

215

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİĞİR KARBONİK ANHİDRAZ II ENZİMİ
AKTİVİTESİ ÜZERİNE SİYANOJEN (C₂N₂)
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Arife Alev KARAGÖZLER

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

MALATYA
1991

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

"Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne"

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan.....

Üye.....

Üye.....

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu
onaylarım.

4.7 / 1991

Prof. Dr. A. Nihat Bozcuk

Enstitü Müdürü



ÖZET

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolaz, EC 4.2.1.1) bir çinko metaloenzimi olup fizyolojik fonksiyonu karbondioksidin geridönüşümlü hidrasyonunu katalizlemektir. Enzim bu fizyolojik fonksiyonu dışında aldehitler, aril karboksilat esterler, alkil aril ve diaril karbonat esterler, 2-hidroksi-5-nitro- α - toluensulfonik asit salton gibi bazı bileşiklerin hidrasyon ve hidrolizini de katalizleyerek büyük bir katalitik çeşitlilik gösterir.

Siyanojen (etandinitril), proteinlerde yüklü grupları birbirine bağlayarak molekülüçi kovalent bağlanmalara neden olur.

Bu çalışmada siyanojenle modifiye edilen sığır karbonik anhidraz II enziminin bazı özellikleri incelenmiştir. Modifikasyon sonucu enzimin hidrasyon aktivitesinin değişmediği, esteraz aktivitesinin ise büyük ölçüde inhibe olduğu saptanmıştır. Esteraz aktivitesindeki inhibisyonun substrata, muamele sırasında kullanılan siyanojen derişimine ve muamele süresine bağlı olarak farklılaşmalar gösterdiği gözlenmiştir. İnaktivasyonun zamana göre değişimi doğrusal olmayıp önce hızlı sonra yavaş olmaktadır. Siyanojenle modifikasyondan sonra gözlenen kinetik parametreler inhibisyonun karışık tip inhibisyon olduğunu göstermiştir.

Sığır karbonik anhidraz II'nin siyanojenle modifikasyonunun yüksek pH ortamında nukleofillere karşı dayanıksız olduğu saptanmıştır. N-metilhidroksilamin ve metilamin gibi nukleofillerin siyanojenle modifiye edilmiş enzime kovalent olarak bağlandıkları önerilmiştir.

p-Anisidin'in siyanojenle modifiye edilmiş enzim için etiket görevi yapabilirliği araştırılmış ve enzimin p-anisidin ile muameleden sonra tripsin ile hidroliz ürünleri HPLC'de kontrol enzime göre farklı bir profil göstermiştir. p-Anisidin'in siyanojen ile muamele edilmiş BCA II enzime spesifik olarak bağlandığı düşünülmektedir.

Aromatik ve heterosiklik primer sulfonamidler karbonik anhidrazı inhibe ederler. BCA II asetazolamid ve salamid varlığında siyanojen ile muamele edilmiş ve asetazolamidin siyanojen modifikasyonuna karşı enzimi korumadığı buna karşılık salamidin koruduğu görülmüştür. Bu korumanın, salamidin His 64 ile ilişkisi sonucu ortaya çıktığı ve His 64'ün enzimin esteraz aktivitesinden sorumlu bölgesinin bir bileşeni olduğu sonucuna varılmıştır.

ABSTRACT

Carbonic Anhydrase (carbonate hydrolase EC 4.2.1.1) is a zinc metalloenzyme that catalyzes the reversible hydration of carbon dioxide. The enzyme also shows a great catalytic versatility and catalyzes the hydration and hydrolysis of a number of compounds such as aldehydes, aryl carboxylate esters, alkyl aryl and diaryl carbonate esters, 2-hydroxy-5-nitro- α -toluenesulfonic acid sulfonate.

Cyanogen (ethane dinitrile) drives intra-molecular conversion of salt bridges to covalent links in proteins.

In this work, some properties of cyanogen modified bovine carbonic anhydrase II were studied. It was observed that cyanogen modification inhibits the esterase activity of the enzyme whereas the hydrolysis activity remains intact. The degree of inhibition of the esterase activity was shown to be dependent on type of substrate, cyanogen concentration, and treatment period. The inactivation observed with respect to time is non-linear, first rapid then slow. Kinetic parameters of the cyanogen modified enzyme imply a mixed-type inhibition.

Cyanogen modification of bovine carbonic anhydrase II was shown to be nucleophile labile at high pH. It is suggested that nucleophiles such as N-methylhydroxylamine and methylamine are bound covalently to cyanogen modified enzyme.

The use of p-anisidine as a label for cyanogen modified enzyme was investigated and the products of trypsin digestion of modified enzyme treated with p-anisidine exhibited a different HPLC profile than the control. Thus, it is considered that p-anisidine shows high specificity towards cyanogen modified BCA II.

