TC
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

VAN KEDİSİ ERİTROSİTLERİNDEN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN (E.C.4.2.1.1.) SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Muhammed SÖYLER
DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Halit DEMİR

VAN-2006

TC
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

VAN KEDİSİ ERİTROSİTLERİNDEN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN (E.C.4.2.1.1.) SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Muhammed SÖYLER

VAN-2006

KABUL ve ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr Halit DEMİR danışmanlığında ve Muhammed SÖYLER tarafından hazırlanan "**Van Kedisi Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu**" isimli bu çalışma 25/08/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. İsmail ÇELİK İmza:

Üye: Doç. Dr. Vedat TÜRKOĞLU İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Halit DEMİR İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ……./……/…… Gün ve …….sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……

Enstitü Müdürü

ÖZET

VAN KEDİSİ ERİTROSİTLERİNDEN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN (E.C.4.2.1.1.) SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

SÖYLER, Muhammed
Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Halit DEMİR
Haziran 2006, 47 sayfa

Bu çalışmada Van Kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1.) enzimi afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu çalışma için alınan kedi kanı, antikoagulantlı tüplere konuldu. Gerekli santrifüj ve diğer işlemler yapıldıktan sonra kolona uygulanacak hemolizat haline getirildi. Kolona uygulanacak hemolizatın pH'sı katı Tris ile dengeleme tamponunun pH'sı olan pH=8.7'ye ayarlandı. PH'sı ayarlanmış hemolizat aktifleşmiş Sepharose 4-B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna uygulandı. Kolondan alınan fraksiyonlardan aktivite gösterenler, kantitatif protein tayinleri için Coomassie blue yöntemiyle ve 595 nm'de yapıldı. Bunun yanı sıra enzimin optimum pH'sı, optimum sıcaklığı ve iyonik şiddet etkisi incelendi. Sonra SDS-Page Jel elektroforezi ile enzimin saflığı kontrol edildi. Enzimin optimum pH'sı 8.0, optimum sıcaklığı 40 ^{o}C olarak bulundu. İyonik şiddetin etkisi üzerine yapılan çalışmada ise en yüksek aktivite 0.12 M $(NH_4)_2SO_4$ konsantrasyonunda görülmüştür.

Enzimin saflık derecesi SDS-Page Jel elektroforezi ile kontrol edildi ve tek bant görülerek saflığı ispatlandı.

Anahtar kelimeler: Afinite kromatografisi, Karbonik Anhidraz, Saflaştırma, Van Kedisi

ABSTARCT

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE (E.C.4.2.1.1.) ENZYME FROM VAN CAT'S ERYTHROCYTES

SÖYLER, Muhammed
Msc Thesis, Chemistry Department
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Halit DEMİR
June 2006, 47 pages

In this study, carbonic anhydrase (E.C.4.2.1.1.) enzyme obtained from Van Cat's erythrocyte was purified with affinity chromatography and characterized. Cat's blood was put in anticoagulant tubes for this study. After necessary centrifuge and other operations it was converted hemolysate for column application. pH of hemolysate was adjusted pH= 8.7 which is pH of balancing buffer with solid Tris. The hemolysate was applied to activated Sepharose 4B-Tyrosine-Sulpanilamide affinity column. Quantitative protein analyse of active fractions was performed at 595 nm with Coomassie blue method. In addition, optimum pH of enzyme, optimum temperature and ionic strength effect was investigated. Then purification of enzyme was controlled with SDS-PAGE electrophoresis. Optimum pH of enzyme and optimum temperature was found as 8.0 and 40 ^{o}C. The highest activity was seen in concentration of 0.12 M $(NH_4)_2SO_4$ as ionic strength.

Purification of enzyme is controlled with SDS-PAGE electrophoresis and single band was seen as an evidence.

Key words: Affinity Chromatography, Carbonic Anhydrase, Purification, Van Cat

ÖNSÖZ

Saflaştırılan ve karakterizasyonu yapılan Karbonik anhidraz enziminin hiç şüphesiz ki metabolizmada oldukça önemli bir yeri vardır. Karbonik anhidraz enzimi, hücrede CO_2'in hidrasyonu ve HCO_3^- dehidrasyon reaksiyonunu katalizler. Bu şekilde CO_2 taşınmasını sağlamanın yanında bazı dokulardaki H^+ ve HCO_3^-'ın birikiminde de rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza, tükürük bezleri, beyin, göz merceği, pankreas, prostat, sinir miyelin kılıfı, uterus ve endometrium dokularında bulunduğu belirlenmiştir.

Afinite kromatografisi, enzim saflaştırmada en çok kullanılan bir ayırma metodudur. Diğer metotlara oranla daha kısa sürede daha net sonuçlar elde edilmektedir.

Bu çalışmamızda da afinite kromatografisi yöntemi ile metabolizmanın son ürünü olan CO_2'nin atılmasında ve diğer bazı fizyolojik olaylar üzerindeki etkisi fazlaca olan aynı zamanda turnover sayısı en yüksek enzim olan karbonik anhidrazın karakterizasyonu incelenmiştir.

Daha önce Van Kedisi eritrositleri üzerinde böyle bir çalışmanın yapılmaması bu çalışmamızı daha da önemli kılmaktadır. Çalışmanın ilk bölümünde enzimler hakkında genel bilgi verildikten sonra karbonik anhidraz enzimi tanıtılmıştır. Materyal ve metot bölümünde, kullanılan materyal ve metotlar hakkında bilgi verilmiştir. Tartışma ve sonuç bölümünde ise elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Yüksek lisans çalışmalarım süresince çalışmamın her safhasında bilgilerinden ve kendi yardımlarından faydalandığım, özverisini hiçbir zaman üzerimden eksik etmeyen çok kıymetli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Halit DEMİR'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Kimya Bölümü laboratuarlarından ve her türlü kimyasal madde imkanından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanı sayın Prof. Dr. Hasan CEYLAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım, Doç. Dr İsmail ÇELİK, Doç. Dr. Vedat TÜRKOĞLU, Yrd. Doç. Dr.İbrahim YÖRÜK, Yrd. Doç. Dr İsmet BERBER, Yrd. Doç. Dr. Aycan GÜR, Yrd. Doç. Dr. Ali SAVRAN, Yrd. Doç. Dr. Nazmi YÜKSEK, Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAYA ve Arş Gör. Erkan ÇİMEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmamı mali olarak destekleyen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Çilem ÇİMEN'e de çok teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, maddi ve manevi destek veren sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Muhammed SÖYLER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Enzimler ve Enzimlerin Saflaştırılmasının Tarihçesi	1
1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi	7
1.2.1. Dağılımı ve fizyolojik önemi	7
1.2.2. Fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri	8
1.2.3. Afinite kromatografisi yöntemi ile karbonik anhidrazın saflaştırılması	12
1.3. Van Kedisi Hakkında Kısa Bilgi	12
1.4. Araştırmanın Amacı	13
2. MATERYAL ve YÖNTEM	15
2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	15
2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	15
2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	15
2.4. Kullanılan Yöntemler	17
2.4.1. Kedi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması	17
2.4.1.1. Afinite jelinin hazırlanması	17
2.4.1.2. Sülfanilamidin kenetlendirilmesi	19
2.4.1.3. Kan numunelerinin alınması ve hemolizat eldesi	20
2.4.1.4. Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve Karbonik anhidraz enziminin elüsyonu	20
2.4.1.5. Saflaştırılan enzim çözeltisinin diyalizi	21
2.4.1.6. Saflaştırılan enzim çözeltisinin derişik hale getirilmesi	21
2.4.2. Protein tayini	21
2.4.2.1. Kalitatif protein tayini	21
2.4.2.2. Coomassie blue yöntemi ile kantitatif protein tayini	21
2.4.3. Karbonik Anhidrazın aktivite tayini	22
2.4.3.1. Esteraz aktivitesi tayini	22
2.4.3.2. CO_2- hidrataz aktivitesi tayini	22
2.4.4. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	23
2.4.5. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	23
2.4.6. Enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi	23
2.5. Kedi eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü	24

3. BULGULAR 25
3.1. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Grafik 25
3.2. Van Kedisi Eritrositlerinden Saflaştırılan Karbonik Anhidrazın afinite kromatografisi ile Saflaştırılma Sonuçları 25
3.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi 28
3.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi 28
3.5. Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddet'in Etkisi 29
4. TARTIŞMA ve SONUÇ 31
KAYNAKLAR 34
ÖZGEÇMİŞ 39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Enzimin Liganda bağlanışının şematik gösterilişi 6
Şekil 1.2. CA'nın katalizlediği CO_2-hidrataz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi. 10
Şekil 3.1. Coomassie Blue Yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik 25
Şekil 3.2. Enzim aktivitesi-kantitatif protein tayinini gösteren grafik 26
Şekil 3.3. Afinite kromatografisi ile kedi eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin SDS-PAGE bantı 27
Şekil 3.4. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı grafiği 28
Şekil 3.5. Enzim aktivitesinin pH'ya bağlılığını gösteren grafik. 29
Şekil 3.6. Enzim aktivitesinin iyonik şiddete bağlılığını gösteren grafik 30

ÇİZELGELER DİZİNİ

sayfa

Çizelge 3.1. Van Kedisi eritrositinden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin saflaştırma sonuçları 27

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	Santimetre
^{o}C	Santigrad derece sıcaklığı
dk	Dakika
g	Gram
h	Saat
da	Dalton
kda	Kilodalton
lt	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
M	Molar
mM	Milimolar
N	Normal
rpm	Devir/Dakika
s	Saniye

Kısaltmalar

CA	Karbonik Anhidraz Enzimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ACD	Asit sitrat dekstroz
EC	Enzim kodu
TEMED	N.N.N'N'.-tetrametil etilendiamin
Tris	Tri hidroksimetil aminometan
PER	Amonyum persülfat
OD	Optik dansite
IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği
DIFP	Diizopropilflorofosfat
I	İnhibitör
EI	Enzim inhibitör kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler ve Enzimlerin Saflaştırılmasının Tarihçesi

Enzimler, günümüzde biyokimya bilim dalında en çok araştırma yapılan konuların başında gelir. Enzimlerin, sağlıktan endüstriyel konulara kadar çok sayıda geniş uygulama alanı vardır (Harper, 1975; Stryer, 1981).

Enzimler canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına izin vermeden % 100'lük bir ürün verimi alınmasını sağlayan, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bu katalizörlerin en önemli özellikleri, katalizleme güçleri ve substrata karşı olan spesifiklikleridir. Enzimler, enerji açısından mümkün kullanışlı yollara seçici olarak kanalize eder ve böylece bütün metabolik olayları yönlendirirler. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere bütün enzimler protein yapısındadırlar (Gözükara, 1997; Lehninger, 1993; Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Enzimler, hem katalizledikleri reaksiyon tiplerine, hem de ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifiktirler. Genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizlerler. Substratlara karşı spesifiklikleri ise oldukça yüksek ve kesindir (Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna –az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983; Tekman ve Öner, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 1997).

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birincisi, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır. Bundan dolayı enzimler hücre içinde reaksiyonların hatasız ve hiçbir yan ürün oluşturmadan yürümelerini sağlarlar. İkincisi ise laboratuar şartlarında gerçekleşmesi çok zaman alan ve birçok basamağa ihtiyaç duyan, bazen de yüksek sıcaklık, yüksek basınç, aşırı bazik ve asidik ortam gerektiren reaksiyonların, enzimler sayesinde hücre içi şartlarda birkaç saniye gibi çok kısa bir zamanda meydana gelmesini sağlayan katalizleme güçlerdir. Örneğin Üreaz enziminin, üreyi NH_3 ve CO_2'e parçaladığı reaksiyonun hız sabiti $3x10^{-10}$ s^{-1} iken enzim varlığında bu hız $3x10^{4}$ s^{-1} dir. Buradan da anlaşılacağı gibi Üreaz enzimi bu reaksiyonu 10^{14} kat hızlandırmıştır (Stryer, 1981; Lehninger, 1993).

Enzimlerin katalizleme güçleri turnover sayısı adı verilen bir değerle ifade edilir ve turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına eşittir. Turnover sayısı en yüksek olan enzim karbonik anhidraz enzimidir.

Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. Geniş bir enzim ünitesi tarifi olmamasına rağmen genelde, 25 ^{o}C de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger, 1982; Bingöl, 1983).

Tüm canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonların hepsi, uzak veya yakın enzimlerle ilgilidir. Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenirler ve hücre canlılığını yitirdikten sonra bile bir süre etkisini sürdürürler. Enzimlerin katalitik etkileri hücreye bağlı değildir.

Enzimler de protein yapısında olduklarından proteinlerin tüm özelliklerini gösterirler. Onlar gibi makromoleküller olması itibarıyla sellofan ve kolodyum zarlarından geçemezler ve bu özelliklerden dolayı ısı ile kolaylıkla denatüre olurlar ayrıca ortamın alkali veya asit oluşuna karşıda oldukça hassastırlar. Enzimlerin hızları ortalama olarak 30-50 C^o arasında artar. Fakat bu sıcaklıkların üzerindeki sıcaklıklarda denatürasyona uğrarlar (Champe ve Harvey, 1997).

Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan kofaktör adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktörler bir metal iyonu olabileceği gibi koenzim denilen kompleks bir organik bileşik de olabilir. Bazen enzimin aktivite gösterebilmesi için her ikisine de ihtiyaç duyulabilir.

Kofaktör ve enzim kopleksine haloenzim denir. Kofaktörsüz ve aktif olmayan apoprotein kısmına ise apoenzim denir. Gevşek bağlı koenzimler, enzimlere ligand bağlarıyla farklı kuvvetle tutunmuş olup diyaliz yoluyla çoğu kez enzimlerden uzaklaştırılabilirler. Fakat bazı koenzimler ise enzime sıkı bağlıdır, ve bunlar diyalizle uzaklaştırılamazlar. Bunlara prostetik grup denir. Kofaktörü kendisinden uzaklaştırılan enzim aktivitesini kaybeder (Gözükara, 1997; Lehninger, 1993; Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Enzimli reaksiyonların hızları bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu etkenler sırasıyla:

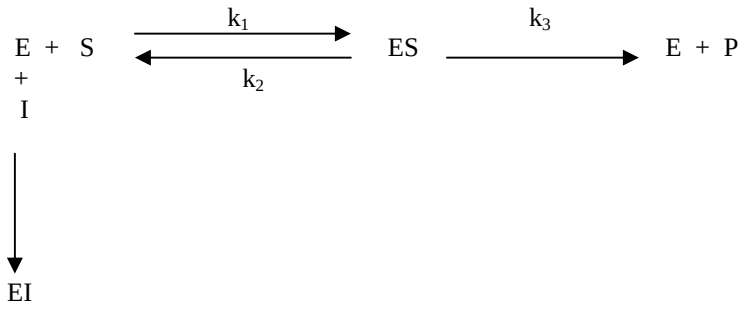
1) Substrat konsantrasyonu
2) Enzim konsantrasyonu
3) pH
4) Sıcaklık
5) İyonik şiddet
6) Kofaktör konsantrasyonu(varsa)
7) İnhibitör ve aktivatör konsantrasyonu

Bu etkenler enzim üzerine değişik oranlarda etki etmektedir.

