

Siirt Tiftik Keçisi Böbrek Dokusundan Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Araştırılması

Emrah YERLİKAYA^{1*}, Hasan KARAGEÇİLİ¹, Ramazan DEMİRDAĞ², Mustafa Oğuzhan KAYA³

¹Siirt Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Siirt-Türkiye

²Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Ağrı-Türkiye

³Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Siirt-Türkiye

(Geliş Tarihi/Received: 06.02.2016, Kabul Tarihi/Accepted: 15.04.2016)

ÖZET

Karbonik anhidrazlar (CA) (E.C:4.2.1.1) bakteri gibi en basit organizmalardan bitki ve hayvan gibi en kompleks canlılara kadar yaygın şekilde dağılmış çinko içeren bir grup metaloenzimidir. CA inhibitörleri köpek ve kedilerin glukoma tedavisinde kullanılan başlıca ilaçların birkaçıdır. CA enzimleri daha önceki çalışmalarda afinite kromatografisi yöntemi ile başarılı bir şekilde koyun, tavuk, balık, sığır ve insan gibi pek çok canlıdan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu çalışmada ise CA enzimi, Siirt Tiftik Keçisi böbrek dokusundan Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonu kullanılarak 902,9 EU x mg⁻¹ spesifik aktivite ile % 50,19 verimle 83,54 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığı SDS-PAGE ile doğrulandı. Siirt Tiftik Keçisi böbrek CA enziminin karakterizasyonu yapıldığında; optimum iyonik şiddeti=25 mM, optimum sıcaklığı=45°C, optimum pH'sı=8,5 ve stabil pH'sı=7,0 olarak belirlendi. Saflaştırılan CA enzimi üzerine Al³⁺, Ni²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, B³⁺, Fe³⁺, Se²⁺, Ag⁺ ve Co²⁺ metal iyonlarının inhibitör etkileri incelendi. İnhibisyon gösteren metallerin IC₅₀ değerlerini bulmak amacıyla inhibisyon grafikleri çizildi.

Anahtar kelimeler: Afinite, Metal İyonu, Enzim, İnhibisyon, Böbrek.

Purification and Characterization of Carbonic Anhydrase Enzyme from The Siirt Mohair Goat Kidney Tissue and Investigation of Some Biochemical Properties

ABSTRACT

Carbonic anhydrase (CA) (E.C:4.2.1.1) is a group of metalloenzyme containing zinc widely distributed from the simplest organisms such as bacteria to the most complex organisms such as plants and animals. CA inhibitors are some of the principal drugs used in the management of canine and feline glaucoma. In earlier studies; CA enzymes successfully have been purified and characterized from many living things such as; sheep, chicken, fish, bovine and human. In this study, the CA enzyme has purified from Siirt Mohair Goat kidney tissue with 902.9 EU x mg⁻¹ of specific activity, 50.19% of purification yield and 83.54 of purification folds by using Sepharose-4B-L-tyrosine-sulfonamide affinity column. The purity of the purified enzyme has confirmed by SDS-PAGE. As the characterization of CA enzyme's in Siirt Mohair Goat kidney has been done; the optimum ionic strength=25mM, the optimum pH=8.5, the optimum temperature=45°C and the stable pH=7.0 has been determined. Inhibitory effects of Al³⁺, Ni²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, B³⁺, Fe³⁺, Se²⁺, Ag⁺ and Co²⁺

metal ions have been examined on the purified CA enzyme. Inhibition graphics have been drawn in order to find the IC₅₀ values of metals showing inhibition.

Keywords: Affinity, Metal Ion, Enzyme, Inhibition, Kidney.

1. Giriş

Karbonik anhidraz (CA) enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku/organlar ile akciğer arasındaki CO₂/bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO₂ homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev almaktadır (Chegwidden vd. 2000; Supuran ve Scozzafava 2000). CA enzimi memeli eritrositlerinden izole edildikten sonra insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi yaklaşık 30 kDa olduğu tespit edilmiştir (Iqbal vd. 2014; Demirdağ vd 2012; Demirdağ vd 2013).

Hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde CA inhibitörlerinin önemi, glukoma hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra bu enzimin dokulara dağılımı ve bu

dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış ve bunun sonucunda CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glukoma olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans belirlenmesinde (MRI) diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici ve antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır. Bu sebeple, CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi son zamanlarda çok büyük önem kazanmıştır (Supuran ve Scozzafava 2001).