Aromatic and heterocyclic primary sulfonamides were shown to be inhibitors of carbonic anhydrase. BCA II was treated with cyanogen in the presence of acetazolamide and salamide, and it was shown that salamide protects the enzyme from cyanogen modification whereas acetazolamide does not. The observed protection was assumed to be the result of interaction of salamide with His 64, and thus it was inferred that His 64, was a component of esteratic site of the enzyme.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen, yoğun yöneticilik programına rağmen bilimsel tartışmalarımıza ayıracak vakti daima bulan danışman hocam Prof.Dr.Engin M.Gözükara'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ko-danışmanlığımı kabul ederek beni Cincinnati Üniversitesindeki grubuna dahil eden ve çalışmanın başından sonuna kadar büyük desteğini gördüğüm Prof.Dr.Richard A.Day'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalar sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Warren Gooden'a teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yapılabilmesi için 2 yıl süre ile A.B.D. Cincinnati Üniversitesi'nde görevlendirilmemi ve maddi desteği sağlayan İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi ve İnönü Üniversitesi Yönetim Kurulları'na teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, doktora öğrenimim boyunca bana sabırla katlanan aileme teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Karbonik Anhidrazın Biyolojik Dağılımı ve Yapısı.....	1
1.2. Karbonik Anhidrazın Fizyolojik Önemi.....	7
1.3. Katalitik Mekanizma.....	10
1.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	14
1.5. Karbonik Anhidrazın Katalitik Çeşitliliği.....	17
1.6. Siyanojen Kimyası.....	20
2. DENEYSEL BÖLÜM.....	24
2.1. Bazı Substratların Sentezi.....	24
2.1.1. Materyal.....	24
2.1.2. Metodlar.....	24
2.1.3. Metil 2-piridil karbonatın (M2PC) sentezi.....	24
2.1.4. Metil 3-piridil karbonatın (M3PC) sentezi.....	27
2.1.5. Metil 4-piridil karbonatın (M4PC) sentezi.....	27
2.1.6. 2-Hidroksi -5- nitro - α - toluensulfonikasit saltonun (HNTSA) sentezi.....	28
2.2. Sığır Karbonik Anhidraz II (BCA II) Enziminin C_2N_2 ile muamelesi.....	29
2.2.1. Materyal.....	29
2.2.2. Metodlar.....	29
2.2.3. Siyanojen stok çözeltisinin hazırlanması ve deriş- minin elektrokimyasal yöntemle tayini.....	29
2.2.4. Enzimin C_2N_2 ile muamelesi.....	32
2.3. p-Nitrofenilasetat (p-NPA) Esterinin C_2N_2 ile Muamele Edilmiş BCA II ile Hidrolizi.....	32
2.3.1. Materyal.....	32
2.3.2. Metod.....	33
2.3.3. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin p-NPA esteraz aktivitesinin incelenmesi.....	33
2.3.4. BCA II ile katalizlenen p-NPA hidroliz reaksi- yonunun asetazolamid ile inhibisyonu.....	34

2.3.5. Farklı substrat derişimleri kullanılarak BCA II'nin C_2N_2 ile inhibisyonunun tayini.....	36
2.3.6. Farklı C_2N_2 derişimlerinin BCA II'nin p-NPA hidroliz aktivitesinin inhibisyonuna etkisi.....	36
2.3.7. BCA II enziminin p-NPA hidroliz aktivitesinin C_2N_2 ile inhibisyonuna muamele süresinin etkisi.....	38
2.3.8. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II ile katalizlenen p-NPA hidroliz reaksiyonunun kinetik parametrelerinin tayini.....	39
2.4. Metil Piridil Karbonatların C_2N_2 ile Muamele Edilmiş BCA II Enzimi ile Hidrolizi.....	39
2.4.1. Materyal.....	39
2.4.2. Metod.....	39
2.4.3. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin metil piridil karbonat hidroliz aktivitesinin incelenmesi.....	42
2.4.4. Farklı C_2N_2 derişimlerinin BCA II enziminin metil piridil karbonat hidroliz aktivitesinin inhibisyonuna etkisi.....	43
2.4.5. BCA II enziminin metil piridil karbonatları hidroliz aktivitesinin C_2N_2 ile inhibisyonuna muamele süresinin etkisi.....	46
2.4.6. C_2N_2 ile kısmen modifiye olmuş BCA II enziminin M3PC hidroliz aktivitesine ait kinetik parametrelerin tayini.....	47
2.4.7. C_2N_2 ile kısmen modifiye olmuş BCA II enziminin M3PC hidroliz aktivitesine ait kinetik parametrelerin tayini.....	48
2.5. Bazı Aldehitlerin C_2N_2 ile Muamele edilmiş BCA II Enzimi ile Hidrasyonu.....	48
2.5.1. Materyal.....	48
2.5.2. Metod.....	52