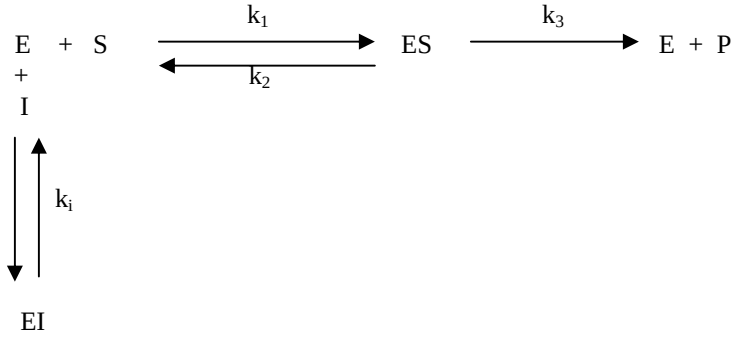
Enzimler üzerinde en çok araştırma yapılan bir diğer önemli özellikte enzimlerin inhibisyonudur. Enzimlerin hem in vivo hemde in vitro olarak aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon, bu olaya neden olan bileşiklere de inhibitör adı verilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler ya da iyonlardır. Bir çok ilaçlar ve toksik maddeler enzimler üzerinde inhibitör etkisi yapıp inhibisyona neden olur. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar için çok önemli bir araç fonksiyonu görmüştür (Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır. Dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitörler, enzime ya kovalent olarak bağlanır, veya zor ayrışabilen bir komleks oluşturur. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetilkolin esteras enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu (kompleks oluşturarak) buna bir örnektir. Bu gazlardan diizopropilflorofosfat (DIFP), enzimin (asetilkolin esterazın) aktif bölgesinde yer alan

serin amino asidi ile reaksiyona girerek inaktif diizopropilfosfo-enzimi (kompleks) oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} (enzimatik reaksiyonlarda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır, K_m (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden sabit kalır. Bu inhibisyonun reaksiyon şeması aşağıdaki gibidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

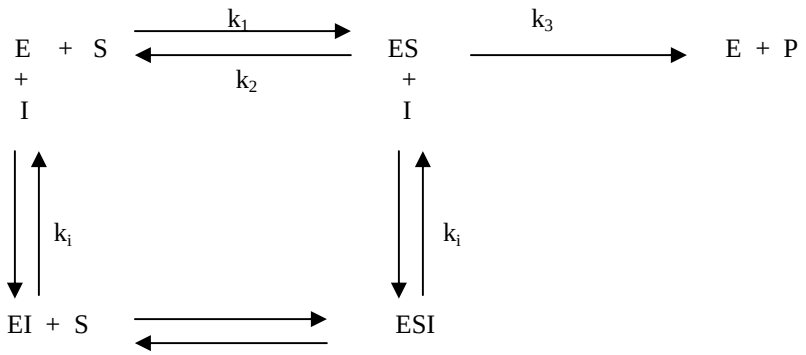


Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzimle inhibitör etkileşmesinde bir denge söz konusudur. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör, yapı itibarı ile substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır ve substratın enzime bağlanması engellenmiş olur. Böylece substrat ile inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak için bir nevi yarışma haline girer. Fakat ortamdaki substrat konsantrasyonu artırılırsa inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmez ama K_m değeri artar. Yarışmalı inhibitörün reaksiyon şemasını



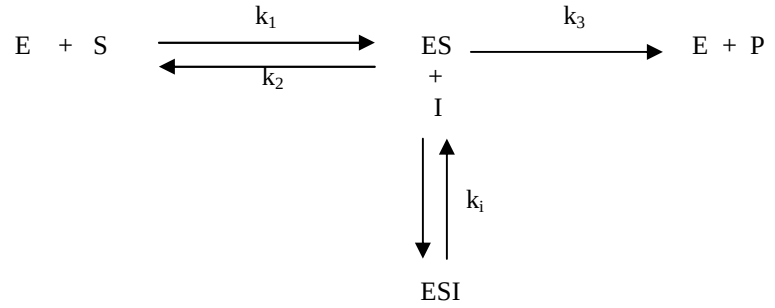
şeklinde yazabiliriz (Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Yine dönüşümlü inhibisyon tipi olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanma enzimin aynı bölgesinde değildir. Aynı yere bağlanma olmadığından substrat ile inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. İnhibitör etkisini enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_m sabit kalır. Substrat konsantrasyonu artırıldığında inhibisyon etkisi kaldırılamaz. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlandığından enzimin EI ve ESI olmak üzere iki çeşit inaktif kopleksi oluşur. Bunun reaksiyon şeması



şeklinde gösterilebilir.

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyonda, inhibitör serbest haldeki enzime değil sadece ES kompleksine bağlanır. Bu inhibisyon çeşidi birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Bunun reaksiyon mekanizması şöyledir:



Yarı yarışmalı inhibisyonda ortamdan sürekli olarak ES kompleksi uzaklaştırıldığından K_m azalır ve aynı oranda ESI kompleksi ortamda sürekli var olacağından V_{max} da düşer (Keha ve Küfrevioğlu, 2005).

Birçok multienzim sistemini reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler denir. Bu olaya ise feed-back inhibisyonu adı verilir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere “modülatör” denir.

Enzimlerin aktivitelerini inhibitörlerin tersine pozitif yönde etkileyen bileşiklere aktivatör adı verilir. Aktivatörler genellikle küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküller şeklindedir. Bunlar kofaktörlerin aksine kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörleri iki grupta toplamak mümkündür, birinci grupta sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler, ikinci gurupta ise serbest enzimlerle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir (Gözükara, 1997).

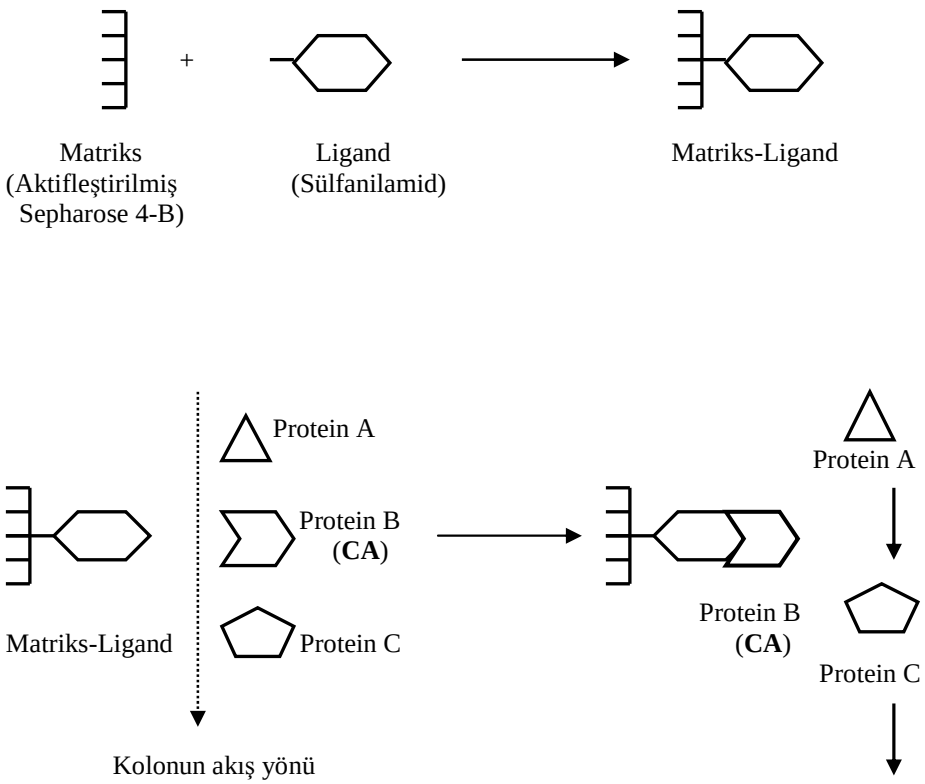
Daha öncede belirttiğimiz gibi enzimler protein yapısında olduklarından dolayı protein saflaştırma yöntemleri enzimler içinde uygulanabilir. Bir enzimin saf bir şekilde hücreden veya dokudan izolasyonu oldukça zordur. Buna rağmen birçok enzim saf olarak elde edilmiştir. 1000'in üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve 200'den fazlası ise kristal olarak elde edilmiştir. Globuler proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanılarak, saflaştırma işlemleri yapılmaktadır.

Globuler proteinlerin bu özelliklerini şöyle sıralayabiliriz**:**

a) Molekül büyüklüğü (diyaliz ve ultrafilitrasyon, yoğunluk gradienti santrifügasyonu, jel filtrasyon kromatografisi).
b) Çözünürlük farkı esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (izoelektrik çökelme, nötral tuzlarla çöktürme, çözücülerle fraksiyonlama, sıcaklığın etkisi).
c) Elektriksel yük esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (elektroforez, iyon değişim kromatografisi).
d) Seçimli adsorbsiyon esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması.
e) Spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (Afinite kromatografisi).

Enzimlerin, bu saflaştırma yöntemlerinden en uygun, güvenilir ve doğru sonuç vereni; spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılma yöntemi olan afinite kromatografisi yöntemidir ve bizde çalışmamızda bu yönteme göre karbonik anhidraz enzimini saflaştırıp karakterizasyon incelenmesini yaptık. Bu yöntemde ligand enzime son derece spesifik olduğundan hızlı bir şekilde enzim bağlanır. Diğer enzim ve moleküller ortama tutunamadıklarından kolonun akış yönünde ilerleyerek uzaklaşırlar ve enzimimiz kolonda yalnız kalır.

Afinite kromatografinin, mekanizmasının açık şekli aşağıdaki gibidir:



Şekil.1.1. Enzimin Liganda bağlanmasının şematik gösterilişi.

Liganda bağlanan enzim veya protein, hareketsiz hale getirilmiş ligandtan genel olarak yüksek konsantrasyondaki bir tuz çözeltisi ile veya ligandın çözünebilir bir şeklinin kullanılması ile elüte edilebilir. Afinite kromatoğrafisi yöntemleri ile son derece başarılı şekilde saflaştırmalar yapılmıştır. Saflaştırılan proteinlerin kirlilikleri poliakrilamid jel elektroforezi ile ortaya çıkarılır (Alırız, 2000; Aldemir, 2002).

1894 yıllarında Chittenden'nin enzimler için ileri sürdüğü üç kavram, enzimoloji tarihi için bir dönüm noktasıdır. Bu kavramlar, halen günümüzdeki enzimlerle ilgili bilgilerle çelişmemektedir (Gözükara, 1997).

1) Enzimler proteinlerden oluşmuşlardır.
2) Katalitik aktivite, enzim proteinin özel yapısına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.
3) Enzimler pasif katalizörler olmayıp substratları ile ara kompleks bileşikler oluşturarak çalışan aktif bileşiklerdir.

1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi (E.C. 4.2.1.1.)

1.2.1.Dağılımı ve fizyolojik önemi:

Karbonik anhidraz (karbonat hidroliyaz, karbonat dehidrataz E.C 4.2.1.1.) CO_2'nin dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen ve Zn^{+2} iyonu içeren bir enzimdir. Omurgalılarda, omurgasızlarda, yüksek bitkilerde, alglerde ve bazı bakterilerde bulunur (Johansson ve Forsman, 1993).

İlk defa memeli eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi, hücrede CO_2'in hidrasyonu ve HCO_3^- dehidrasyon reaksiyonunu katalizler. Bu şekilde CO_2 taşınmasını sağlamanın yanında bazı dokulardaki H^+ ve HCO_3^-'ın birikiminde rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza, tükürük bezleri, beyin, göz merceği, pankreas, prostat, sinir miyelin kılıfı, uterus ve endometrium dokularında bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca balıkların solungaçlarında, bazı böcek ve bakterilerde, bazı dokuların mitokondrilerinde, alglerde ve fotosentetik kloroplastlarında da bu enzimin varlığı ve rolleri tespit edilmiştir. Bu canlı hücrelerinde ve dokularında karbonik anhidraz enzimi, genellikle stoplazmada çözünmüş halde, bazen de hücre zarına zayıfça bağlanmış olarak bulunur (Heldrum ve Roughton, 1933; Davenport ve Fisher, 1938; Vangoog, 1948; Polya ve Wirtz, 1965; Maren, 1967; Carter, 1972; Pocker ve Sarkanen, 1979).

Karbonik anhidrazın bitkilerde fotosentez sırasında önemli görevleri vardır. CA, bitkilerde çoğunlukla kloroplastlarda ve az miktarda da sitozolde bulunur. Kloroplastlarda bulunan karbonik anhidraz, tilakoit membranlarında ve stroma tilakoitlerinde bağlı-CA olarak, stroma sıvısında ise çözünür-CA olarak bulunmaktadır. Bitki karbonik anhidraz enzimlerinin fonksiyonlarının lokalizasyonu ile yakından alakalıdır. Bu lokalizasyona bağlı olarak CA, fotosentez esnasında elektron transportuna katılır ve Elektron Transport Zincirine (ETS) elektron vericisi olan bikarbonat (HCO_3^-) iyonlarını sağlar. Tilakoit membranlarına bağlı CA, elektron taşınmasına katılırken, stroma tilakoitlerinde bulunan bağlı CA, fotosentez sırasında CO_2 fiksasyonuna katılır. Sitoplazmik CA ise CO_2'yi transfer ederek hücrede bikarbonat havuzunu devam ettirir. Fotosentez inhibitörleri siklohegzimid'in hem fotosentezi hemde CA'yı inhibe etmelerini, esas karboksilleyen enzimler riboloz bifosfat karboksilaz ve fosfoenol piruvat karboksilaz enzimleri ile CA'nın yakın ilişkide olması Calvin Siklusunun önemli enzimleri olan ribuloz bifosfat karboksilaz ve oksijenaz enzimleri ile CA arasında koordineli bir artma veya azalma olması, CA'nın fotosenteze direk katılmasının bir ispatı sayılabilir (Patterson ve ark., 1971; Vaklinova ve ark., 1982; 1984; Spencer ve ark., 1983; Popova ve Lazova, 1993; Sütlemeyer ve ark., 1993; Majeau ve Coleman, 1994).

Omurgalı karbonik anhidraz izoenzimlerinin molekül ağırlıkları, 29.000-30.000 dalton arasında, bitki kloroplastlarından elde edilen ve hekzomerik bir yapıya sahip karbonik anhidrazın ise yaklaşık 180.000 dalton olduğu saptanmıştır. Bundan başka tavşan eritrositlerinde 54.000 dalton ve insan böbreğinde 66.000 dalton molekül ağırlığında karbonik anhidraz aktivitesine sahip proteinlere rastlanmıştır (Tobin, 1970; Pocker ve Joan, 1973; Pocker ve Joan, 1974; Carter ve ark., 1979; Schaer ve Dietsch, 1984).