CA inhibitörleri, göz içi basıncını düşürdüğünden dolayı tüm glukoma hastalığı türlerinin hem akut hem de kronik tedavilerinde kullanılır (Maslanka 2015). Farklı canlılardan izole edilen CA enzimlerinin inhibisyon çalışmalarının incelenmesi, enzimlere spesifik inhibitörlerin bulunmasını kolaylaştıracağı için glukoma hastalığı gibi birçok hastalığın tedavisine yardımcı olacak bilginin üretilmesine katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmada CA enziminin Siirt Tiftik Keçisi böbrek dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı

kimyasalların enzim aktivitesi üzerine aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan Sepharose-4B, p-nitrofenil asetat, standart serum albumin ve L-tirozin Sigma Chemical Company'den; sülfanilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptoetanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, metanol, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, G-250, coomassie brilliant blue R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den sağlanmıştır.

2.2. Homojenat Hazırlanması

Siirt Tiftik Keçisi böbrek dokusu küçük parçalar şeklinde kesilerek sıvı azot ile parçalandı. Tampon çözelti içine alındıktan sonra 13,500xg'de 30 dakika santrifüj edildi ve çökelek uzaklaştırıldı. Süpernatant alınarak katı Tris ile pH 8,7'ye ayarlandı.

2.3. Afinite Kromatografisiyle Enzimin Saflaştırılması

25 mM Tris-HCl / 0,1 M Na₂SO₄, pH=8,7 tamponuyla afinite kolonu dengelendikten sonra pH değeri 8,7'ye ayarlanmış süpernatant alınarak Sepharose-4B-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna tatbik edildi. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄, pH=8,7 tamponuyla kolon yıkandı. Daha sonra 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄, pH=5,6

tamponuyla kolona tutunan enzim elüe edildi ve aktif elüatlar birleştirildi.

2.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü

Laemmli prosedürüne göre %3 ve %8 akrilamid konsantrasyonlarında yığma ve ayırma jelleri hazırlandı. Jel çözeltisine SDS ilave edildi ve yürütme yapıldı. Jel % 0,1 Coomassie Brilliant Blue R-250 + % 50 metanol + % 10 asetik asit çözeltisiyle 2 saat boyandı. Son olarak % 50 metanol + % 10 asetik asit + % 40 saf su ile protein bantları netleşinceye kadar yıkandı.

2.5. Enzim Aktivitesi Ölçümü ve Protein Tayini

Karbonik anhidrazın aktivite ölçümü substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz etmesi esasına dayanan Verpoorte metoduna göre yapıldı (Verpoorte vd. 1967). Saflaştırma basamaklarında protein miktarları Bradford yöntemine göre yapıldı (Bradford 1976). Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{max} = 465$ nm) ve mavi ($\lambda_{max} = 595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar.

2.6. Karakterizasyon, İnhibisyon ve Kinetik Çalışmalar

Siirt Tiftik Keçisi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin K_m ve V_{max}

değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. (Lineweaver ve Burk 1934). Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu yapıldı. Saflaştırılan enzimin optimum iyonik şiddeti, optimum pH'sı, optimum sıcaklığı ve stabil pH'sı bulundu. En uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen Tris-HCl tamponunun optimum pH'da değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Farklı Tris-HCl konsantrasyonlarında esteraz aktivite ölçümleri yapılarak Tris-HCl konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Optimum pH için pH'sı 7,0-9,0 aralığında 25 mM Tris-HCl ve pH'sı 5-7,5 aralığında 25 mM Na_2HPO_4 tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 80°C arasında her 10°C'lik sıcaklık farkı oluşturularak enzimin optimum pH'sında spektrofotometrik olarak esteraz aktivitesi deneyleri gerçekleştirildi. Enzimin stabil

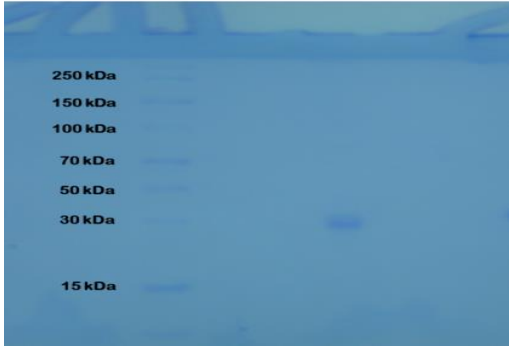
olduğu pH'yı belirlemek için; pH'ları 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 aralığında 25 mM Tris-HCl tampon çözeltileri kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml'si ile 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak 4°C'de muhafaza edildi. 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Al^{3+} , Cd^{2+} ve Zn^{2+} gibi 11 farklı metal iyonunun enzim üzerine etkisi esteraz aktivitesi metodu kullanılarak *in vitro* şartlarda incelendi. IC_{50} değerinin tespit edilmesi için enzim aktiviteleri sabit substrat ve farklı metal konsantrasyonlarında ölçüldü. İnhibitör ihtiva etmeyen tüp kontrol olarak kullanıldı ve aktivitesi %100 olarak kabul edildi. İnhibitörler için %Aktivite-[İnhibitör] grafiği çizildi. Bu grafik vasıtasıyla IC_{50} değerleri hesaplandı.