2.5.3. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin asetaldehit ve piridinkarboksialdehit hidrasyon aktivitesinin incelenmesi.....	53
2.6. 2-Hidroksi -5- Nitro - α - Toluensulfonikasit Salton'un (HNTSA) C_2N_2 ile Muamele Edilmiş BCA II Enzimi ile Hidrolizi.....	55
2.6.1. Materyal.....	55
2.6.2. Metod.....	55
2.6.3. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin HNTSA hidroliz aktivitesinin incelenmesi.....	59
2.6.4. Farklı C_2N_2 derişimlerinin BCA II HNTSA hidroliz aktivitesinin inhibisyonuna etkisi.....	59
2.6.5. BCA II enziminin HNTSA hidroliz aktivitesinin C_2N_2 inhibisyonuna muamele süresinin etkisi.....	61
2.6.6. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II ile katalizlenen HNTSA hidroliz reaksiyonunun kinetik parametre- lerinin tayini.....	62
2.7. BCA II'nin C_2N_2 ile Modifikasyonunun Aydınlatılması.....	62
2.7.1. Materyal.....	62
2.7.2. Metod.....	64
2.7.3. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin bazı özelliklerinin incelenmesi.....	64
2.7.4. C_2N_2 modifikasyonunun nükleofillere karşı dayanıksızlığı.....	68
2.7.5. C_2N_2 ile modiyife edilmiş BCA II enziminin p-anisidin ile muamelesi.....	73
2.7.6. BCA II enziminin C_2N_2 ile modifikasyonuna inhibitörlerin etkisi.....	79
3. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	85
EK-1.....	99
KAYNAKLAR.....	100

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Karbonik anhidrazın sekonder yapısı.....	6
Şekil 1.2 HCA II enziminin aktif merkezindeki hidrojen bağları.....	8
Şekil 1.3. CO ₂ 'in geridönüşümlü hidrasyonu için önerilen mekanizma.....	12
Şekil 1.4. Karbonik andihrazın aktif merkezindeki proton transferi.....	13
Şekil 1.5. Siyanojenin aminoasit yan zincirleri ile öngörülen reaksiyonları.....	22
Şekil 2.1. Metil piridil karbonatların sentezi.....	25
Şekil 2.2. HNTSA'nın sentezi.....	26
Şekil 2.3. C ₂ N ₂ derişimi tayini için standart kalibrasyon grafiği.....	31
Şekil 2.4. BCA II, CBCA II ve HEPES'in p-NPA hidroliz aktivitesi.....	35
Şekil 2.5. BCA II'nin asetazolamid ile inhibisyonu.....	37
Şekil 2.6. BCA II'nin p-NPA hidroliz aktivitesine ait Lineweaver-Burk grafiği.....	40
Şekil 2.7. CBCA II'nin p-NPA hidroliz aktivitesine ait Lineweaver-Burk grafiği.....	41
Şekil 2.8. BCA II ve CBCA II'nin M2PC hidroliz aktivitesi.....	44
Şekil 2.9. BCA II ve CBCA II'nin M3PC hidroliz aktivitesi.....	45
Şekil 2.10. BCA II ve CBCA II'nin M2PC hidroliz aktivitesine ait Lineweaver-Burk grafiği.....	49
Şekil 2.11. BCA II ve CBCA II'nin M3PC hidroliz aktivitesine ait Lineweaver-Burk grafiği.....	50
Şekil 2.12. Kısmen modifiye olmuş BCA II'nin Lineweaver-Burk grafiği.....	51
Şekil 2.13. BCA II ve CBCA II'nin CH ₃ CHO hidrasyon aktivitesi....	54

Şekil 2.14. BCA II ve CBCA II'nin 2-PA hidrasyon aktivitesi.....	56
Şekil 2.15. BCA II ve CBCA II'nin 3-PA hidrasyon aktivitesi.....	57
Şekil 2.16. BCA II ve CBCA II'nin 4-PA hidrasyon aktivitesi.....	58
Şekil 2.17. BCA II ve CBCA II'nin HNTSA hidroliz aktivitesi.....	60
Şekil 2.18. BCA II ve CBCA II'nin HNTSA hidroliz aktivitesine ait Lineweaver-Burk grafiği.....	63
Şekil 2.19. BCA II ve CBCA II'nin UV-VIS absorbands spektrumları.....	65
Şekil 2.20. BCA II ve CBCA II'nin HPLC kromatogramları.....	67
Şekil 2.21. BCA II ve CBCA II'nin tripsin hidrolizinden sonraki HPLC kromatogramları.....	69
Şekil 2.22. BCA II ve CBCA II'nin V8 proteaz ile pH 4'de amonyum asetat tamponunda hidrolizinden sonraki HPLC kromatogramları.....	70
Şekil 2.23. BCA II ve CBCA II'nin V8 proteaz ile pH 7,8'de sodyum fosfat tamponunda hidrolizinden sonraki HPLC kromatogramları.....	71
Şekil 2.24. BCA II ve CBCA II'nin CH_3NH_2 ile muameleden sonra pNPA aktivitesi.....	74
Şekil 2.25. BCA II ve CBCA II'nin CH_3NH_2 ile muameleden sonra HNTSA aktivitesi.....	75
Şekil 2.26. BCA II ve CBCA II'nin CH_2Cl_2 ile muameleden sonra pNPA ve HNTSA aktivitesi.....	76
Şekil 2.27. BCA II ve CBCA II'nin p-anisidin ile muameleden sonra UV absorbisyon.....	78
Şekil 2.28. BCA II ve CBCA II'nin p-anisidin ile muameleden sonra tripsin ile hidrolizleri sonucu gösterdikleri HPLC kromatogramları	80
Şekil 2.29. Asetazolamid varlığında C_2N_2 ile muamele edilen BCA II'nin p-NPA ve HNTSA aktivitesi.....	82
Şekil 2.30. Salamid varlığında C_2N_2 ile muamele edilen BCA II'nin p-NPA ve HNTSA aktivitesi.....	83