Karbonik anhidraz enzimlerinin izoelektrik pH' ları türüne göre farklılıklar gösterir. Eritrosit izoenzimleri için izoelektrik pH insanda 7.4-5.7, atta 10.0, sığırda

5.2, domuzda 7.3-5.2, köpek balığında 4.5 olarak literatüre geçmiştir (Rickli ve ark., 1964; Mc Intosh, 1969).

Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfanilamidler olduğunu göstermektedir. Sülfanilamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmasıdır. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.

$$R\text{-}SO_2NH_2 \longleftrightarrow R\text{-}SO_2NH^- + H^+$$

Sülfanilamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfanilamid ligand olarakta kullanılmaktadır (Roughton ve Booth, 1946; Tozlu, 1997).

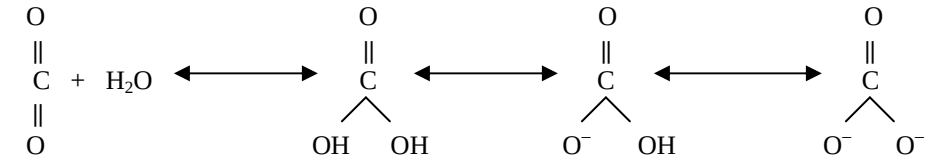
Yine yapılan benzer çalışmalarda bir çok tek değerlikli anyonların karbonik anhidraz enzimi üzerine inorganik inhibitör etkisi gösterdiği saptanmıştır. Sığır CA ile yapılan F^-, Cl^-, I^-, Br^-, N_3^-, CN^-, HS^-, NO_3^-, CNO^-, HSO_3^-, CH_3COO^-, ClO_4^- anyonlarının paranitrofenil asetatın hidrolizini inhibe ettikleri görülmüştür. Bu inhibitörlerin karbonik anhidraz enzimi üzerindeki etkilerinin düşük pH'larda artığı gözlenmiş, fakat aynı pH'da ise CA-II izoenzimine karşı daha fazla inhibisyon etkisi göstermektedir (Roughton ve Booth, 1946; Magid, 1968; Maren ve Conto, 1979; Özdemir, 1992; Tozlu, 1997).

1.2.2. Fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri

Karbonik anhidraz Zn^{+2} iyonu ihtiva eden metaloenzimlerden ilk bulunanıdır. Karbonik anhidraz ilk kez 1933 yılında kırmızı kan hücrelerinde, 1946 yılında tükrük bezlerinde, 1960 yılında mitokondrilerde bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda karbonik anhidrazın canlı organizmalarda yedi tane izoenzime sahip olduğu saptanmıştır. CA-I ve CA-II eritrositlerde, CA-III iskelet kasında, CA-IV insan böbreğinde, CA-V belirli dokuların mitokontrilerinde, CA-VI tükrük bezlerinde ve CA-VII ise sitozolde karbonik anhidraz enzimleri saptanmıştır. Karbonik anhidraz CO_2 taşınmasının yanısıra özellikle bazı dokularda H^+ ve HCO_3^- birikiminde de önemli rol oynamaktadır. Bu bazı dokular arasında böbrek, gastrik mukoza, göz merceği, tükrük bezleri, beyin hücreleri, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometrium gibi dokuların varolduğu çeşitli biyokimyasal ve imminohistokimyasal yöntemlerle saptanmıştır (Fernley, 1988; Botre ve ark., 1991).

Karbonik anhidraz, memeli dokuları içerisinde en bol olarak eritrositlerde, kaslarda ve karaciğerde bulunmaktadır. Ortalama 100 ml kanda 15-17 gr hemoglobin olduğu göz önüne alındığında, karbonik anhidraz %1'ini oluşturmaktadır. Çözünebilen kas proteinlerinin yaklaşık %5'ini karbonik anhidraz enziminin oluşturduğu bilinmektedir (Register ve ark., 1978; Carter ve ark., 1981; Yenson, 1982).

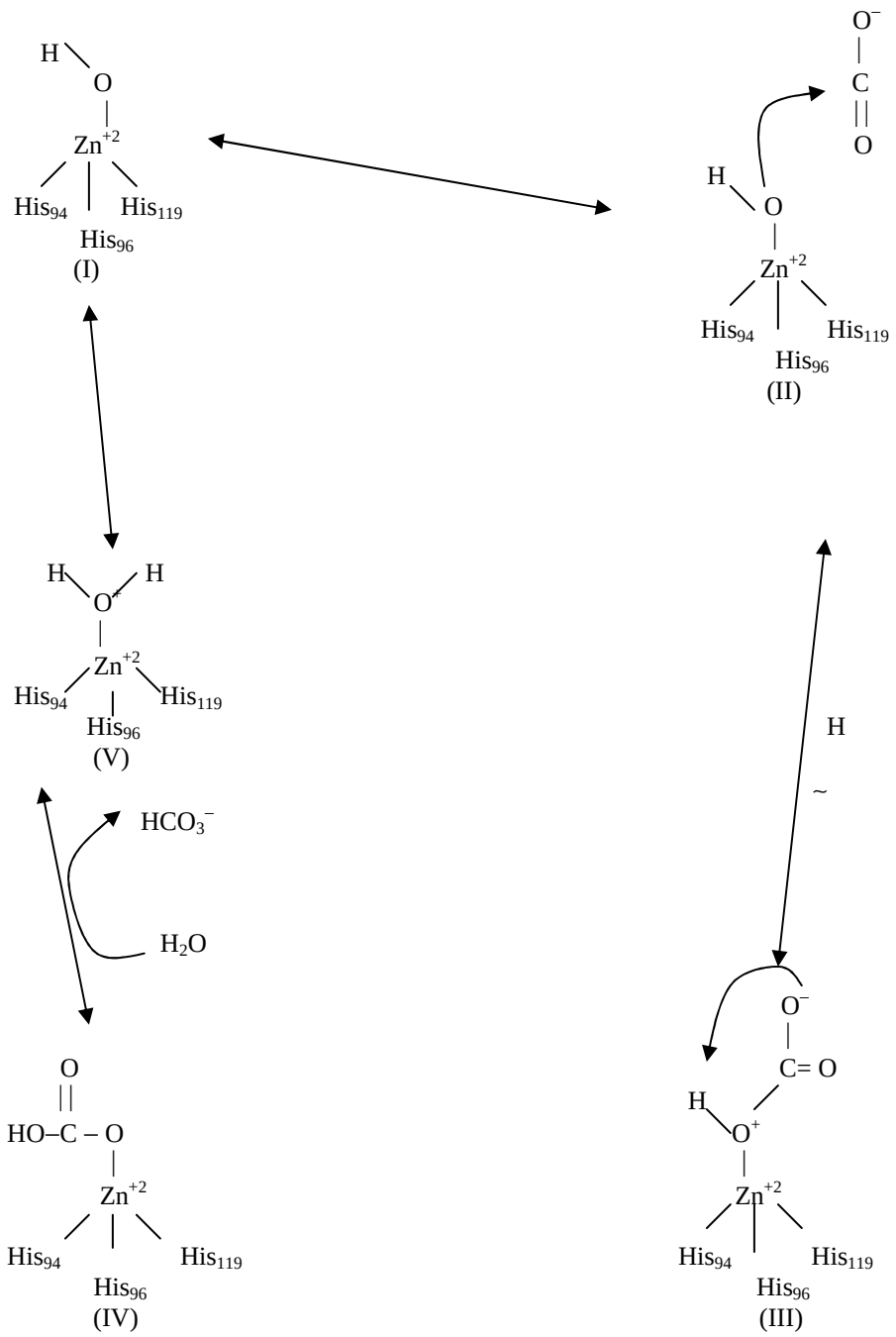
Karbonik anhidraz CO_2 ve H_2CO_3 veya ortamın pH'sına göre HCO_3^- ve CO_3^- iyonları arasında dönüşümlerini katalizleyen bir enzimdir. Düzlemsel bir molekül olan CO_2' in farklı açılara sahip piramidal yapıda $H_2CO_3^-$ e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır.



Karbondioksit (pH= 11) (pH= 7) (pH= 2)

Karbonik asit Bikarbonat Karbonat

Karbonik anhidraz, bu çok yavaş gerçekleşen dönüşüm reaksiyonlarını *in vivo* ve *in vitro* şartlarda son derece hızlı bir şekilde katalizlemektedir. CA-II için turnover sayısı, 600,000 s^{-1} olarak bildirilmiştir.



Şekil 1.2. Karbonik Anhidrazın katalizlediği CO_2-hidrataz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi.

Karbonik anhidarzın iki önemli yapısal özelliği vardır. Birincisi, aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir OH^- grubu ihtiva eder. İkincisi, aktif bölge yakınlarındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmiştir. Karbonik anhidrazın katalizlediği CO_2-hidrataz mekanizması yukarıda basitçe gösterilmiştir.

Birinci basamakta Zn^{+2} iyonuna bağlı OH^- grubundaki bağ yapmayan elektron çiftinin, CO_2 molekülüne nükleofilik atak yaparak, karbon-oksijen bağı oluşturması esnasında (II) pi bağı açılmaktadır (III). Daha sonraki basamakta, negatif yüklü oksijen atomunun proton abstraktı (IV) ve su girişi ile HCO_3^- iyonu ayrılmaktadır. En sonunda V nolu bileşik bir H^+ iyonu kaybederek yeniden I nolu başlangıç bileşiğine dönüşür (Tozlu, 1997).

Karbonik anhidrazın bilinen yedi izoenziminden üçü olan CA-I, CA-II, ve CA-III kristal halde elde edilmiş ve bunların yapıları hakkında geniş bilgiler kaydedilmiştir. Karbonik anhidrazın bu üç izoenzimi, yapısal yönünden bir çok benzerlik göstermesine rağmen aktiviteleri çok farklıdır. CA-II; izoenzimi CA-I den 60 ile 100 kat daha fazla aktiftir, ve bilinen enzimler içinde katalitik aktivitesi (turnover sayısı) en yüksek olanıdır. CA-III ise turnover sayısı en düşük olan izoenzimdir; ve CO_2 hidrataz aktivitesi CA-I' in % 5'i kadardır. Bu üç izoenzimde stoplazmada çözünmüş halde bulunur. Molekül ağırlıkları 28,000 dalton olup, 259-260 aminoasitten oluşmuş tek bir polipeptit zinciri halindedir. Her enzim molekülünün aktif bölgesi yaklaşık olarak tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş Zn^{+2} iyonu ihtiva etmektedir. Bu Zn^{+2} iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu çok önemli olup, $Zn^{+2'}$ nin uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA'lar tam manasıyla aktivite gösteremezler (Armstrong ve ark., 1966; Lindskop ve Henderson, 1971; Schaer ve Dietsch, 1984).

Bu konulardaki ilk çalışmalar insan eritrositleri üzerine CA-I ve CA-II nin aminoasit dizilişlerinin tespiti olmuştur. Daha sonraki yıllarda sığır, at, şempaze ve maymunlara ait CA-I'lerin ve sığır, at, koyun, tavşan kaynaklı CA-II'lerin aminoasit dizilişleri tam olarak tayin edilmiştir. Kas izoenzimi olarak bilinen CA-III'ün aminoasit dizilişi ise insan, sığır ve atlarda araştırılmış ve bu çalışmalar sonucunda üç izoenzimin aminoasit dizilişleri ve üç boyutlu yapıları yönünden çok büyük ölçüde benzerliğe sahip olduğu görülmüştür (Hendersson ve ark., 1973; Lin ve Deutsch, 1974; Tashian ve ark., 1983).

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin izoelektrik pH'ları türden türe farklılık göstermekte ve aktiviteleri ile her hangi bir korelasyona rastlanmamaktadır (Rickli ve ark., 1964; Mc Intosh, 1969). Aminoasit bileşimleri yönünden benzerlik gösteren memeli, bakteri ve balık CA'ları prolin, asidik, bazik ve az miktarda kükürtlü aminoasitler içermektedir. Bitki CA'ları ise bunlara oranla daha yüksek seviyede sistein taşırlar (Nyman ve Lindskog, 1964; Carter ve Parsons, 1972).

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin, CO_2, HCO_3^- ve H_2O arasındaki dönüşüm reaksiyonlarını katalizlemenin yanı sıra elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren bazı reaksiyonlarıda katalizlediği bilinmektedir. Bu reaksiyonlar aldehit, piruvat, alkil piruvatların hidratasyonu ve ayrıca piruvik, sulfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizini içeren dönüşümlerdir. Karbonik anhidrazın, esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Kaiser ve Lo, 1969; Jabusch ve Deutsch, 1989). Ayrıca tavşan CA-III izoenziminin asit fosfataz, atta bullunan aynı izoenzimin ise hem asit fosfataz hem

de alkalen fosfataz etkisi olduğu bildirilmiştir (Wistrand, 1980; Pullen ve Noltman, 1985; Nistiha ve Deutsch, 1986).

1.2.3. Afinite kromatografisi yöntemi ile karbonik anhidrazın saflaştırılması

Enzim saflaştırmada en çok kullanılan ve bizimde kullandığımız yöntem afinite kromatografisi yöntemidir. Afinite kromatografisi, bir çeşit adsobsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir koplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose ve Biogel gibi farklı jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır (Keha ve Küfrevioğlu, 2005). Afinite kromatografisi sayesinde çok zor ve hatta diğer yöntemlerle imkansız olan bir çok bileşikler saf olarak elde edilmiştir.

Karbonik anhidrazın afinite kromatografisi ile ilk defa 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1974 yılında Whitney'in, 1975 yılında Wistrand ve arkadaşlarının, 1976 yılında Johansen, 1992 yılında Özdemir'in,1994 yılında Arslan'ın, 1995 yılında Çelik'in, 1997 yılında Tozlu'nun çalışmaları görülmektedir (Falkbring ve ark., 1972; Whitney,1974; Johansen, 1976; Özdemir, 1992; Arslan,1994; Çelik, 1995; Tozlu, 1997). Daha sonra yapılan çalışmalara bu çalışmaların ışığında devam edilmiştir.

1.3. Van Kedisi Hakkında Kısa Bilgi

Evcil hayvanların her birinin ayrı bir özelliği vardır. Çağlar boyunca, insanların dikkatini üzerine toplamış kedilerden bugün, ipeksi beyaz kürkü, değişik gözleri, mükemmel avcılığı ve suda oynamayı sevmesiyle en fazla ilgi görenlerden biride Van kedisidir.

Kedi etçil hayvandır. Genelleştirme yapılırsa hayvansal proteinlerle beslenir. Keskin duyu organlarının varlığı, karanlıkta bile çok iyi görebilen gözleri, sivri pençeleri, keskin dişleri, kıvrak vücudu, ayak parmaklarının üzerinde sessizce yürümesi onu bir avcı yapmıştır. Göz ve burun etrafında hassas kılların bulunuşu da avcı özelliğini kuvvetlendirmektedir.