3. Bulgular

Siirt Tiftik Keçisi böbrek CA enzimi, Sepharose-4B-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak 902,9 EU x mg^{-1} spesifik aktivite ile % 50,19 verimle 83,54 kat saflaştırıldı (Tablo 1). Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu yapıldı (Tablo 2) ve Al^{3+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} gibi metal iyonları için % aktivite-[İnhibitör] ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı (Tablo 3).

Tablo 1. Saflaştırma tablosu.

	Aktivite EU/ml	Protein mg/ml	Toplam Hacim ml	Toplam Aktivite EU	Toplam Protein mg	Spesifik Aktivite EU/mg protein	Saflaştırma Katsayısı	% Verim
Homojenat	226,66	20,97	20	4533,33	419,4	10,81	1	100
CA	284,44	0,315	8	2275,55	2,52	902,99	83,54	50,19



1.Kuyu 2.Kuyu

Şekil 1. SDS-PAGE sonucu. 1.Kuyu: Standart rekombinant proteinler; 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 15 kDa. 2.Kuyu: Afinite kromatografisi sonucu.

Tablo 2. Siirt Tiftik Keçisi böbrek dokusu CA enziminin karakterizasyon değerleri.

Enzimin ;	Değerler
Optimum İyonik Şiddeti:	25 mM
Optimum pH'sı :	8,5
Optimum Sıcaklığı :	45 °C
Stabil pH'sı :	7,0
K_M :	1,18 mM
V_{max} :	3,99 mmol \times min ⁻¹
Molekül Ağırlığı :	28,8 kDa

Tablo 3. Metal iyonlarının, Siirt Tiftik Keçisi böbrek dokusu CA enzimi üzerine inhibisyon değerleri.

İnhibitör	IC ₅₀	İnhibitör	IC ₅₀	İnhibitör	IC ₅₀
Al ³⁺	2,65 mM	Ba ²⁺	2,1 mM	Se ²⁺	2,4 mM
Ni ²⁺	3,99 mM	Zn ²⁺	2,89 mM	Ag ⁺	2,15 mM
Cd ²⁺	3,88 mM	B ³⁺	1,8 mM	Co ²⁺	2,2 mM
Pb ²⁺	1,68 mM	Fe ³⁺	3,7 mM	-	-

4. Sonuçlar ve Tartışma

CA enzimi farklı canlı metabolizmalarında farklı yapılarda ve molekül kütlelerinde fonksiyon gösteren ve canlılarda hayati önemi bulunan bir enzimdir. Dolayısıyla bu enzimin canlı metabolizmasında nerelerde ve hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl bir fonksiyon gösterdiğini belirleyebilmek için pek çok çalışma yapılmış ve enzim birçok canlıdan karakterize edilerek kinetik

özellikleri incelenmiştir. CA enzimini; Demir vd 2004 yılında sığır midesinden saflaştırarak enzimin molekül kütlelerini 30 kDa olarak, Hisar vd 2005 yılında gökkuşuğu alabalığı eritrositlerinden saflaştırarak enzimin molekül kütlelerini 28 kDa olarak, Beydemir vd 2006 yılında gökkuşuğu alabalığının lensinden saflaştırarak enzimin molekül kütlelerini yaklaşık 27 kDa olarak, Söyler 2006 yılında Van kedisinin