Şekil 3.1 BCA II'nin C_2N_2 ile inhibisyonunun zamana bağımlılığı.....	89
Şekil 3.2. p-Anisidin'in CBCA II'ye öngörülen bağlanma modeli.....	96

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. İnsan ve sığır karbonik anhidraz izoenzimlerinin isimlendirilmesi.....	1
Çizelge 1.2. BCA II ve HCA II'nin aktif merkez yapıları.....	3
Çizelge 1.3. BCA II ve HCA II'nin primer yapısı.....	5
Çizelge 1.4. Karbonik anhidrazı inhibe eden anyonlar ve p-NPA hidroliz reaksiyonu için ölçülen inhibitör sabitleri.....	15
Çizelge 1.5. Karbonik anhidrazın katalizlediği reaksiyonlar.....	18
Çizelge 2.1. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin aktivitesinde farklı p-NPA derişimleri ile gözlenen inhibisyon değerleri.....	36
Çizelge 2.2. Farklı C_2N_2 derişimleri ile muamele edilen BCA II enziminin p-NPA hidroliz aktivitesinde gözlenen inhibisyon değerleri.....	38
Çizelge 2.3. C_2N_2 ile muamele süresine bağlı olarak BCA II enziminin p-NPA hidroliz aktivitesinde gözlenen inhibisyon.....	38
Çizelge 2.4. Farklı C_2N_2 derişimleri ile muamele edilen BCA II enziminin metil pridil karbonatları hidroliz aktivitesinin inhibisyonu.....	46
Çizelge 2.5. C_2N_2 ile muamele süresine bağlı olarak BCA II enziminin metil piriidil karbonatları hidroliz aktivitesinde gözlenen inhibisyon.....	47
Çizelge 2.6. Farklı C_2N_2 derişimleri ile muamele edilen BCA II enziminin HNTSA hidroliz aktivitesinin inhibisyonu.....	61
Çizelge 2.7. C_2N_2 ile muamele süresine bağlı olarak BCA II enziminin HNTSA hidroliz aktivitesinde gözlenen inhibisyon.....	62
Çizelge 3.1. CBCA II'nin incelenen substratlara ait gözlenen inhibisyon değerleri.....	90
Çizelge 3.2. BCA II ve CBCA II'nin hidrasyon ve hidroliz reaksiyonlarına ait K_m ve V_{max} değerleri.....	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

BCA II.....	Sığır Karbonik Anhidraz II.
CBCA II.....	Siyanojenle muamele edilmiş Sığır Karbonik Anhidraz II.
ORD.....	Optical Rotatory Dispersion.
HCA II.....	İnsan Karbonik Anhidraz II.
C ₂ N ₂	Siyanojen (etandinitril).
HPLC.....	Yüksek basınç sıvı kromatografisi.
M2PC.....	Metil 2-piridil karbonat.
M3PC.....	Metil 3-piridil karbonat.
M4PC.....	Metil 4-piridil karbonat.
2-PA.....	2-piridinkarboksialdehit.
3-PA.....	3-piridinkarboksialdehit.
4-PA.....	4-piridinkarboksialdehit.
HNTSA.....	2-Hidroksi-5 nitro- α -toluensulfonik asit salton.
HEPES.....	4-(2-Hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit.
p-NPA.....	p-nitrofenilasetat
GEE.....	Glisin etil ester

1. GİRİŞ

1.1 Karbonik Anhidrazın Biyolojik Dağılımı ve Yapısı

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolaz, EC 4.2.1.1.) ilk kez 1932 yılında F.J.W. Rougton (1) tarafından kırmızı kan hücrelerinde bulunmuştur. Enzim karbondioksidin geridönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen bir enzim olup keşfedilen ilk çinko metaloenzimidir. Keilin ve Mann (2) saflaştırılmış enzimin aktivitesinin içerdiği çinko ile orantılı olduğunu belirterek çinkonun biyokimya-daki özgün rolünü ilk defa göstermişlerdir.

Protein izolasyonu ve saflaştırma teknikleri geliştikçe insan eritrosit karbonik anhidrazın (HCA) farklı aktivite gösteren iki izoenzimden oluştuğu gösterilmiştir (3,4). Bunlar düşük aktivite gösteren izoenzim I veya B ve yüksek aktivite gösteren izoenzim II veya C olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra çizgili iskelet kasında bulunan düşük aktiviteli izoenzim III veya A olarak isimlendirilmiştir (5).

Önceleri elektroforetik fraksiyonlarına göre A, B ve C olarak isimlendirilen izoenzimler daha sonra karbondioksiti hidratasyon aktivitelere göre düşük aktiviteli I, yüksek aktiviteli II olmak üzere isimlendirilmiştir. İnsan ve sığır eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin eski ve yeni isimlendirilmeleri Çizelge 1.1. de görülmektedir.