Kürk kılları ilkbahar ve sonbaharda dökülür. Yüz kasları herhangi bir olay karşısında hayvanın yüz ifadesini belirtecek bir şekil alır. Kas ve iskelet sistemi mükemmel bir şekilde koordineli olarak çalışır ve hangi pozisyonda yukarıdan aşağıya bırakılırsa bırakılsın daima ayakları üzerine düşer. Büyük beyin (Cerebrum) in alanının genişliği, kedilerin zekasının göstergesidir. Ayrıca beyinciğin (Cerebellum) gelişmiş olması da kedilerin aktivitesindeki koordinasyon mükemmelliğini sağlar.

Son yıllarda gerek dünyada gerekse Türkiye'de büyük ilgi gören ev kedilerinden bire de Van kedisidir. Fakat sevimli ve cana yakın olan Van kedisine bu güne kadar yeterli ilgi gösterilmediğinden nesli tükenmeyle karşı karşıyadır. Eskiden Van yöresinde sıkça rastlanan ve hemen hemen her evde bulunan Van kedisinin sayısı giderek azalmakta ve hızla melezleşmektedir. Van kedisinin eskiden yaz aylarını

dağlarda, kış aylarını ise evde geçirdikleri söylenir. Bugün ise yaz aylarını Erek Dağı'nın sırtlarında avcılıkla geçiren ve kış aylarında evine dönen Van kedisine çok az rastlanır.

Yöre halkı tarafından yere sürünecek kadar uzun-beyaz ipeksi kürklü uzun vücut yapılı kaplan yürüyüşlü, uzun ve kabarık kuyruğu, değişik göz renkli (Diskromatopsi), zeki, çevik bir kedi olarak tarif edilen Van kedisinin temizliği, cana yakınlığı, oyunun çok sevmesi ve sahibine bağlı olması, onu nadide hale getiren başlıca özelliklerdendir. 1950'li yıllardan sonra Avrupalılar tarafından dünyaya tanıtılmaya çalışılmışsa da bu eşsiz güzelliği ve özellikleri tam olarak tanıtılamamıştır.

Van kedisini çekici kılan özelliklerden biride, onun gözlerinin rengidir. Göz renklerine göre Van kedileri üç gruba ayrılır:

a) Her iki gözü mavi,
b) Her iki gözü kehribar (Sarı renk tonları)
c) Tek-göz (Diskromatopsi bir gözü mavi diğer gözü kehribar renkte olanlar) diye gruplandırılır.

Van kedilerinde, yeni doğan yavruların gözleri grimsi renktedir. Yavru kedi doğumdan 25 gün sonra göz renkleri farklılaşmaya başlar ve 40 gün sonra da göz renkleri netleşir.

Van kedilerinin erkeklerinin vücut ağırlığı yaklaşık 3600 gram, dişilerinin ise 2900 gram kadardır.

Van kedisi her yıl Şubat-Mart-Haziran aylarının birinde kızgınlık (Östrus) periyoduna girer. Bu periyot 15-20 gün sürer. Gebelik süresi 62 gün kadardır. Van kedisi her defasında dört adet yavru doğurur. Anne kedi, yavrularını 50-60 gün süreyle emzirir.

Van kedilerinde sağırlığın yaygın olduğu kanaati varise de tek göz (Diskromatopsi) ve mavi gözlü kedilerde ancak % 2-3 civarında sağırlık vardır.

Yapılan incelemeler Van kedisinin eğitime çok iyi cevap verdiği gözlenmiştir. Kendisine öğretilenleri çok çabuk kavrar. Tuvalet ihtiyacı için bir yere konulan toprağın yerini hemen kavrayıp bunun dışında başka bir yeri kullanmadıkları tespit edilmiştir. Yavru kediler 2-3 aylık iken isimlerini öğrenmektedir.

Sevimli, cana yakın, zeki, çevik, sadık, güzel ve ilgi çekici görünümlü Van kedisinin neslinin azalmaması ve melezleşmesinin önlenmesi için tüm çabaların gösterilmesi gerekmektedir (T.C. Kültür ve Turizm Bakanlığı, 2005).

1.4. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada metabolizmanın son ürünü olan CO_2'nin atılması mekanizmasında oldukça önemli role sahip olan, kanda özellikle eritrositlerde yoğun bir şekilde bulunan karbonik anhidraz enziminin saflaştırılmasının, endemik bir tür olan Van Kedisi üzerinde yapılmıştır. Karbonik anhidraz enzimi daha önceden birçok canlı ve dokulardan saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Fakat Van Kedisi üzerinde bu saflaştırma yapılmamış ve özellikleri araştırılmamıştır.

Enzim saflaştırma yöntemlerinden en güvenilir ve doğru sonuç vereni; spesifik ligandları esasına dayanarak proteinlerin ayrılması yöntemi olan afinite kromatoğrafisidir. Bu çalışmada da saflaştırma tekniği olarak afinite kromatografisi

kullanılacaktır. Bu yöntemle Van Kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması yapıldı. Elde edilen bu enzimin daha sonra saflaştırma oranı, aktivite gösterdiği optimum pH, optimum sıcaklık, iyonik şiddetin etkisi incelenip bu değerler diğer benzer çalışmalardaki değerlerle karşılaştırılmıştır.

Herhangi bir saf enzimi yurtdışından temin etmenin maliyeti çok yüksek olacağından ve ülkemizin içinde bulunduğu ekonomik durum göz önüne alındığında, enzimleri hazır almaktansa düzenli bir sistemi kurup istenildiği an enzimi saflaştırmak daha kolay, ucuz ve uygun olacağı düşünülmektedir.

Literatürde şimdiye kadar Van Kedisi üzerinde karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması yapılmaması bu çalışmayı önemli kılmaktadır. Eritrositlerde karbonik anhidraz; doku kılcal damarında metabolizmada önemli olan CO_2, H_2CO_3'e akciğerde ise H_2CO_3'i CO_2'ye dönüştürerek solunum olayında çok önemli rol oynar. Karbonik anhidraz Asetaldehit ve bazı bileşiklerin hidrasyonu ve çeşitli esterlerin hidrolizini katalizledikleri tespit edilmiştir. Bu enzimin esteraz aktivitesini ortaya koyan özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemekle beraber saflaştırılacak bu enzimin çeşitli kinetik özellikleri araştırılacaktır.

Bu çalışmada Van Kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimi afinite kromatografisi ile saflaştırılıp enzimin karakterizasyonu incelenmiştir. Bu kedi eritrositinden elde edilen karbonik anhidrazın optimum çalışma şartlarının, yani en iyi aktivite gösterdiği ortamın tespit edilmesi daha sonra yapılacak çalışmalara da kolaylık sağlayacaktır.

Bilimsel açıdan bu çalışmayla, karbonik anhidraz enzimi için bir katkının da tarafımızdan yapıldığı düşünülmektedir. Literatüre katkımızın, bu çalışmanın ileride değişik boyut kazanmasıyla daha da fazla olacağı tahmin edilmektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Sodyum sülfat, HCl, Tris tamponu, NaN_3, Sitrik asit, Dekstroz, H_2SO_4, NaOH, $NaCH_3COO.3H_2O$, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, Fenol kırmızısı ve Aseton (Merck), Coomassie brillant blue G-250 çözeltisi, CN ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, Sephadex-G25, Tirozin, Sülfanilamit, Paranitrofenilasetat, Standart sığır serum albumini, $NaClO_4$, Amonyum sülfat (Sigma).

2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

1- Peristaltik pompa: Ismatec, MCP-Standart / Easy-load
2- Klinik santrifuj: Hettich EBA 3-S
3- Soğutmalı santrifuj: Hereaeus Sepatech
4- pH metre: CG 840 Schott
5- Manyetik karıştırıcı: IKA Combimag RCO.
6- Hassas terazi: Gee Avery
7- Karıştırıcı(vorteks): Vortex- Genine
8- Kromatografi kolonu: Sigma chemical
9- Otomatik pipetler: Volac R 880/D
10- Spektrofotometre: LKB-Biochrom, Ultrosec-II Model 4050
11- Elektroforez tankı: hoefer, HSI
12- Kronometre:Larus JAPAN
13- Afinite kolonu: Sigma 1.3 x 18 cm

2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1) Tampon A (Afinite jelin dengelemesi için kullanılan tampon):

3.0275 g (22 mmol) Tris ve 14.2 g (0.1mol) Na_2SO_4 , 950 ml saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH 8.7'ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

2) Tampon B (Hemolizatı tatbik ettikten sonra, afinite jelini yıkama tamponu):

3.0275 g (25 mmol) Tris ve 3.124 g (22 mmol) Na_2SO_4, 950 ml saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH 8.7' ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

3) Tampon C (Afinite jeline bağlanmış olan karbonik anhidrazın elüsyon tamponu):

9.1875 g (0.075 mol) $NaClO_4$ ve 2.04 g (0.015 mol) $NaCH_3COO.3H_2O$, 120 ml saf su içinde çözüldü. 1 N HCl ile pH 5.6 ayarlandı. Saf su ile toplam hacim 150 ml'ye tamamlandı.

4) Tampon D (Esteraz aktivitesi ölçümünde kullanılacak tampon):

6.055 g (0.05 mol) Tris, 950 ml saf suda çözüldü.1 N H_2SO_4 ile pH 7.4' e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

5) Tampon E (CO_2-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılacak tampon):

15.9 g (0.15 mol) Na_2CO_3 ve 8.4 g (0.1 mol) $NaHCO_3$ bir miktar saf suda çözüldü ve toplam hacim 1 litreye tamamlandı.

6) Coomassie brillant blue G-250 renk reaktifi (Protein tayininde kullanılan stok çözelti):

100 mg Coomassie brillant blue G-250, 50 ml % 95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye 100 ml % 95'lik fosforik asitten yavaşça eklendi. Hazırlanan çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

7) Standart sığır serum albumin çözeltisi (Protein tayininde kullanılan standart çözelti):

10 mg sığır serum albumininden alıp bir miktar saf suda yavaşça çözüldü. Toplam hacim saf su ile 10 ml' ye tamamlandı.

8) Asit sitrat dekstroz (ACD) çözeltisi (Antikuagulant olarak kullanılan stok çözelti):

22 g sodyum sitrat dihidrat, 8 g sitrik asit ve 24 g dekstroz bir miktar suda çözüldü. Toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

9) Fenol kırmızısı indikatör çözeltisi (CO_2-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan çözelti):

0.0125 g fenol kırmızısı ve 0.2184 g $NaHCO_3$ bir miktar saf suda çözüldü. Toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

10) CO_2-çözeltisi (CO_2-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan çözelti):

CO_2 gazının O ^oC deki saf suyun içerisinden yarım saat geçirilerek hazırlandı.

11) SDS-elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

0.65 ml Tris-HCl pH 6 .8,1 ml % 0.1 bromfenol mavisi, 3 ml %10'luk SDS çözeltisi ve 1 ml gliserin karıştırılarak toplam hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti kullanılmadan hemen önce 1 ml numune tamponuna 50 µl β-merkapto etanol kullanıldı.

12) SDS-elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:

1.5 g Tris ve 7.2 g gliserin bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf suyla 50 ml'ye tamamlandı. Daha sonra bu çözeltiye 5 ml % 10' luk SDS ilave edildi. Toplam hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

13) SDS-elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi:

0.66 g Coomassie brillant blue R-250 çözeltisi, 120 ml metanol de çözüldü. Bu çözeltiye 24 ml saf asetik asit ve 120 ml saf su eklendi.

14) SDS-jel elektroforezinde kullanılan renksizleştirme çözeltisi:

175 ml saf su ve 15 ml metanol ile hazırlandı (Bu çözelti hazırlanırken, % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 su oranları kullanıldı).

15) SDS-elektroforezinde kullanılan ayırma jeli:

15 ml pH 8.8 olan 1 M Tris-HCI, 13.2 % 30' luk akrilamid ve % 0.8' lik bisakrilamid (6 g akrilamid, 0.16 g N'N'-bis akril amid saf suda çözülerek toplam hacim saf su ile 20 ml' ye tamamlandı) eklendi. 0.6 ml % 10' luk SDS, 0.4 ml %5' lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin), 9.4 ml saf su ve en son olarak da 0.8 ml % 1.5'luk PER [$(NH4)_2S_2O_8$: Amonyum persulfat] çözeltisi ilave edildi. PER kullanılmadan kısa süre önce, taze olarak hazırlandı.

16) SDS-jel elektroforezinde kullanılan yığma jeli:

1.24 ml 1 M' lık Tris –HCl (pH 6.8), 7.36 ml saf su, 1 ml % 30' luk akrilamid % 0.8' lik bis akrilamid, 0.1 ml % 10'luk SDS, 0.1 ml % 5' lik TEMED karıştırıldı. Bu çözeltiye taze hazırlanmış % 1.5' luk PER' den 0.20 ml ilave edildi.

17) Stok kimyasal çözeltilerin konsantrasyonları molar cinsinden hazırlanmıştır.

2.4. Kullanılan Yöntemler

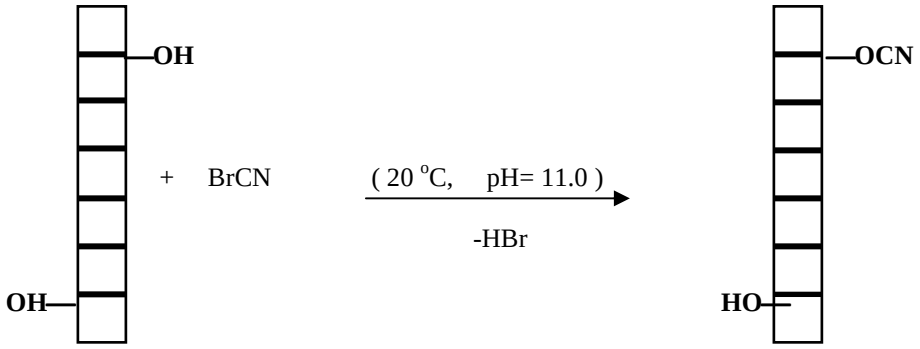
2.4.1. Kedi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması

2.4.1.1. Afinite jelinin hazırlanması

10 ml' lik yatak hacmi için 2.86 g kuru aktifleşmiş CNBr Sepharose 4-B jeli tartıldı. Tartılan aktifleşmiş sepharose 4-B bir miktar destile su ile iyice yıkanarak safsızlıklar uzaklaştırıldı. Daha sonra 0.1 M'lık 20 ml soğuk $NaHCO_3$ tamponu (pH 10.0) ile yıkandı ve behere alındı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilip karıştırıldı.