eritrositlerinden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini 30 kDa olarak, Söyüt vd 2008 yılında gökkuşuğu alabalığı beyninden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini yaklaşık 29 kDa olarak, Söyüt ve Beydemir yine 2008 yılında gökkuşuğu alabalığının karaciğerinden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini 29,4 kDa olarak, Söyüt ve Beydemir 2011 yılında gökkuşuğu alabalığının böbrek dokusundan saflaştırarak enzimin molekül kütlesini 28,7 kDa olarak, Bursal 2009 yılında kivi meyvesinden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini 66 kDa olarak, Yaylacı 2009 yılında mersin alabalığı eritrositlerinden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini 29 kDa olarak, Demirdağ vd 2011 yılında koyun karaciğer dokusundan saflaştırarak enzimin molekül kütlesini yaklaşık 29 kDa olarak, Kılınç 2011 yılında koyun midyesinden saflaştırarak enzimin molekül kütlesini 26,7 kDa olarak bulmuşlardır (Yerlikaya E, 2012). Bu çalışmada ise CA enzimi Siirt Tiftik Keçisi böbrek dokusundan saflaştırılarak enzimin molekül kütlesi 28,8 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Ayrıca enzimin karakteristik özellikleri incelenmiş ve optimum sıcaklığı : 45°C; optimum pH'sı : 8,5; stabil pH'sı : 7,0; optimum iyonik şiddeti : 25 mM; K_M 'si : 1,18 mM ve V_{max} 'u : 3,99 mmol \times min⁻¹ olarak hesaplanmıştır (Tablo 2).

CA enzimi metabolizmada katılmış olduğu faaliyetlerden dolayı, pek çok doku ve organda oluşan patolojik durumdan etkilenir. Bunun yanında enzimin sentezi ve aktivitesinde meydana gelen bozukluklar da

hastalıkların etiyolojisinde önemli olabilir (Berg vd. 2002). Günümüzde bazı hastalıkların tedavisinde CA inhibitörleri etkili olarak kullanılmaktadır. Glukoma hastalığı tedavisinde CA'nın güçlü inhibitörlerinden olan asetazolamid kullanılmaktadır. Oral yoldan verilen bu ilacın oldukça fazla yan etkileri vardır. Bu yan etkileri azaltmak ve daha etkili bir ilaç molekülü bulmak amacıyla birçok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan hCA II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Supuran ve Scozzafava 2001; Bülbül vd 2002).

Tedavi amacıyla kullanılan bir diğer ilaç Dorzolamiddir. Dorzolamid, İnsan CA enziminin güçlü bir inhibitörüdür. Göz içi sıvısı yapımından sorumlu gözün siliyer nonpigmente epitel hücrelerinden CA enziminin inhibisyonu Na^+ ve sıvı transportunda bir azalma ile sonuçlanarak HCO_3^- iyonu oluşmasını yavaşlatır ve göz içi sıvısı yapımı azalır. Ancak Belirgin korneal hastalığı olan olgular ve göz içi operasyonu geçirmiş olgularda önemli derecede ilacın yan etkileri bulunmaktadır (Doğanay ve Fırat 2007). Görüldüğü gibi bu kimyasallar her ne kadar ilaç olarak kullanılsa da yan etkileri azımsanmayacak kadar fazladır. Bu durumda yan etkileri daha az ve daha etkili olan ilaç moleküllerini sentezlemek çalışma gruplarının amacı haline gelmiştir.

Çankaya ve Kuzucu, 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada koyun karaciğerinden CA enzimini saflaştırarak Klindamisin, Deksketoprofen trometamol, Benzilpenisilin ve Fenoksimetilpenisilin gibi bazı ilaçların

enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Benzer şekilde CA enzimini, Demirdağ vd 2012 yılında aynı kaynaktan saflaştırmış ve enzimin inhibisyon mekanizmasına ışık tutmak amacıyla bazı ağır metallerin inhibisyon etkilerini araştırmışlardır.

Ağır metaller, fonksiyonel gruplara bağlanarak ya da enzimle alakalı metalle yer değiştirerek enzimlerin aktivitesini değiştirebilirler. CA enzim aktivitesini inhibe veya aktive eden pek çok metal iyonu bilim insanları tarafından araştırılmış ve rapor edilmiştir. Örneğin Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının balık CA enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Christensen ve Tucker 1976). Enzim inhibisyonu ile ilgili bir başka çalışmada insan CA enzimi üzerine Co^{2+} ve Hg^{2+} iyonlarının kuvvetli inhibitör etkisi olduğu rapor edilmiştir (Ekinci vd. 2007). Bir diğer çalışmada Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} ve Co^{2+} iyonlarının koyun karaciğeri CA enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Demirdağ vd 2012).

Deniz çipurası solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi aktivitesi üzerine Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Ag^+ iyonlarının inhibitör etkisi incelenmiş ve inhibisyon sırasının $Ag^+ > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$ şeklinde olduğu bildirilmiştir (Kaya vd. 2015). Gökkuşluğu alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi aktivitesi üzerine metallerin inhibitör etkileri araştırıldığında da inhibisyon sırasının $Co^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ag^+$ şeklinde olduğu tespit edilmiştir (Söyüt ve Beydemir 2012).