Çizelge 1.1. İnsan ve Sığır Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin İsimlendirilmesi

Kaynak	Aktivite	% Bolluk	Standart İsimlendirme	Form
İnsan	Düşük	5	A	III
	Düşük	83	B	I
	Yüksek	12	C	II
Sığır	Yüksek	20	A	II
	Yüksek	80	B	II

Bu izoenzimler tek bir polipeptid zincirinde 259-260 aminoasitten oluşup molekül başına bir çinko atomu içerirler ve yaklaşık 30 000 dalton molekül ağırlığına sahiptirler. İnsan karbonik anhidraz II enzimi karbondioksit hidrasyon aktivitesi bakımından en yüksek turnover sayısına sahiptir (6).

Sitoplazmik izoenzimler (I,II,III) oldukça fazla çalışılmıştır. Zamanla karbonik anhidrazın daha az bilinen formları keşfedilmiştir. İlk kez insan böbreğinden izole edilen intrinsik membrana bağlı karbonik anhidraz IV (7) daha sonra diferansiyel santrifüj ve afinite kromatografisi (8) ile saflaştırılmıştır. Bu enzim 68 000 dalton molekül ağırlığında olup aminoasit kapsamı stoplazmik izoenzimlerden oldukça farklıdır.

Karbonik anhidraz ilk kez eritrositlerden saflaştırılmasına rağmen daha sonra hemen hemen bütün dokularda varlığı saptanmıştır. Omurgalılar, omurgasızlar, bitkiler ve bakterilerden izolasyonu yapılmıştır (9). Bitki karbonik anhidrazlarının 180 000 dalton molekül ağırlığında oligomerler olduğu bulunmuştur. Buna rağmen bitki ve hayvan karbonik anhidrazlarının subuniteler bakımından aynı çinko içeriğine, benzer aminoasit kapsamına ve subunite büyüklüğüne sahip oldukları saptanmıştır. Genellikle bitki ve hayvan karbonik anhidrazlarının benzer aktif merkez yapısına sahip olduklarına inanılmaktadır (10).

Birçok çalışma sonucu karbonik anhidrazların büyük oranda sekans homoloji gösterdiği bilinmekte ve bunların bir ilk (primordial) genin evrimsel gelişimiyle ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (11). Bu homoloji enzimlerin aktif merkezinde çok daha belirgindir. Örneğin, bu çalışmanın konusu olan sığır karbonik anhidraz II (BCA II), insan karbonik anhidraz II (HCA II) enzimine benzer şekilde karbondioksit hidrasyonu için maksimum turnover sayısı göstermektedir (6,12). BCA II nin aktif merkezi ile HCA II nin aktif merkezi arasında tam bir homoloji vardır (13). Bu homoloji çizelge 1.2 de görülmektedir. Aşında BCA II enzimi ile HCA II arasındaki homoloji HCA I ile HCA II arasındakinden daha fazladır (14). İnsan karbonik anhidraz I ve II enzimlerinin aminoasit dizilimleri belirlenmiş olup oldukça benzerlik göstermektedir (15, 16, 17, 18).

Çizelge 1.2. BCA II ve HCA II'nin aktif merkez yapıları.