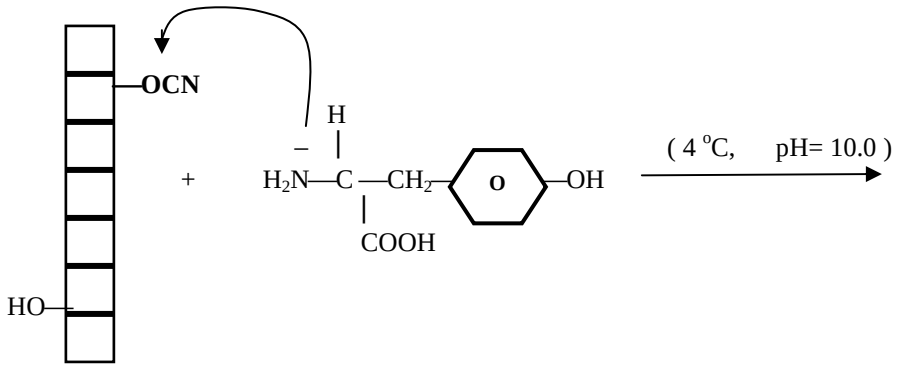
Yıkama, tirozin ve bagetle karıştırma işlemleri 1.5 dakikadan az bir sürede tamamlanacak şekilde yapıldı. Sonra buzdolabında 4 ^oC sıcaklıkta, 2 saat süreyle magnetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 16 saat aynı sıcaklıkta (+4 ^oC) bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar saf su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin ortamdan tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi 100 ml 0.2 M $NaHCO_3$ tamponu (pH 8.8) ile tekrarlandı ve böylece tirozin takıldı. Jel aynı tamponun 40 ml'si içine alınıp muhafaza edildi (Cuatrecases ve ark., 1968; Kohn ve Wilchek, 1978, Ocarra ve ark., 1973; Axen ve Ernback 1971).

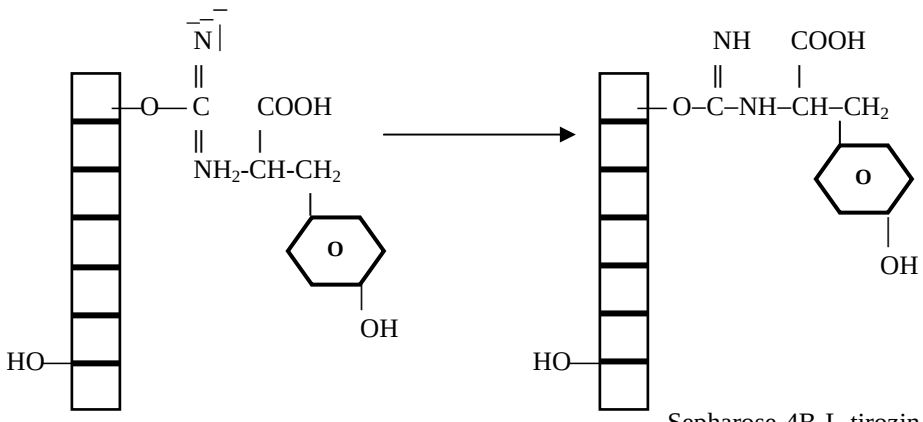
Bu basamaktaki reaksiyonların açık formülleri aşağıda gösterilmiştir:



Sepharose 4-B

Aktifleşmiş matriks



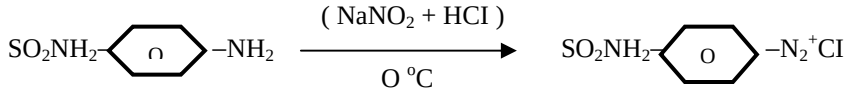


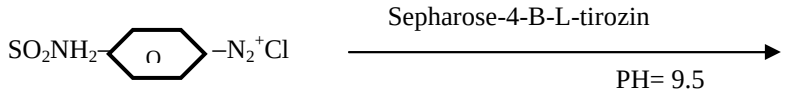
Sepharose-4B-L-tirozin

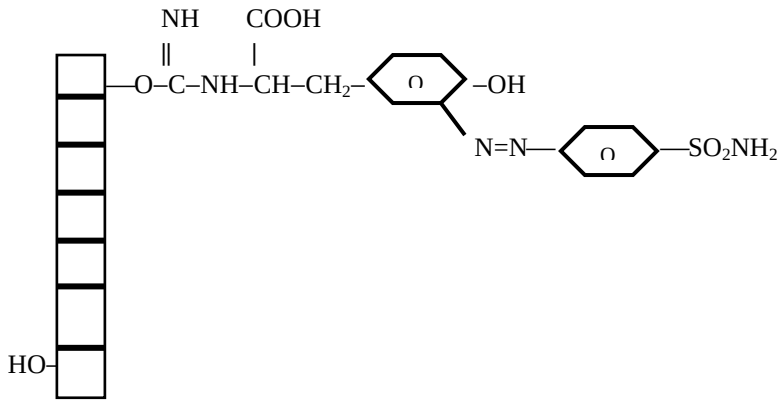
2.4.1.2. Sülfanilamidin kenetlendirilmesi:

O ^{o}C civarındaki 1 M'lık 10 ml HCl çözeltisi içinde 25 mg sülfanilamid çözüldü. 75 mg $NaNO_2$'nin 5 ml O ^{o}C deki su içinde çözülerek hazırlanan çözeltisi, yukarıda hazırlanan sülfanilamid 40ml aktifleşmiş sepharose-4B-L tirozin süspansiyonuna katıldı. 1M NaOH ile ortamın pH'sı 9.5'e çıkarılarak sabitlendi. Çözelti oda sıcaklığında 3 saat süreyle yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra 1 litre saf su ve ardından 200 ml 0.05 M Tris-SO4 (pH 7.6) tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra yine aynı tamponun içinde muhafaza edildi (Cuatrecases, 1970; Whitney, 1974). Dengeleme ve yıkama işlemlerinde kolona akış hızı 50 ml/saat olarak uygulandı.

Bu basamaktaki reaksiyonların açık formülleri aşağıda gösterilmiştir (Çelik, 1995).







Afinite jelinin son durumu

2.4.1.3. Kan numunelerinin alınması ve hemolizat eldesi

Yapılacak deneyler için gerekli olan kedi kanı, kediden veteriner hekim tarafından dikkatlice alınıp, daha önceden hazırlanmış olan asit sitrat dekstroz (ACD) çözeltisi üzerine katıldı. 5 ml kan için 0.75 ml antikuagulant kullanıldı. Böylece hem pıhtılaşma önlenmiş, hemde eritrositler için bir beslenme ortamı sağlanmış oldu. Kanlar alındıktan sonra aynı gün içinde çalışmalar için kullanıldı (Brewer ve Sing, 1970).

Kedi kanlarından hemolizat eldesi şu şekilde yapıldı. Santrifüj tüplerine 5 er ml antikuagulantlı kan konuldu ve 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakaları aspire edilerek alındı. Daha sonra eritrositler % 0.9'luk NaCI çözeltisi ile iki defa yıkandı. Bu işlemlerden sonra 60 ml kandan yaklaşık 27-30 ml eritrosit elde edildi. Eritrositler, hacimlerinin 1.5 katı oranında ve O ^{o}C'deki saf su ilave edilerek hemoliz edildi (Rickli ve ark., 1964; Cuatrecases, 1970; Armstrong ve ark.,1966; Brewer ve Sing, 1970; Furth, 1968). Hemolizin tam olması için O ^{o}C'de yarım saat süreyle karıştırıldı.

Daha sonra hücre zarlarını uzaklaştırmak için 14.000 rpm'de yarım saat soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Hücre zarları uzaklaştırılan eritrositlerin pH'sı katı Tris ile 8.7'ye ayarlandı. Böylece hemolizat kolona tatbik edilecek duruma geldi.

2.4.1.4. Hemolizatının afinite kolonuna tatbiki ve CA enziminin elüsyonu

Bölüm 2.5.1. de anlatıldığı gibi hazılanan afinite jeli, kedi eritrosit hemolizatından karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılmasında kullanıldı. Bu amaçla, kolon şu şekilde hazırlandı; 1,3 cm^2 x 18 cm boyutundaki kolona, jel bir huni yardımı ile dolduruldu ve jel çöktükten sonra tampon-A (pH= 8.7) ile 4 gün boyunca dengelendi. Yukarıda hazırlanan ve katı tris ile pH'sı 8.7'ye ayarlanmış hemolizat kolona tatbik edildi. Tüm hemolizatın kolondan geçirilmesinden sonra yarım saat beklendi. Bu sürenin sonunda yıkama tamponu, tampon-B (pH= 8.7) kolona gönderildi. Giriş-çıkış absorbans farkı spektrofotometrede, 280 nm'de takip edildi. Fark 0.1'in altına düşünceye kadar yıkama işlemine devam edildi. Böylece fark 0.05'e yaklaşınca, enzimin büyük bir kısmı jele tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu.

Bütün bu işlemler +4 ^{o}C'de ve akış hızı 50 ml/h olacak şekilde gerçekleştirildi (Ninfali ve ark., 1990).

Elüsyon tamponu olarak, 0.1 M $NaCH_3COO$ / 0.5 M $NaClO_4$ pH: 5.6 (tampon C) kolona tatbik edilerek 5'er ml saf enzim fraksiyonları toplandı. Elüsyon tampon çözeltisinin kolona akış hızı 20 ml/h olarak ayarlandı. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi. Toplanan bütün fraksiyonların ayrı ayrı karbonik anhidraz aktiviteleri ve Coomassie blue yöntemi ile kantitatif protein miktarları yapıldı.

Toplam enzim çözeltisinin Coomassie Blue yöntemi ile toplam protein miktarı ve spesifik aktiviteleri hesaplandı, saflaştırma oranı bulundu.

2.4.1.5. Saflaştırılan enzim çözeltisinin diyalizi

Saflaştırılan enzim çözeltilerinden yüksek oranda protein ihtiva edenler diyaliz torbasına konuldu. İlk önce destile suya karşı her 3 saate bir suyu değiştirerek toplam 24 saat, sonra 0.05 M Tris-SO4 (pH= 7.4) (tampon D) çözeltisine karşı 4 saat kadar diyalize bırakıldı. Diyaliz işlemi mağnetik karıştırıcı üzerinde ve buzdolabında (+4 ^{o}C) gerçekleştirildi (Cuatrecases, 1970). Böylece enzim çalışmalar için hazır hale getirilmiş oldu.

2.4.1.6. Saflaştırılan enzim çözeltilerinin derişik hale getirilmesi

Saf enzim çözeltisine istenilen hacmi sağlayacak miktarda, Sephadex-G25 kuru jeli ilave edildi. Kuru jel hacminin 5-6 katı su absorbe edebilmekte ve gözeneklerine molekül ağırlığı 5000'nin üzerinde olan peptid zincirleri girebilmektedir. Daha sonra enzim çözeltisi süzülerek jelden uzaklaştırıldı. Islak jel Buchner hunisine alınarak önce bol suyla sonra da aseton ile yıkandı ve etüvde (100-120 ^{o}C) kurutuldu. Böylece kuru jel tekrar kullanılabilecek hale getirilmiş oldu.

2.4.2. Protein tayini

2.4.2.1. Kalitatif protein tayini

Afinite kolonundan aldığımız fraksiyonların kalitatif protein tayini yapıldı. Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozin aminoasitlerinin spektrofotometrede 280 nm'de maksimum absorbans vermeleri esasına dayanmaktadır (Segel, 1968). Fraksiyonlar kuvarts küvetlere alınıp köre karşı absorbansları okundu.

2.4.2.2. Coomassie blue yöntemi ile kantitatif protein tayini

Afinite kolonundan elde ettiğimiz fraksiyonların her birinin kantitatif protein tayinleri yapıldı. Bu metot o-fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie Brillant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturmaları ve oluşan bu kompleksin 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermeleri esasına dayanır. Boyanın proteine bağlanması çok hızlı olmaktadır (ortalama 2 dak.). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

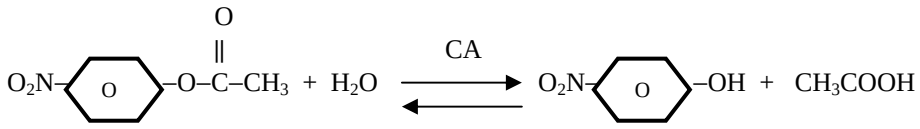
Protein tayin işlemleri şu şekilde gerçekleştirildi; 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır serum albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0.1 ml'ye tamamlandı. Her bir tüpe 5 ml Coomassie blue reaktifi eklendi ve vortex mikser ile karıştırıldı. 10 dakika inkübasyondan sonra, 595 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri kullanılarak standart bir grafik elde edildi. Enzim çözeltisindeki protein miktarları bu grafik yardımıyla hesaplandı (Şekil 3-1).

2.4.3. Karbonik Anhidrazın aktivite tayini

2.4.3.1. Esteraz aktivitesi tayini

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırıldıktan sonra enzimin saflaştırma oranı esteraz aktivitesi yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemin esası, çalıştığımız enzim olan karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olmasıdır. Yönteme göre, karbonik anhidraz enzimi, substrat olarak kullanılan paranitrofenilasetatı, paranitrofenol ve paranitrofenolata hidrolizlemektedir. Bu da 348 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans vermektedir.

Bu reaksiyonun denklemi aşağıdaki gibidir.



Hem paranitrofenol, hem de paranitrofenolat 348 nm'de aynı absorbansı göstemektedir. Bundan dolayı, fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Verpoorte ve ark., 1967). Bu dalga boyunda paranitrofenilasetatın da çok az bir absorbsiyonu olduğundan kör olarak kullanılmaktadır.

Tayin işlemleri yapılırken şu prosedür uygulandı: Kuvartz küvetlere 1.5 ml tamponlanmış enzim çözeltisi ve 1.5 ml substrat çözeltisi katıldıktan sonra vorteks ile karıştırılıp 3 dakika beklendi. Bu bekleme süresinin bitiminde 25 ^{0}C'de 348 nm'de absorbansları okundu. Kör olarak ise enzimsiz reaksiyon karışımı kullanıldı. Enzim çözeltisinin tamponlanması için 0.05 M Tris-SO_4 (pH= 7.4) (tampon D) çözeltisi kullanıldı.

Esteraz aktivitesi ölçümünde substrat olarak kullanılan paranitrofenilasetat çözeltisi günlük olarak hazırlandı ve hazırlandıktan sonra 5-6 saat içerisinde kullanıldı.

Substrat çözeltisi şu şekilde hazırlandı: 27.2 mg paranitrofenilasetat 1 ml asetonda çözüldü ve hızla karıştırılan 49 ml destile suya, yavaş yavaş eklendi. Hazırlanan bu çözelti 3 mM'lık olup, esterin sınırlı çözünürlüğü sebebiyle daha derişiğini hazırlamak mümkün değildir. Aseton diğer organik çözücülere oranla en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Çelik, 1995).

2.4.3.2. CO_2-hidrataz aktivitesi tayini

Bu metotta kullanılan yöntem, Maren ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları metodun, yine Maren tarafından modifiye edilmiş şeklidir. Bu yöntemde, CO_2'nin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H^+ iyonu sebebiyle pH'nın 10'dan 7.4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. pH 7.4'te renk değişimi

gösterdiğinden dolayı fenol kırmızısı indikatör olarak kullanıldı. Tampon olarak ise pH'sı 10 olan karbonat (tampon E) tamponu kullanıldı (Maren, 1960).

