilerek saflaştırılan CA enzimine ait  $K_m$  ve  $V_{mak}$  değerleri ile koyun karaciğer dokusundan afinite metodu ile yeni bir biyomimetik kromatografi materyali olan Poli(HEMA-MAThr-Sulfonamid) kriyojel kolonu geliştirilerek saflaştırılan CA enziminin  $K_m$  ve  $V_{mak}$  değerleri karşılaştırılmıştır. Buna göre, düşük substrat derişiminde enzimin maksimum hıza ve doygunluğa ulaşması ve saflaştırılan CA enziminin substratı olan 4-nitrofenilasetata olan afinitesinin oldukça yüksek olması geliştirilen yöntemin başarısını göstermiştir.

CA enzimi,  $\text{CO}_2$  ile  $\text{HCO}_3^-$  arasındaki karşılıklı dönüşümü metal-hidroksit nükleofilik atağını kullanarak katalize eder,  $\text{CO}_2$  ve  $\text{HCO}_3^-$  dönüşümü, solunum,  $\text{CO}_2$  homeostazı, dokularda elektrolit sekresyonu ve biyosentetik reaksiyonlar gibi fizyolojik süreçlerde görev alır. CA inhibisyonu ve aktivasyonu, çoğu inhibitör sınıfının metal

merkezine bağlandığı ve aktif bölge boşluğunun girişinde aktivatörlerin bağlandığı proseslerdir [50,51].

Günümüzde sınırlı sayıda yapılmış olan araştırmalar, CA enzimi katalizörlüğünde CO<sub>2</sub> hidratasyonu ile karbonat eldesi üzerindeki etkisini göstermiştir. Temel koşullarda katı CaCO<sub>3</sub> oluşturmak üzere CA katalizörlüğünde CO<sub>2</sub> 'in biyokatalitik olarak yakalanması araştırılmış ve katı CaCO<sub>3</sub>'ün ilk çökelme hızının enzim eklenmesiyle önemli ölçüde arttığı görülmüştür [52-53].

Kalsit, aragonit, dolomit ve dolomitik kireç taşı gibi karbonat mineralleri, toplam küresel karbonun % 99.55'ini oluşturduğu tahmin edilen en büyük karbon rezervuarını oluşturmaktadır. Karbonat minerallerinin çökelme süreci doğada çok yavaştır. Dönüşümlü CO<sub>2</sub> 'nin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'e reaksiyonu, karbonat minerallerinin çökeltilmesi için hız sınırlayıcı bir adım olarak düşünülür. CA enzimi, bu reaksiyonu katalize ederek daha hızlı hale getirdiği için biyokatalizör olarak kullanılmaktadır [54].

## KAYNAKÇA

- [1] Yan, X., Lin, Y., Liu, S., Aziz, F., & Yan, Q. (2015). *Fucosyltransferase IV*.
- [2] Khademi, F., Hamzehee, K., Mostafaie, A., & Hajihossaini, R. (2009).
- [3] Gözükar, F., Arıkan, B. (2012). *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri*.
- [4] Supuran, C. T., and Scozzafava (2001). *A. Curr.Med.Chem.*, 1, 67.
- [5] Arslan, O. (2001). "Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compunds". *Turk J. Med. Sci.*,66 (9),952.
- [6] Ako, H., & Nip, W. K. (2007). Enzyme Classification and Nomenclature, *Food Biochemistry and Food Processing*. 135–154.
- [7] Bayındırlı, A. (2010). Introduction to enzymes. *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing*, 1-18.
- [8] Rogers, A., & Gibon, Y. (2009). Plant Metabolic Networks. *Plant Metabolic Networks*.
- [9] H. (. F. p. v. e. s. A. C. S. W. 1.-1. Ritter.
- [10] <http://www.nkfu.com/enzimlerin-ozellikleri-maddeler-halinde/> (15.01.2016).
- [11] Özler, A. (2009). Malatya kayısısından (prunus armeniaca l.) pektinesteraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara*.
- [12] Michaelis, L., Menten, M. L. (1913). *Biochem. Z.*, 49, 333.
- [13] Xie, X. S. (2013). Enzyme kinetics, past and present. *Science*, 342, 1457.
- [14] Temizkan, G., Yılmaz, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, A., Arda, N. (2008). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. *Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul*.
- [15] Lineweaver, H., Burk, D. (1934). *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658.
- [16] Nuti, E., Orlandini, E., Nencetti, S., Rossello, A., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2007). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 2298.
- [17] Tripp, B. C., Smith, K., Ferry, J. G. (2001). *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (52): 48615.