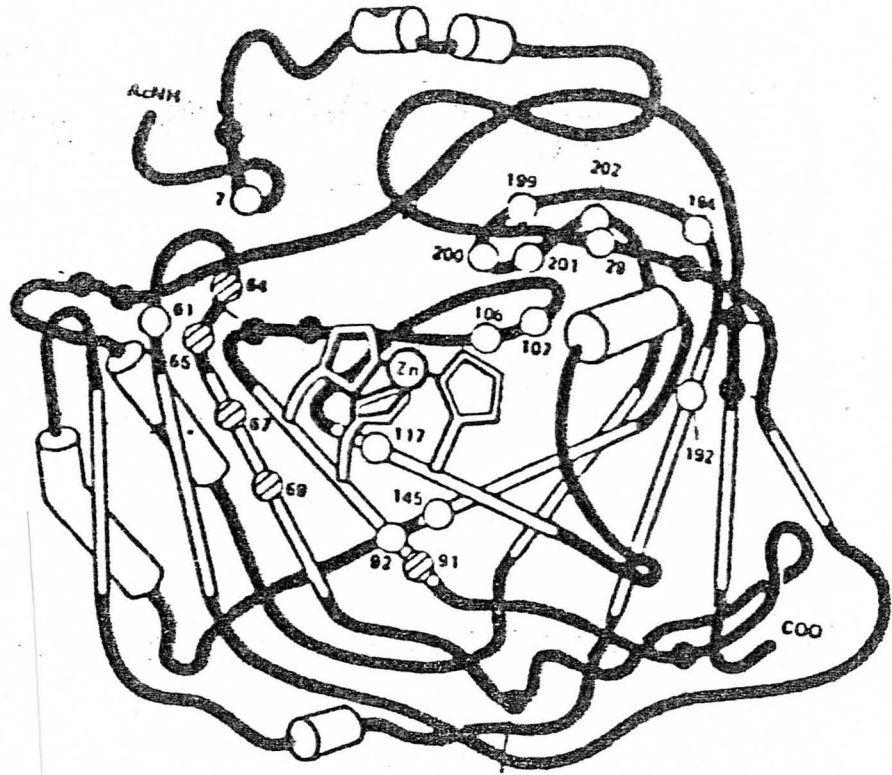
Aminoasit Numarası

Izoenzim	7	29	61	64	65	67	69	91	92	94
HCA II	Tyr	Ser	Asn	His	Ala	Asn	Glu	Ile	Gln	His
BCA II	Tyr	Ser	Asn	His	Ser	Asn	Glu	Val	Gln	His
Izoenzim	96	106	107	117	119	121	131	141	143	145
HCA II	His	Glu	His	Glu	His	Val	Phe	Leu	Val	Gly
BCA II	His	Glu	His	Glu	His	Val	Phe	Leu	Val	Gly
Izoenzim	192	194	199	200	201	202	204	206	207	211
HCA II	Trp	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Leu	Cys	Val	Val
BCA II	Trp	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Leu	Ser	Val	Val

Bu çalışmada kullanılan enzim sığır karbonik anhidraz II olmakla beraber bazı araştırma alanlarında, örneğin X-ışını ve ORD çalışmalarında, şimdiye kadar hep insan karbonik anhidraz enzimi kullanılmıştır. Bu araştırmalardan burada bahsedilecektir. Çünkü insan karbonik anhidrazı ile yapılan bu çalışmalar sığır karbonik anhidraz enziminin özelliklerinin anlaşılması bakımından da önemlidir ve daha önce de bahsedildiği gibi insan ve sığır karbonik anhidraz enzimleri aminoasit kapsamı, dizilimi ve aktivite açısından büyük benzerlik göstermektedirler (19). Çizelge 1.3. de insan ve sığır karbonik anhidraz enzimlerinin aminoasit dizilimleri görülmektedir.

İnsan karbonik anhidraz I ve II nin kristal yapısı 2.2 \AA ve 2.0 \AA rezolüsyona kadar tanımlanmıştır (21-23).

İnsan karbonik anhidraz II enzimi $40 \times 42 \times 55 \text{ \AA}$ boyutlarında yelkenli (sailboat) görünümünde bir yapıya sahiptir. Bu yapının bir gösterimi Şekil 1.1. de verilmiştir. Molekülün esas yapısını, yelkenlinin gövdesini oluşturan ve 259 aminoasidin % 20 sini içeren 10 adet beta-plakalı tabakalı yapı oluşturmaktadır. Protein moleküllerindeki genel yapının aksine beta- yapısındaki zincirler molekülün iç kısmındaki hidrofobik birimlerle ilişkide olmayıp plakalı tabakalı parçalar çözüne açık durumdadır. Bu 10 zincirden 4 tanesi paralel olup diğerleri birbirine antiparalel yapıdadır. Çinko atomu beta yapının ortasında 4 ve 5 inci zincirler arasında ve 16 \AA derinliğindeki konik bir boşluğun dibinde bulunmaktadır. Bu oyukun girişi hemen hemen dairesel olup 15 \AA çapındadır. Molekülün N terminalinde 25 aminoasit ise yelkeni oluşturacak şekilde aktif merkezin girişine yerleşmiştir. Molekülde 7 helikal parça vardır. Bunlar sağ el yapısındadırlar. Bütün heliksler yüzeye yerleşmiş olup üçü beta-plakalı tabakalı yapıların altında dördü üstündedir. Molekülün alt yarısında hidrofobik yan zincir içeren aminoasitlerden oluşan bir çekirdek vardır. İnsan karbonik anhidraz molekülündeki tek sistein aminoasidi gömülmüş olup sulfhidril grubun C_{α} - C_{β} etrafındaki dönüşü sterik olarak engellenmediğinden SH fonksiyonu sözgene açıktır. İnsan karbonik anhidraz II nin yan zincirleri genel düzene uygunluk göstererek hidrofobik gruplar içeri hidrofilik gruplar dışarı dönük durumdadır.

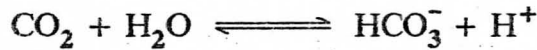


Şekil 1.1 Karbonik anhidrazın sekonder yapısı. Beta- yapısındaki kısımlar içi boş çubuklar ile, helikal yapılar ise silindirle gösterilmiştir. Ortadaki Zn atomu üç histidin molekülüne koordine olmuştur ["Biology and Chemistry of the Carbonic Anhydrases" dan alınmıştır.(Eds.) Tashian, D.E., Hewett-Emmett, D., Annals of the New York Academy of Sciences, V 429 (1984)]