Bu çalışmada ise Siirt Tiftik Keçisi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine

Al^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , B^{3+} , Fe^{3+} , Se^{2+} , Ag^+ ve Co^{2+} metal iyonlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir. Al^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , B^{3+} , Fe^{3+} , Se^{2+} , Ag^+ ve Co^{2+} için inhibisyon değerleri sırasıyla 2.65, 3.99, 3.88, 1.68, 2.1, 2.89, 1.8, 3.7, 2.4, 2.15 ve 2.2 mM olarak bulunmuştur (Tablo 3). Enzim aktivitesi üzerine en kuvvetli inhibisyon gösteren metal, Pb^{2+} olarak; en zayıf inhibisyon gösteren metal ise Ni^{2+} olarak belirlenmiştir. Metallerin inhibisyon sırası büyükten küçüğe doğru $Pb^{2+} > B^{3+} > Ba^{2+} > Ag^+ > Co^{2+} > Se^{2+} > Al^{3+} > Zn^{2+} > Fe^{3+} > Cd^{2+} > Ni^{2+}$ olacak şekilde belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada CA enzimi, Siirt Tiftik Keçisi böbrek dokusundan ilk defa saflaştırılmıştır. Enzim karakterize edilerek özellikleri literatüre kazandırılmıştır. Bu dokudan ilk defa saflaştırılmış ve karakterize edilmiş olması sebebiyle çalışma önem arz etmektedir. Ayrıca çalışmamızın, CA enzimine ait inhibisyon mekanizmasının daha ayrıntılı olarak aydınlatılmasında ve glukoma gibi hastalıkların tedavisi için daha güçlü, spesifik ve etkili olarak kullanılacak yeni ilaçların dizaynı ve farmakolojik uygulamalarının geliştirilmesinde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (SİÜSYO-2014-02) desteklenmiştir.

5. Kaynaklar

- Berg J, Tymoczko J, Stryer L 2002. Biochemistry, 5th Ed., W.H. Freeman Co.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Bülbül, M., Saraçoğlu, N., Küfrevioğlu, Ö.İ., Çiftçi M. 2002. Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2 sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibition effects. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 2561.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N. 2000. The Carbonic Anhydrases-New Horizons. *Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., 2165–2204, McGraw-Hill, Inc., New York.
- Christensen GM, Tucker JH. 1976. Effects of selected water toxicants on the in vitro activity of fish carbonic anhydrase. *Chem Biol Interact*, 13, 181–192.
- Çankaya, M., Kuzucu, M. 2015. Effect of Some Drugs on Sheep Liver Carbonic Anhydrase I and II. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 8-2, 201-212.
- Demirdağ R., Yerlikaya E., Küfrevioğlu Ö.İ. (2012). Purification of carbonic anhydrase-II from sheep liver and inhibitory effects of some heavy metals on enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27-6, 795-799.
- Demirdağ R., Yerlikaya E., Şentürk M., Küfrevioğlu Ö.İ., Supuran C.T. 2013. Heavy metal ion inhibition studies of human, sheep and fish α -carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28-2, 278-282.
- Doğanay S., Fırat P.G. 2007. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri. *Journal of Glaucoma-Cataract*, 2, 213-218.
- Ekinci D, Beydemir S, Küfrevioğlu OI. In vitro inhibitory effects of some heavy metals on human erythrocyte carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2007, 22, 745–750.
- Iqbal S., Rahman N., Iqbal J. 2014. A capillary electrophoresis-based enzyme assay for kinetics and inhibition studies of carbonic anhydrase. *Anal Biochem*, 444, 16–21.
- Kaya E.D., Söyüt H., Beydemir Ş. 2015. The toxicological impacts of some heavy metals on carbonic anhydrase from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) gills. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 39, 825–832
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.

- Lineweaver, H., and Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 685.
- Maslanka, T. 2015. A review of the pharmacology of carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of glaucoma in dogs and cats. *Veterinary Journal.* 203, 3, 278-284.
- Söyüt H., Beydemir Ş. 2012. The impact of heavy metals on the activity of carbonic anhydrase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kidney. *Toxicology and Industrial Health*, 28, 4, 296-305.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1, 61-97.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. 2000. Carbonic anhydrase inhibitors –Part 94. 1,3,4-Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents? *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35, 9, 867-874.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T. 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221.
- Yerlikaya E. 2012. İnsan Karbonik Anhidraz IX İzoenziminin Klonlanması, Üretilmesi, Antitümör İlaçların ve Bazı Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Erzurum.