- [18] Maren, T. H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., and Godman, D.R. (1997). *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280, 98.
- [19] S. B. Ceyhun, M. Şentürk, E. Yerlikaya, O. Erdoğan, Ö. İ. Küfrevioğlu, D. Ekinci. (2011). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32-1, 69.
- [20] Supuran, C.T., Ilies, M., Scozzafava, A. (1998). Carbonic anhydrase inhibitors - Part 291 : Interaction of isozymes I, II and IV with benzolamide-like derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 33: 739-751.
- [21] Tsuzuki, M., Miyachi, S., (1989). The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. *Aquat. Bot*, 34:85-104.
- [22] Hisar, O., Aras, Ş., Yanık, T., Aras, M.S. (2003). The Functions of Carbonic Anhydrase Isozymes at Fish Blood Carbon Dioxide Transport and Excretion, *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 34 (4), 387-393,
- [23] Lindskog, S. (1997). *Pharmacol. Ther.* 74, (1), 1.
- [24] Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G. N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J. M., Vhinen, M., Sly, W. S., Parkkila, (2005). *S., Biochem. J.* 392, (1), 83.
- [25] Mohanty, A. K., Kannan, K.K., Mahajan S.K. (1998). *J. Biosci.* 23 (3), 235.
- [26] Pocker, Y., Sarkanen, S. (1979). Carbonic Anhydrase: Structure, Catalytic Versatility and Inhibition, *Advances in Enzymology, Interscience, New York*.
- [27] Smith, K.S., Ferry, J.G. (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases, *FEMS Microbiol. Rev.*, 24:335-366.
- [28] Henry, R.P., Gilmour K.M., Wood, C.M., Perry, S. F. (1997), Extracellular carbonic anhydrase activity and carbonic anhydrase inhibitors in the circulatory system of fish. *Physiol. Zool.*, 70:650-659.
- [29] Krzysztof Okrasa, Romas J. Kazlauskas. (2006). *Chem Eur. J.* 12, 1587.
- [30] Wilchek, M., & Miron, T. (1999). Thirty years of affinity chromatography. *Reactive and Functional Polymers*, 41(1), 263–268.
- [31] Magdeldin, S., Moser, A. (2012). “Affinity Chromatography: Principles and Applications,” *Affinity Chromatography, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.)*, ISBN: 978-953-51-0325-7, 3-28.

- [32] Svec, F., Frechet, J. M. J. (1992). *Anal. Chem.*, 64, 820-822.
- [33] Breslow (1982). *R. Science* 218, 532–537.
- [34] Kirby, A. J. *Angew. Chem. (1996). Int. Ed. Engl.* 35, 706–724.
- [35] Wong, Y., Masunaga, H., Chuah, J., Sudesh, K., Numata, K., Enzyme-Mimic Peptide Assembly To Achieve Amidolytic Activity, *Enzyme Research Team, RIKEN Center for Sustainable Resource Science*, 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan.
- [36] Breslow, R., Overman, L.E, (1970-02-01). "'Artificial enzyme" combining a metal catalytic group and a hydrophobic binding cavity". *Journal of the American Chemical Society*. 92 (4): 1075–1077.
- [37] Stephen J. Lippard, Jeremy M. Berg (1994). *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books.
- [38] Hür, D., Ekti, S.F., Say,R. (2007). N-Acylbenzotriazole Mediated Synthesis of Some Methacrylamido Amino Acids, *Letters in Organic Chemistry*, 4, 585-587.
- [39] Dainiak, M.B., Galaev, I.Y., Kumar, A., Plieva, F.M., Mattiasson, B. (2007). Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 106: 101- 127.
- [40] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. (2002). The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, 10: 163-188.
- [41] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. (2007). Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate- containing fluids and cell culture applications. *Journal of Separation Science*, 30: 1657-1671.
- [42] <http://www.slideshare.net/bio-link/june2011-bio-linkionexchchrom-copy>.
- [43] Suzuki, M., Yoshida M. (1984). *Clin. Chim. Acta*, 143, 147-155.
- [44] Wilbur, K.M. and Anderson, N.G. "Electrometric and colorimetric determination of.
- [45] Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T., Esterase activities of human carbonic anhydrase, *The Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221.
- [46] Giuliano Siligardi, Rohanah Hussain.(2010). Applications of Circular Dichroism. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, from Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* 9-14.

- [47] <http://mofetsrv.mofet.macam98.ac.il/~rafid/BIOLOGY/biochem/infopages/aminoacids>
- [48] Hisar, O., Beydemir, Ş., Bülbül, M., Yanık, T. (2006). Kinetic properties of carbonic anhydrase purified from gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Animal Research*, 30: 185-188
- [49] Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Erdoğan, O., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2010). In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 177-181.
- [50] Aggarwal, M.; Kondeti, B.; McKenna, R. Expert Opin. (2013). *Ther. Pat.*, 23, 717.
- [51] M. Vinoba, D.H. Kim, K.S. Lim, S.K. Jeong, S.W. Lee, M. Alagar(2011). Biomimetic sequestration of CO<sub>2</sub> and reformation to CaCO<sub>3</sub> using bovine carbonic anhydrase immobilized on SBA-15, *Energy Fuels* 25, 438–445.
- [52] D.X. Yuan (2011). Carbon cycle in earth system and its effects on environment and resources, *Quaternary Sci.* 21 (3), 223–232.
- [53] P. Mirjafari, K. Asghari, N. Mahinpey (2007). Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO<sub>2</sub> sequestration purposes, *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 921–926.
- [54] N. Favre, M.L. Christ, A.C. Pierre (2009), Biocatalytic capture of CO<sub>2</sub> with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate, *J. Mol. Catal. B – Enzym.*, 60, 163–170