Aktif merkez boşluğunun girişi histidin 64, prolin 201, fenilalanın 131 ve üçüncü beta-plakalı tabakalı yapı ile çevrelenmiştir. Çinko atomu dördüncü zincirdeki 94 ve 96 nolu histidin aminoasidin N- π atomlarına ve beşinci zincirdeki 119 nolu histidin aminoasidin N- π atomuna ligand halindedir. Histidin 94 ün imidazol halkası çinko atomuna diğer iki histidinin olduğundan daha uzakta olup çinko iyonu ile aynı düzlemde değildir. Metal iyonunun dördüncü koordinatının bir su molekülü veya bir hidroksit iyonu ile doldurulduğu sanılmaktadır. Bu yapı metal iyonu etrafında biraz çarpılmış bir tetrahedral konfigürasyon yaratır. Metal iyonuna bağlı su molekülü treonin 199 ile hidrojen bağı oluşturur. Bu treonin 199 ise glutamik asid 106 ya hidrojen bağı yapmış durumdadır. Aktif merkezde hidrofobik ve hidrofilik birimler yaklaşık eşit dağılmışlardır. Metal iyonuna direkt bağlı olan histidin 119 histidin 107 ye ve N-107 amide hidrojen bağı olan glutamik 117 ye hidrojen bağlıdır. Histidin 107 tirozin 194'e hidrojen bağlıdır. Tirozin 194 serin 29 a, serin 29 ise triptofan 209 a hidrojen bağı ile bağlıdır. HCA II enziminin aktif merkezindeki hidrojen bağları şekil 1.2. de verilmiştir.

1.2. Karbonik Anhidrazın Fizyolojik Önemi

Karbonik Anhidraz,



reaksiyonunu katalizler. İzoenzim I,II ve III ün katalitik etkinlikleri oldukça farklıdır. Yüksek aktivite gösteren izoenzim II nin pH 9 da ve 25 °C de CO₂ hidrasyonuna ait turnover sayısı 10⁶ sn⁻¹ dir (6,23). Karbondioksitin kendiliğinden hidrasyonu çok hızlı gerçekleşir. Fakat reaksiyon pulmonar kapiler geçiş sırasındaki zamana (yaklaşık 1 saniye) oranla çok yavaştır (24). Kinetik veriler karbondioksitin katalizörsüz hidrasyonunun insandaki normal karbondioksit yıkımının ancak % 17 sini oluşturabileceğini göstermektedir (1,24). Bu yüzden bir katalizatöre ihtiyaç vardır. İnsan eritrositi karbonik anhidraz enzimi reaksiyon hızında 7500 katlık bir artışa neden olarak bu işi mükemmel yapar (25) ve bu enzimin katalizlediği karbondioksitin hidrasyonu reaksiyonu bilinen en hızlı enzim reaksiyonudur (26).

Karbonik anhidrazın normal aktivitesine ihtiyaç duyan pekçok fizyolojik olay vardır. Burada kısaca birkaç örnek verilerek enzimin önemi vurgulanmaya çalışılacaktır.

Cayman (*Cayman crocodilus crocodilus*) ve kertenkeleye (*Anolis Carolinensis*) piruvat enjeksiyonu karaciğerin serbest alanin, glutamin, glutamat, aspartat ve serin miktarında artışa sebep olur (27-30). Piruvatın karboksilasyonu reaksiyonunda bikarbonat gereklidir (31). Karbonik anhidraz inhibisyonu bu *in vivo* reaksiyonu muhtemel bikarbonat kaynağını azaltarak inhibe eder. Bikarbonat azalması sadece glutamin ve glutamat sentezini değil laktattan glukoneogenesis gibi hayati işlemleri de bloke eder (32). Asetazolamid veya diklorfenamid gibi karbonik anhidraz inhibitörleri karaciğerde piruvattan alaninin sentezini etkilemezken aspartat, serin, glutamin ve glutamat sentezlerini bloke eder. Ayrıca karbonik anhidraz inhibisyonu laktatın glukozaya geri çevrilmesini de engeller (32). Bu çalışmalar alanin sentezinin etkilenmediğini yani transaminasyonun genel olarak inhibe edilmediğini göstermektedir. Yukarıda bahsedilen metabolik yolun piruvatın karboksilasyonu basamağında bloke olduğu sanılmaktadır (32).

Başka bir çalışmada, timsahlarda karbonik anhidrazın normal fonksiyonunun çok önemli olduğu vurgulanmaktadır. Karbonik anhidraz inhibitörleri kullanıldığında amonyak atılımının engellenmediği buna karşılık bikarbonatın büyük oranda azaldığı ve genelde eser olarak bulunan klorürün büyük miktarlara yükseldiği görülmüştür. İnhibitör, sürüngenin amonyum karbonat yerine amonyum klorür atmasına ve idrarın daha asidik plazmanın ise daha bazik olmasına neden olmaktadır (33).

Karbonik anhidrazın lipid sentesindeki önemi etiketleme çalışmaları ile gösterilmiştir. Diklorfenamid, asetazolamid veya etoksiazolamid gibi karbonik anhidraz inhibitörleri enjekte edilmiş kertenkeleye karbon-14 le etiketli asetat verildiğinde lipidlere asetat inkorporasyonunun önemli ölçüde azaldığı ve karboksilasyon reaksiyonlarına gerekli bikarbonatın sağlanması için karbonik anhidrazın elzem olduğu sonucuna varılmıştır (34). Karbonik anhidraz renal

dokularda bol miktarda bulunur ve karbondioksidin hidrasyon-dehidrasyon reaksiyonlarını katalizler (35).