Aktivitelerin tespiti şu prosedüre göre yapıldı: Reaksiyon tüpüne önce 2 ml indikatör ve 1.5 ml doygun CO_2 çözeltileri konuldu. Bu karışıma 0.1 ml enzim çözeltisi eklendi. Aynı anda bu çözelti karışımına 0.4 ml karbonat tamponu katılarak, kırmızı rengin sarıya dönmesi için geçen süre kronomometre ile ölçüldü ve Tc olarak belirlendi. Kör olarak kullanılan tüpe 0.1 ml enzim çözeltisi yerine saf su kullanıldı ve aynı işlemler tekrarlanıp To belirlendi. Bu yöntemde CA enzim aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ), enzimsiz olarak meydana gelen CO_2 hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tarif edilmektedir.

Yani,

$$EÜ = \frac{To - Tc}{Tc}$$

Formülüne göre, kullanılan elüat hacmindeki enzim ünitesi hesaplanır (Maren, 1960).

Elde edilen değerler yukarıdaki formülde yerine katılarak % aktiviteler hesaplandı.

2.4.4. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Enzim aktivitesine etki eden etkenlerden biride sıcaklık parametresidir. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklığa "optimum sıcaklık" denir. Optimum sıcaklık inkübasyon süresine karşı oldukça hassastır. İnkübasyon süresi ne kadar uzatılırsa optimum sıcaklık da aynı oranda düşer.

Karbonik anhidraz enzimi için optimum sıcaklık 20 ile 90 ^oC arasında, sabit pH da ve 15 dk. inkübayon süresinde bekletilerek aktivite tayinleri yapıldı.

2.4.5. Enzim aktivitesi üzerine pH' nın etkisi

Enzim aktivitesini en yüksek olduğu pH'ya "optimum pH" denir. Enzim aktiviteleri pH'ya karşı oldukça hassastır; bu nedenle çalışmalarda ortamın pH'sını optimum pH'ya yakın tutabilmek için tampon çözeltiler kullanıldı.

Karbonik anhidraz enzimi için sabit sıcaklıkta (37^oC de) pH 2-13 arasındaki aktivite tayinleri yapıldı.

2.4.6. Enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisi

Enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisini belirlemek için sabit sıcaklıkta (37^oC de) ve sabit pH'da (7,4); 0.04 M, 0.08 M, 0.12 M, 0.16 M, 0.20 M, 0.25 M, 0.30 M, 0.50 M konsantrasyonlarda Amonyum Sülfat [$(NH_4)_2SO_4$] reaksiyon ortamına katılarak aktivite tayinleri yapıldı.

2.5. Kedi Eritrositlerinden Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin SDS-Poliaakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü

Afinite kromatografi ile kedi eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin, saflık derecesini kontrol etmek için sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulandı. Bu metotta % 10'luk konsantrasyonunda akrilamid, kesikli SDS-PAGE Laemmli tarafından (Laemmli, 1970) anlatıldığı gibi uygulandı.

Jelin hazırlanması ve çalışma şu şekilde yapıldı; elektroforez plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Plakaları birleştiren mikaların iki tarafına da ince tabaka halinde vazelin sürüldü ve iki cam plaka birbiri üzerine konulup kıskaçla tutturuldu ve jel hazırlama cihazına konuldu. Önce kaynama sıcaklığına getirilip sonra 40-50 ^{o}C'ye kadar soğutulan agar, iki cam plaka arasına döküldü ve plakaların arası kapatıldı.

Taze olarak hazırlanan ayırma jeli, enjektör yardımıyla cam plakaların arasına dikkatlice döküldü. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için % 0.1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Jelin katılaşması için 30 dakika kadar beklendi. Daha sonra ayırma jeli üzerindeki % 0.1'lik SDS döküldü. Üst yüzeye kadar çok dikkatli bir şekilde, enjektörle yığma jeli ilave edilip üzerine tarak yerleştirildi. Jelin donması için bir müddet beklendi. Donan jel üzendeki tarak çıkarıldı. Jel üzerinde tarağın açmış olduğu yarıklar saf su doldurulduu ve bir gece beklendikten sonra yarıklardaki su boşaltılarak plakalar arasındaki jel elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşlukların başlama yerleri işaretlenerek, jelin üstü önce saf su ile sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Elektroforez için numune şu şekilde hazırlandı; numunelerin her birinde 20 μg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 75 μl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Daha sonra bu çözelti karışımı kaynar su banyosunda 3 dakika kadar bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandı. Soğutulan numuneler, çok ince bir enjektör yardımıyla jel oyuklara tatbik edildi. Tank kapağı kapatıldı ve alt taraftan (+) yüklü kablo (anot), üst taraftan (-) yüklü kablo (katot) yerleştirildi. Yarım saat 80 voltta bekletildikten sonra, voltaj 150 volta çıkarılıp, oda sıcaklığında 5-6 saat (protein ve boya çözeltisin yürümesi için) bekletildi. Yürütme işlemi, jelin alt ucundan 1-2 cm mesafeye kadar devam edince, akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere kabına konuldu. Yığma jel kesilip ayrıldıktan sonra, protein bantlarını içeren ayırma jeli özel kabına konularak, üzeri örtülünceye kadar renklendirme çözeltisi döküldü. 1.5-2 saat çalkalayıcı üzerinde çalkalandıktan sonra, jel renklendirme çözeltisinden renksizleştirme çözeltisine aktarıldı. Belirli aralıklarla çözelti değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı renksizleştirme çözeltisi aktif karbon süzülerek, yeniden kullanılabilir hale geldi.

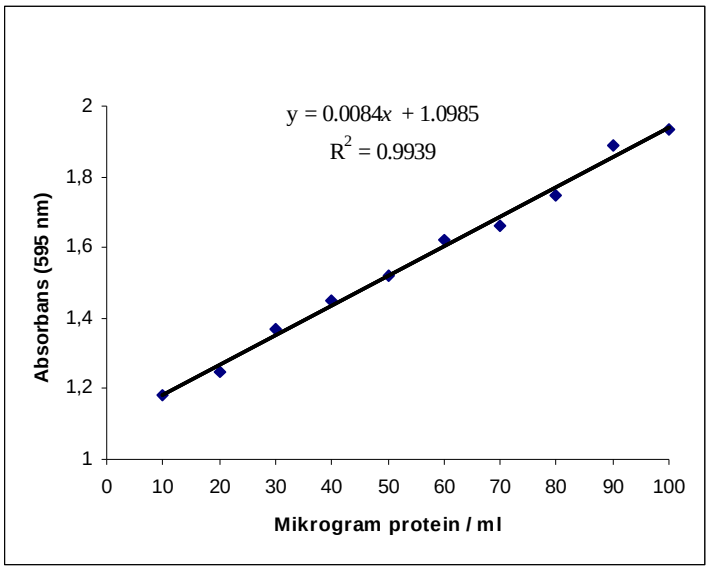
Böylece protein bantları belirgin hale geldi. Belirginleşen protein bantlarının standart (referans) ile birlikte fotoğrafı çekildi. Bu fotoğraf şekil 3.3 de gösterilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Grafik

Kantitatif protein tayini için Coomassie Blue yöntemi kullanıldı. Coomassie Blue yönteminde tayin yapabilmek için önce bir standart grafik hazırlandı. Grafik çizimi bilgisayarda Mikrosoft Excel paket programına göre hazırlandı. Hemolizattaki ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları bu grafik yardımı ile hesaplandı.

Standart grafiğin çiziminde kullanılan çözeltilerin, değişik μg protein/ml konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen 595 nm'deki absorbans değerleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



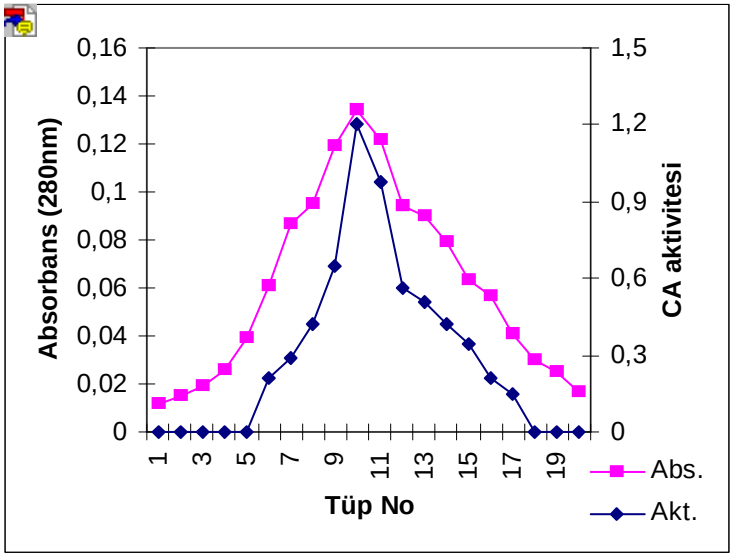
Şekil 3.1. Coomassie Blue Yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik

3.2. Van Kedisi Eritrositlerinden Saflaştırılan Karbonik Anhidrazın Afinite Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları

Enzimin saflaştırılması işleminde, hemolizat kolona tatbik edilmeden önce jel tamponla iyice dengelendi ve daha sonra hemolizat kolona tatbik edildi. Yıkama tamponu ile iyice yıkandıktan sonra elüsyon tamponu ile enzim kolondan elüe edildi.

Elüatlar her tüp için belirli ml'de fraksiyonlar halinde toplandı. Toplanan fraksiyon tüplerinin her birine 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı.

Absorbsiyon gösteren tüplere esteraz aktivitesi tayini yapıldı. Yapılan bu saflaştırma işlemin grafiği Şekil 3.2. de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Enzim aktivitesi-kantitatif protein tayin grafiği

Hemolizat için yapılan protein tayininde ml'deki protein miktarı 390.47 mg olarak bulundu. Enzim ünitesi 0.718 EÜ/ml olarak hesaplandı. Hemolizat için spesifik aktivite (Hemolizat 1/10 oranında seyreltildi).

$$\frac{\text{EÜ / ml}}{\text{mg.protein /ml}} = \frac{0.718}{390.47} = 0.00183 \text{ EÜ/mg. protein}$$

olarak bulundu.

Saflaştırma sonucu elde edilen enzim çözeltisinin, Coomassie blue yöntemi ile protein miktarına ve Esteraz aktivitesine bakıldı. Saflaştırılan enzim çözeltisi için ml'deki enzim ünitesi 1.2 EÜ ml'deki protein miktarı da 1.785 mg olarak bulundu.

Enzim çözeltisi için spesifik aktivite:

$$\frac{\text{EÜ / ml}}{\text{mg.protein / ml}} = \frac{1.20}{1.785} = 0.672 \text{ EÜ/mg.protein}$$

olarak bulundu.

Saflaştırma oranını bulmak için saflaştırma sonucundaki spesifik aktivite değeri, başlangıçtaki spesifik aktivite değerine bölünür. Buna göre;

$$\text{Saflaştırma oranı} = \frac{0.672}{0.00183} = 367.21$$

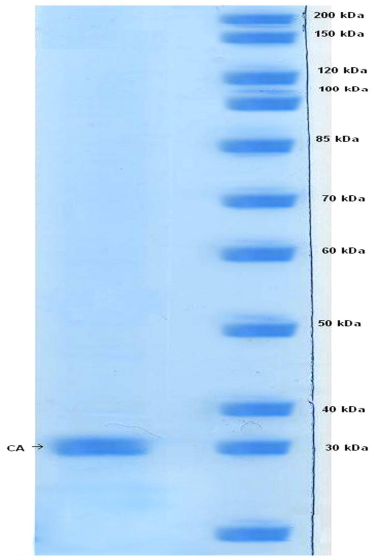
kat olarak bulunmuştur.

Bulunan bu değerlere göre hemolizatın doğrudan affinite kolonuna uygulanması sonucunda, hemolizattan enzim 367.21 kat saflaştırılmış oldu.

Çizelge 3.1. Van Kedisi eritrositinden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin saflaştırma sonuçları

Saflaştırma Basamakları	Hacim (ml)	Enzim aktivitesi (EÜ/ml)	Top.Enzim ünitesi (EÜ)	Toplam protein (mg/ml)	Spesifik aktivite (EÜ/mg.pro)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	45	0.718	32.31	390.47	0.00183	……
Afinite kolonu	30	1.20	36	1.785	0.672	367.21

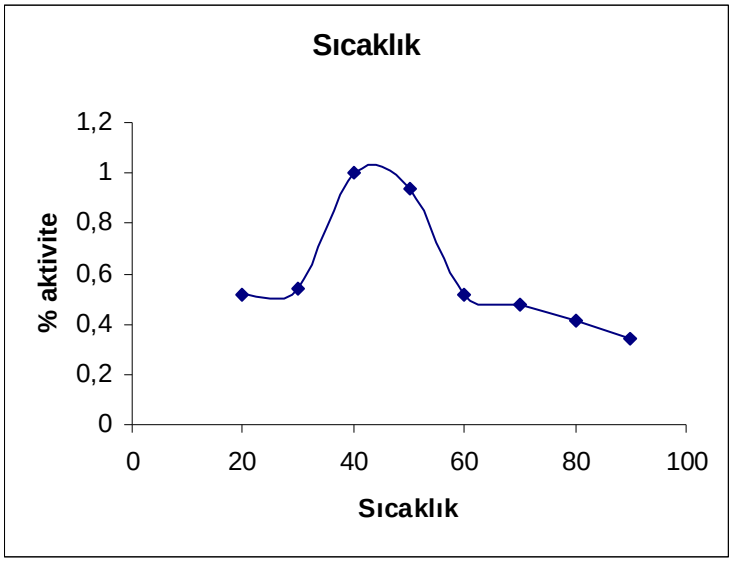
Saflaştırma sonucu elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekildi ve bu fotoğraf Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Afinite kromatografisi ile kedi eritrositlerinden saflaştırılan Karbonik anhidraz enziminin SDS-PAGE bantı

3.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın, enzimlerin katalizledikleri reaksiyonların hızları üzerine etkileri bilinmektedir. Enzimlerin katalizledikleri reaksiyonların hızları genellikle optimum sıcaklığa kadar doğru orantılı bir şekilde artar. İlk başta sıcaklığın artması ile birlikte ortamın kinetik enerjisi de artar ve buna paralel olarak hızda artar. Belli bir sıcaklıktan sonra enzimlerin fonksiyon gören üç boyutlu yapılarında bozulmaların meydana gelmesiyle aktivitelerinde de bir azalma meydana gelir. Eritrositler üzerine değişik sıcaklıklarda yapılan aktivite çalışmaları Şekil 3.4'te verilmiştir. Buna göre enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık 40 ^{o}C olarak bulunmuştur. Ama sıcaklığın 10'ar birim arttığı göz önüne alındığında optimum sıcaklığın 35-45 ^{o}C derece arasında olduğu söylenebilir.



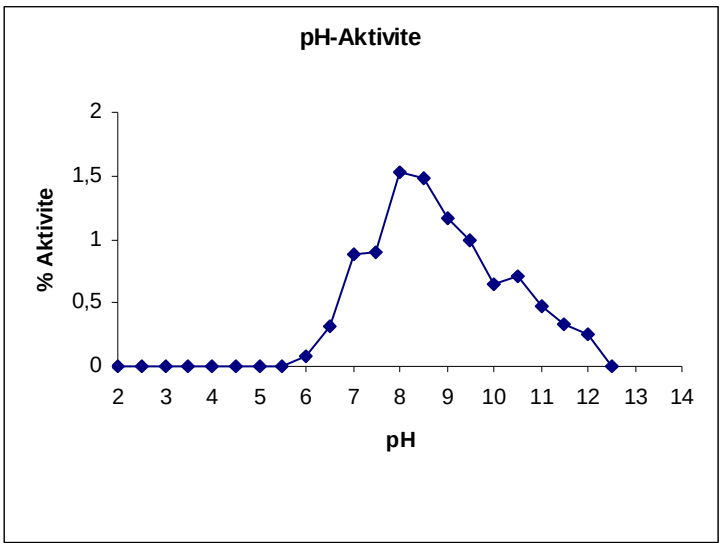
Şekil 3.4. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı grafiği

3.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzimin pH değişimine karşı gösterdiği davranışlardan elde edilen sonuçlar şekil 3.5. de görüldüğü gibi grafik olarak bir araya toplanmıştır. Enzim aktivitesi birkaç pH değerinde ölçüldüğü zaman optimal aktivite genel olarak pH 7.5 ile 9.5 değerleri arasında olduğu gözlenir. pH değerlerindeki değişiklikler enzimlerin katalizlediği tepkimelerin hızlarını etkilemektedir. PH'daki bir değişiklik substratın

iyonizasyon durumunda, enzimin bağlanma bölgesinde ve katalitik aktivitesinde değişikliklere neden olmaktadır.

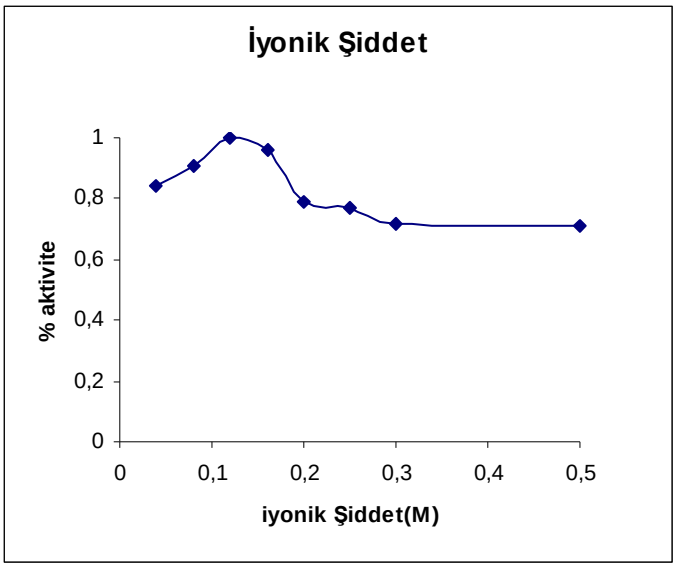
Enzimler pH değiştiği zaman şekilsel değişikliklere de uğrarlar. Negatif yüklü bir enzim ve pozitif yüklü substrat örnek olarak alındığında; düşük pH'da negatif yüklü enzim protonlanacak ve kendi yükünü kaybedecektir; yüksek pH'da ise pozitif yüklü substrat iyonize olacak ve kendi pozitif yükünü kaybedecektir. Enzimin katalitik grubuna yakın olan ve bağlanmada rol alan amino asit rezidüleri üzerindeki bu yük değişimi enzimin aktivitesini mutlaka değiştirecektir.



Şekil 3.5. Enzim aktivitesinin pH'ya bağlılığını gösteren grafik.

3.5. Enzim Aktivitesi Üzerine İyonik Şiddetin Etkisi

Enzimin iyonik şiddete karşı gösterdiği davranışlar şekil 3.6 da gösterilmiştir. Buna göre en yüksek aktivite 0.12 Molar $(NH_4)_2SO_4$ konsantrasyonunda göstermektedir. Her protein farklı iyonik şiddetli ortamda çökelme gösterdiğinden bu yolla proteinler birbirinden ayrılmaktadır. Proteinler salting-out sırasında konformasyonlarını korurlar ve uygun ortamlarda tekrar çözelti fazına alınabilirler. İşte enzimler en uygun tuz konsantrasyonunda maksimum aktivite gösterirler.



Şekil 3.6. Enzim aktivitesinin iyonik şiddete bağlılığını gösteren grafik

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Van Kedisi eritrositlerindeki Karbonik Anhidraz enzimi affinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmış ve bu enzimin bazı kinetik davranışları incelenmiştir.

Canlı organizmalarda karbonik anhidraz enzimi birçok doku ve organellerde bulunmakla birlikte, en çok kanda bulunmasından dolayı karbonik anhidraz kaynağı olaarak kan eritrositleri tercih edilmiştir

Kedilerde kan miktarı diğer bazı omurgalılara oranla az olup ağırlıklarının % 4-5'i kadardır. Bu durum, kedilerden karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasının materyal açısından ne kadar güç ve zaman alıcı olduğunu gösterir. Kaldı ki çalışmalarda oldukça fazla miktarda enzime ihtiyaç duyulmaktadır. Materyal olarak bu kedinin seçilmesindeki en büyük etkenlerden birisi Van Kedisi karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisi yardımıyla saflaştırılması hakkında şimdiye kadar literatürde hiçbir bilgiye rastlanmamış olmasıdır.

Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekül veya biyolojik ünitenin "matriks" adı verilen çözünmeyen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand), spesifik ve tersinir olarak bağlandığı bir tekniktir. Bu sayede zor ve bazı hallerde imkansız olan birçok ayırma tekniklerine oranla kısa zamanda saflaştırma gerçekleştirilmekte ve yüksek bir verimle binlerce saflaştırılan bileşikler elde edilmektedir (Cuatrecases, 1970).

Afinite kromatografisinin bu üstün özellikleri göz önüne alınarak çalışmamız için bu yöntem tercih edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda kedi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılma oranı 367.21 olarak bulunmuştur. Yapılan bazı literatür çalışmalarda sırasıyla insan eritrosit CA, 119.19; sığır eritrosit CA, 369.8 ve Van balığı inci kefalinde ise 383 kat saflaştırılmıştır (Demir ve ark., 2001; Çelik, 1995; Tozlu, 1997).

Afinite kolonunda aktifleşmiş Sepharose-4B matrisi üzerine hazırlanmış afinite jeli kullanıldı. Sepharose-4B'nin seçilmesinin başlıca sebebi, çok iyi akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest –OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir sürede aktifleşebilmesidir. Aktif haldeki Sepharose-4B'ye tirozin kovalent olarak takılmış daha sonra sülfanilamid tirozine kenetlendirilmiştir. Sülfanilamid, enzimin spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinde enzimi bağlayıcı rolü üstlenmektedir. Tirozin ise, afinite jelinin uzantı kolunu oluşturarak enzimin daha iyi tutunmasını sağlamaktadır. Çünkü karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesindeki globuler protein yapısının 12-15 A^o derinliğinde olduğu x-ışınları kristallografisi ile belirlenmiştir (Küfrevioğlu, 1985).

Ligand olarak karbonik anhidrazın güçlü inhibitörlerinden olan sülfanilamid kullanılmıştır. Bu ligand canlı organizmalarda izoenzimlerin ayrılmasında önemlidir.

Afinite kromatografisi ile karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması esnasında elüatların protein muhtevaları 280 nm'de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif tayin, protein yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır (Jacnicke, 1984).

Protein miktarlarının belirlenmesinde Coomassie Blue yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin seçilmesinin sebebi, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin

olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre stabil olarak kalması, hassasiyet sınırının çok iyi olması ve enzim çözeltilerinin μg seviyesinde bulundurmasıdır (Bradford, 1976). Ayrıca bu metodun diğer önemli bir yanı ise, az reaktif gerektirmesi her çalışmada ayrı bir standart hazırlamaya gereksinim duyulmamasıdır.

Saflaştırma kolonundan elde edilen fraksiyonlardan aktivite gösterenler bir araya toplanmış, bunların içinden yüksek aktivite gösterenler diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyaliz işlemi, saf suya karşı 24 saat (8 kez 3'er saat) sonra Tampon D'ye karşı 3-4 saat süreyle yapılmıştır. Bu işlemler +4 ^{o}C de gerçekleştirilmiştir (Cuatrecases, 1970).

Saflaştırılan enzim çözeltilerini derişikleştirip biyokimyasal çalışmalarda kullanılabilecek duruma getirilebilmek için Sephadex G-25 kuru jeli ilave edildi. Sephadex G-25'in derişikleştirme kabiliyeti su çekme özelliğinden kaynaklanmaktadır. Üretici firma tarafından belirtildiği gibi, kendi hacminin 5-6 misli kadar su absorbe eden bu bileşiğin gözeneklerine, molekül ağırlığı 5000'in üzerinde olan peptid zincirleri girememektedir (Pharmacia, 1970). Üzerinde çalıştığımız karbonik anhidraz enziminin molekül ağırlığının 30.000 civarında olduğuna göre enzimimiz bu jelin gözeneklerine giremediğinden dolayı derişik hale gelmektedir.

Karbonik anhidraz enziminin aktivite tayini iki metotla yapıldı. Birincisi; Maren ve arkadaşlarının (1960) geliştirmiş oldukları ve yine Maren tarafından modifiye edilmiş yöntemdir. Bu yöntemde temel prensip, CO_2'nin H_2O ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H_2CO_3'ün H^+ ve HCO_3^- iyonlarına ayrışması sonucunda ortaya çıkan H^+ iyonu sebebiyle pH'nın 10 dan 7.4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır. Burada fenol kırmızısı indikatör olarak kullanıldı ve bu indikatör pH 10 dan 7.4'e düşerken kırmızı renkten sarı renge dönüşümü için geçen süre esas alındı. Bu tayin yönteminin en önemli dezavantajı pH'nın değişken olmasıdır. Çünkü enzim aktivitesinin bağlı olduğu parametrelerden biriside pH'dır. Karbonik anhidraz ile ilgili yapılan karakterizasyon çalışmalarda bu bahsedilen yöntemin yanı sıra sabit pH'da esteraz aktivitesi yöntemi kullanıldı. Armstrong ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu bu metod, karbonik anhidraz enziminin ester bağını hidroliz etmesi (esteraz aktivitesi) esasına dayanır. Kromatografi işlemlerinde fraksiyonlardaki aktivitenin belirlenmesinde bu yöntemi kullandık. (Armstrong ve ark., 1966; Verpoorte ve ark., 1967).

Karbonik anhidraz enzimi paranitrofenil asetatı, paranitrofenole hidrolizlemekte ve bu da 348 nm'de absorbsiyon vermektedir.

Sepharose 4B-L-tirozin-sülfanilamid kimyasal yapısındaki afinite jeli kullanılarak, kedi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması laboratuarımızda gerçekleştirilmiştir. Söz konusu olan bu enzimin kolondan elüsyonu için en uygun elüsyon çözeltisinin 0.1 M $NaCH_3COO$ / 0.5 M $NaClO_4$ pH: 5.6 (tampon C) olduğu tespit edilmiştir.

Saflaştırılan CA enzimleri üzerindeki optimum sıcaklık çalışmalarında, optimum sıcaklık 40 ^{o}C olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklığın tayini çalışmalarında sıcaklığın 10'ar birim artırıldığı göz önüne alındığında, optimum sıcaklığın 35-45 ^{o}C arasında olduğu görülmüştür. Yapılan bir araştırmada afinite kromatografisi yardımıyla insan ve sığır eritrosit CA enzimi saflaştırılmış ve sırasıyla optimum sıcaklık 37ve 35 ^{o}C olarak bulunmuştur (Demir ve ark., 2000; Demir ve ark., 2001). Van Kedisi eritrositlerinden saflaştırılan enzimin optimum sıcaklığı (40 ^{o}C) yapılan diğer çalışmalarla uyum içersinde olduğu görülmektedir.

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin izoelekrik pH'ları canlılarda farklılık göstermektedir. Eritrosit izoenzimleri için PH, insanda 7.4 ve 5.7, atta 10.0 ve 6.0, sığırda 5.2, domuzda 7.3 ve 5.2, köpek balığında 4.5 olarak saptanmıştır (Rickli ve ark., 1964; Mc Intosh, 1969). Yaptığımız Optimum pH çalışmalarında optimum pH değeri 8.0 olarak tespit edilmiş ise de genel olarak çalışmalarda optimum pH 7.5-9.5 arasındadır. Bu bulunan değer diğer yapılan çalışmalardaki değerlerle büyük bir uyum içersindedir. Kedi dokusu üzerine yapılan bir çalışmada ise karbonik anhidraz enzimi için optimum pH 4.35 - 4.70 olarak saptanmıştır (Fujimori ve ark., 1986). Bu değerler bizim bulduğumuz değerlerden farklıdır bunun muhtemelen sebebi kedi cinsinden olabilir.

Yapılan başka bir çalışmada ise insan eritrosit CA ve sığır eritrosit CA saflaştırılmasında optimun pH sırasıyla 7.4 ve 7.5 olarak saptanmıştır (Demir ve ark., 2000; Demir ve ark., 2001). Saptanan bu değerler bulduğumuz değerlere yakın değerlerdir.

İyonik şiddetin karbonik anhidraz enzimi üzerindeki etkisinin araştırılmasında en yüksek aktiviteyi 0.12 M $(NH_4)_2SO_4$ konsantrasyonunda gösterdiği görüldü. $(NH_4)_2SO_4$ amonyum sülfatın suda çok iyi çözünmesi ve çok yüksek iyonik şiddet özelliği göstermesinden dolayı iyonik şiddet çalışmalarında bu çözelti kullanıldı.

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin saflığının kontrolü SDS-Poliakrilamid Jel Eletroforezi ile yapıldı (Laemmli, 1970). Elektroforez sonucunda tek bant gözlenmiştir. Elektroforezde tek bant olması tatbik edilen çözeltide sadece bir tek proteinin var olduğunun kanıtıdır. Bu proteinde karbonik anhidraz enzimidir (Şekil 3.3). Genellikle karbonik anhidraz izoenzimlerinin molekül ağırlıkları, 29.000-30.000 dalton arasında olduğu çalışmalarda bulunmuş, buna karşın bitki kloroplastlarında ise karbonik anhidrazı yaklaşık 180.000 dalton olduğu saptanmıştır. Yine yapılan çalışmalarda tavşan eritrositlerinde 54.000 dalton ve insan böbreğinde ise 66.000 dalton molekül ağırlığına sahip karbonik anhidraz saptanmıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise insan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enzimin molekül ağırlığı 36.600 olarak saptanmıştır (Tobin, 1970; Pocker ve Joan, 1973; Pocker ve Joan, 1974; Carter ve ark., 1979; Schaer ve Dietsch, 1984; Demir ve ark., 2001). Yapılan bu çalışmada bulunan molekül ağırlığı literatür değerleriyle uyuşmaktadır.

Saflaştırılan enzimlerin dondurularak saklanması ya da liyoflizatörde kuru preperat haline getirilmesi ile uzun süre stabil olarak saklandığı çalışmalarda görülmüştür. Fakat yine de zamanla enzimin aktivite kaybetmesi engellenememektedir. Bu da enzimlerin kompleks yapılı ve allosterik karakterlerinden kaynaklanmaktadır. Bu sonuçta karbonik anhidrazın karakterizasyonuna uygunluk göstermektedir.

Bu araştırma bundan sonra Van kedisinden saflaştırılacak enzim ve karekterizasyon ile ilgili çalışmalarına katkıda bulunacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

Anonim, 2005. ***Van Kedisi***, T.C. Kültür ve Turizm Bakanlığı. www.kultur.gov.tr.

Aldemir, S., 2002. ***Koyun Karaciğerinden Glikoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Karakterizasyonu*** (yüksek lisans tezi).Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van.

Alırız, S., 2000. ***İnci Kefalinden (Chalcalburnus tarichi, Pallas 1811) Asetilkolinesteraz Enziminin (E.C.3.1.1.7) Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması*** (yüksek lisans tezi).Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van.

Armstrong, J. Mc. D., Myers, D. V.., Verpoorte, J. A., Edsall, J. T. 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. ***J. Biol. Chem.,*** 214,5137.

Arslan, O. 1994. ***Glaucoma hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday karbonik Anhidraz inhibitörlerinin sentezi ve inhibisyon etkilerinin araştırılması*** (doktora tezi). Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.

Axen, R., Ernback, S., 1971. Chemical fixation of enzymes halide activated polysaccharide carriers. ***Eur. J. Biochem***, (**18**): p 351-360.

Bingöl, G., 1983. ***Biyokimya.*** Güven Matbaası. Ankara. 169-174s.

Botre, F., Gros, G., Storey, B.T., 1991. ***Carbonic Anhydrase.*** From biochemistry and genetics to physiology and clinical medicine. YCH, Weinhcim, 151-182s.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein dye binding. ***Anal. Biochem***., 72 (7):248

Brewer, G.J., Sıng, C.F., 1970. An introduction to izoenzymes techiques. ***Academic Press. Inc.*** New York. p 207.

Carter, M. J., Parsons, D. J. 1972. The isoenzymes of carbonic anhydrase: kinetic properties with particular reference to its functions in the gastrointestinal tract, ***J. Physiol***, 220-465.

Carter, M.J., 1972. ***Carbonic Anhydrase***. İzoenzymes, properties, distribution and functional significance, Rew. 42, p 465-513.

Carter, N., Jeffery, S., Shiels, A., Edward, Y., Tipler, T., Hopkinson, D.A. 1979. Characterization of human anhydrase III. from skeletal muscle. ***Biochemical Genetics*** (**17**): p 837-853.

Carter, N., Hewertt-Emmentt, D., Jeffery, S., Tashian, R.E, 1981. Testesterone induced sulfonamid resistant carbonic anhydrase isozyme of rat liver is indistinguisable from skeletal muscle carbonic anhydrase ***III. Febs Letters 128***: 114-118.

Champe**,** P.C.,Harvey, R.A.,1997. ***Biyokimya***. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti.İstanbul. 442.

Cuatrecases, P., Wilchek, M., Anfinsen, C.B., 1968. Selective enzyme purification by affinity chromotography. ***Proc. Nat. Acod. Sci. 61***: p 636-643.

Cuatrecases, P., 1970. Protein purification by affinity chromotography. ***The Your of Biochem.,245*** (11): 3059-3065.

Çelik, İ., 1995. ***Bazı Pestisit ve Bitki Büyüme Regülatörlerinin Sığır ve İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması*** (doktora tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Van.

Davenport, H. W., Fisher, R. B. 1938. Carbonic anhydrase in the gastrointestinal mucosa***. J. Physiol.*** p 94-116.

Demir, N., Demir, Y., Nadaroglu, H. Bakan, E., 2000. Purification and characterization of carbonic anhydrase from bovine erythrocyte plasma membrane.***Prep. Biochem and Biotechnol.*** **(30)**: 49-69.

Demir, N., Demir, Y., Çoşkun, F. 2001. Purification and characterization of carbonic anhydrase from human erythrocyte plasma membrane.***Turk. J. Med. Sci.*** **(31)**: 477-482.

Falkbring, S.O., Göthe, P.O., Nyman, L., Porath, J. 1972. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. ***FEBS. Letter,*** 24.229.

Fernley, R.T., 1988. Non-cytoplasmic carbonic anhydrase. ***TIBS,*** (***13***): 356-359.

Fujimori, H., Levison, P.R., Schachter, M. 1986. Purification and partial characterization of cat pancreatic and urinary kallikreins comparison with other cat tissure kallikreins and related proteases. ***Adv. Med. Biol***. (**198**): pt A: 219-228.

Furth, A.J., 1968. Purification and properities of horse erythrocyte carbonic anhydrases. ***The Jour. of Biol. Chem.,*** (**227**): p 680.

Gözükara, E., 1997. Enzimler. ***Biyokimya.*** Ofset Repromat Ltd. Şti. Ankara.

Harper, H. 1975. Enzymes. ***Review of physiologcal chemistiry.***Californiyalos Altos 15 th Edition. p 126-172.

Heldrum, N.U., Roughton, F. J. W. 1933. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties***. J. Physiol*** (***80***): p 113-142.

Henderson, L. E., Henrsson, P., Hyman, P. O. 1973. Amino acid sequence human erytocyte carbonic anhydrase C. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** (**52**): 1388.

Jabusch, J.R., Deutsch, H.F., 1989. Localization of the Iysines actylated in ubiquitin reached with P-nitrophenyl acetat***. Arch. Biochem. Biophys***., 238,170.

Jaenicke, I., 1984. Protein bestimmung cinfuhrung in the praxis des. ***Biochemilcers,*** p 27. Köln.

Johansen, J.T. 1976. Isolation of human carbonic anhydrase B and C and apocarbonic anhydarse by affinity chromatography. ***Carlsberg Res. Commun***. p 41.73.

Johansson, I., Forsman, C., 1993. Kinetic studies of pea carbonic anhydrase. ***Eur. J. Biochem.*** (**218**): 439-446.

Kaiser, E.T., Lo, K.W., 1969. The carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sülfonic sultone. ***J. Am. Chem. Soc***,(**91**): 4912.

Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 1997. ***Biyokimya***, Muhtelif kısımlar. Şafak Yayınevi, Erzurum.

Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2005. ***Biyokimya***, Aktif Yayınevi, Erzurum.

Kohn, J., Wilchek, M., 1978. A colorimetric method for monotoring activation of sepharose by cynojen bromide***. Brochem. Biphy. Res. Commun***, p 7-14.

Küfrevioğlu, Ö. İ., 1985. ***Apokarbonik Anhidrazın Tekrar Aktivasyonu ile Bazı***

Vücut Sıvılarında Zn^{+2} Miktarı Tayini. Atatürk Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü (doktora tezi). Erzurum.

Laemmli, D.K., 1970. ***Cleavage of Structural Proteins During in Asembly of the Head of Bacteriophage T_4***. Nature. London. 227-244.

Lehninger, A. L., 1982. ***Principles of Biochemistry***. Worth publisher, Acedemic Press, New York. 587-665.

Lehninger, A. L., 1993. ***Principles of Biochemistry,*** New York, Worth Publishers Inc., 2th Edition p 198-239.

Lindskop, S., Henderson, L. E. 1971. Carbonic anhydrase. The Enzymes, 5.3nd**.** New York***, Aacademic Press***. p. 587.

Lin, K. T. D., Deusch, H. F. 1974. Human erythrocyte CA. ***Biochem. Biophys. Res. Commun,*** (**48**): 670.

Magid, E., 1968. The dehydration kinetics of human erythrocyte carbonic anhydrase B and C ***Biochem Biophys. Acta***. 151-239.

Majeau, N., Coleman, J.R., 1994. Correlation of carbonic anhydrase and ribulose 1.5 bishphosphate carboxilase/oxygenase expression in pea. ***Plant physiol.*** (**104**): 1393-1399.

Maren, T. H. 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and 1+5 inhibitors. ***J. Pharmac. Exp. Ther.*** (**160**): p 26.

Maren, T. H. 1967. Carbonic anhydrase, Chemistry, physiology and inhibition. ***Physiol, Rew.*** (**47**): p 595-781.

Maren, T. H., Conto, E.D. 1979. The nature of anion inhibition of human red cell carbonic anhydrase**.** ***Arch. Biochem. Biophys***., 196-501.

Mc Intosh, J. E. A. 1969. Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythroyetes and dorsolateral prostate of the rat. ***Biochem, J.*** p 114-463.

Ninfali, P., Orgerigo, T., Boracionian, S., 1990. Rapid Purification of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase From Mammals Erythrocytes. ***Preparative Biochemistry,*** (***2***): 297-309.

Nistiha, T., Deutsch, H.F., 1986. Acylation and carbamoylation of eqine muscle carbonic anhydrase (CA-III) upon reaction with p-nitrophenil esters and carbomyI-phosphate, ***Int. J. Biochem. Biophys.***(**238**): 170.

Nyman, P.O., Lindskog, S., 1964. Amino acids composition of the various from of bovine and human erythrocytes carbonic anhydrase. ***Biochem. Biopsy. Acta.,*** (***85***): p 1411.

Ocarra, P., Bary, S., Griffin, T., 1973. Spacer arms in affinity chromatography. The need for a more rigorous approach. ***Biochem. Soc. Trens. I***. p 289-290.

Özdemir, H. 1992. ***Bazı Aktif Katyonların Değişik Orjinli Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması*** (yüksek lisans tezi). Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Patterson, B.D., Atkins, C.A., Graham, D., Wills, R.B.H., 1971. ***Carbonic Anhydrase. Analytical Biocemistry***, (**44**): 388-391.

Pharmacia, Fine Chemical, 1970. ***Sephadex Ion Exchanger***. A Quide to Ion Exchange Chromatograpy, Upsalla, Sweden.

Pocker, Y., Joan, S. Y. 1973. Plant carbonic anhydrase, properties and carbondioxide hydration kinetics. ***Biochemistry*** (**12**): p 5127-5134.

Pocker, Y., Joan, S. Y. 1974. Plant carbonic anhydrase, hydrase activitiy and its revesible inhibition. ***Biochemistry*** (**13**): p 5116-5120.

Pocker, Y., Sarkanen, S. 1979. Carbonic anhydrase, Structure catalytic versatility and inhibition. ***Advances in Enzymology*** (**49**): p 149-273.

Polya, J. B., Wirtz, A. J. 1965. Studies on carbonic anhydrase-II occurence of the enzyme in some invertesrates. ***Enzymologia*** (**30**): p 27-37.

Popova, L.P., Lazova. G.N., 1993. Effect of abscicis acid and jasmonik acid on carbonic anhydrase activity of ethiolated pea seedlings with cycloheximinde and ahloramphenical. ***Comtes Rendus de I'Academie Bulgare des Sciences,*** 46 (**1**): 101-104.

Pullen, L.M., Noltman, E.A., 1985. Speesific arginine modification at the phosphatase site of muscle carbonic anhydrase. ***Biochem.***. (**18**): 319.

Register, A.M., Koster, M.K., Moltmann, E.A., 1978. Discovery of carbonic anhydrase in rabbit skeletal muscle and evidence for its identity with basic muscle protein. ***The journal of Biological Chemistry,*** (**243**): 4143-4152.

Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A., Gıbbons, B.H., Edsall, J. T. 1964. Carbonic anhydrase, from human erythrocytes.***J. Biol. Chem.*** (**239**): p 1065-1078.

Roughton, F.J.W. and Booth, V.H. 1946. The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. ***Biochem.J.*** (**40**): 319.

Segel, I.H., 1968***. Biochemical Calculations.*** John Wiley and Sons Inc., New York.403.

Schaer, A. and Dietsch, P. 1984. A. 54000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. In biology and chemistry of the carbonic anhydrases (ed, Tashıan, R. E. and Hewett-Emmett, D.), ***The Annals of the New York Academy of Sciences.*** (**429**): p 241-243.

Spencer, K.G., Kimpel, D.L., Fisher, M.L., Togasaki, 12. K., Miyachi, S., 1983. Carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinharatii* ***II. Plant & Cell Physiol.***, 24 (**2**):301-304.

Stryer, L. 1981. Introduction to enzymes. ***Biochemistry***, San Fransisco, W.H. Freeman and Copany, p 103-131.

Sültemeyer, D., Schmidt, C., Fock., H.P., 1993. Carbonic anhydrases in higher plants and aquatic microorganisms . ***Physiologia plantarum,*** (***88***): 79-180

Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., Goodman, M., 1983. On the evalution and genetics of carbonic anhydrases I and II Isozymes. ***Current topics in biological and medical research, molecular structure and refulation. Alan R., Lss Inc,*** (**7**): 79-100**.**

Tekman, Ş., Öner, N., 1986. ***Genel Kimya***, I. Cilt, Fatih yayınevi matbaası, İstanbul. s 335-367.

Tobin, A. J. 1970. Carbonic anhydrase from parsley leaves. ***The journal of biological chemistry (*****245**): p 2656-2666.

Tozlu, İ. 1997. ***İnci Kefali*** (***Chalcalburnus tarichi, Pallas 1881***) ***Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi*** (Yüksek lisans tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van.

Vaklinova, S.G., Goushtina, L.M., Lazova, G.N., 1982. Carbonic anhydrase activity in chloroplasts an chloroplast fragments. ***Comtes Rendus de I'Acedemic Bulgare des Sciences***, 37 (**5**): 677-680.

Vaklinova, S.G., Goushtina, L.M., Lazova, G.N., 1984. Carbonic anhydrase activity in chloroplasts an chloroplast fragments. ***Comtes Rendus de I'Acedemic Bulgare des Sciences***, 35 (**12**):1721-1724.

Vangoog, H. 1948. Carbonic anhydrase, Its properties. Distribution and significance for carbon dioxide transport***. Enzymologia*** (**13**): p 73-164.

Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T. 1967. Esterase activities ofhuman carbonic anhydrase ***J. Biol. Chem***. (**242**): p 4221.

Whitney, P.L., 1974. Affinity choromatograpy of carbonic anhydrase. ***Anal. Biochem,*** (**57)**: p 467-476.

Wistrand, P.J., Lındahl, S., Wahlstrand, T., 1975. Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties. Eur. J. Biochem, (**57**): p 189.

Wistrand, P.J., 1980. Solubilizayion and preliminary characterization of mebrane-bound carbonic anhydrase. ***Uppsala J. Med. Sci***.(**85**): 75.

Yenson, M., 1982. ***Kanda Hemoglobin ve Eritrositler. Klinik Biyokimya Laboratuar Çalışmaları***. Sanal Matbaacılık, İstanbul. (5. baskı): s 342.

ÖZGEÇMİŞ

Muhammed SÖYLER, 1979 yılında Urfa'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı 1997 yılında Atatürk Üniversitesi Ağrı Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünü kazandı. 2001 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2002 yılında Milli Eğitim Bakanlığı tarafından sınıf öğretmeni olarak atandı ve göreve başladı. 2004 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Öğrenimine başladı.