Solunum olayında karbonik anhidrazın muhtemel rolleri kapiler geçiş sırasında plazma pH dengesini hızlandırmak (36-39), alveoler-kapiler membran boyunca karbondioksit değişimini yükseltmek (40-42) ve fetal akciğerde sıvı salgılanmasını yükseltmektir (43).

Karbonik anhidrazın kuvvetli bir inhibitörü olan asetazolamid (ticari adı ile Diamoks) gastrik ve duodenal ülseri olan kişilerin tedavisinde başarı ile kullanılır (44). Bu ilacın tedavi gücü asit salgılanmasını inhibe etmesine ve gastrik mikrosirkülasyonu artırmasına bağlanmaktadır (45).

Karbonik anhidraz inhibitörleri insanlarda glaukoma tedavisinde kullanılır (46). Sıvı akışının azalması sonucu göz tansiyonunun düştüğü ve karbonik anhidraz inhibitörlerinin aqueous humore sodyum ve bikarbonat giriş hızını yavaşlattıkları da gözlenmiştir (47).

1.3. Katalitik Mekanizma

Karbonik anhidraz aktivitesi enzim içinde pK_a sı 7 olan bir gruba bağlı olup enzimin bazik formu karbondioksit hidrasyonu, asidik formu ise bikarbonat iyonunun dehidrasyonu için gereklidir (12, 26, 48, 49).

Karbonik anhidraz hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonları Michaelis - Menten kinetiğine uyar. Karbondioksidin hidrosyonunun katalizinde K_m pH'dan bağımsız k_{cat} ise pH'a sigmoidal olarak bağlı olup bazik pH'da maksimum'a ulaşır (50). Aksine olarak, bikarbonat iyonunun dehidrasyonunun katalizinde ise K_m pH ile değişir, k_{cat} ise değişmez (51).

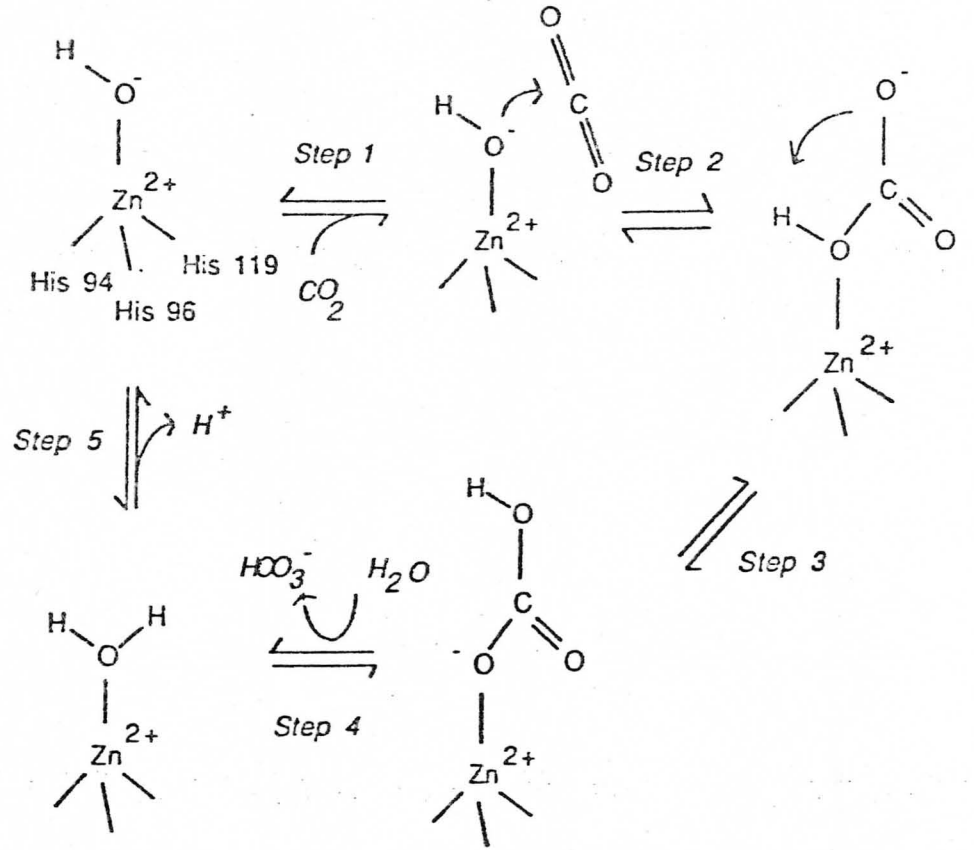
Yedi civarında pK_a ya sahip iyonlaştıracı gurubun bazik formunun çinko atomuna koordine olmuş bir hidroksit iyonu veya çinko atomuna doğrudan veya dolaylı bağlanmış imidazol gibi bir bazik aminoasit yan zinciri olduğu tahmin edilmektedir (26,52,53).

İnsan karbonik anhidraz II enzimi ile karbondioksidin hidrasyonu için maksimum turnover sayısı nötral pH'da 10^6 sn^{-1} olarak tesbit edilmiştir (6).

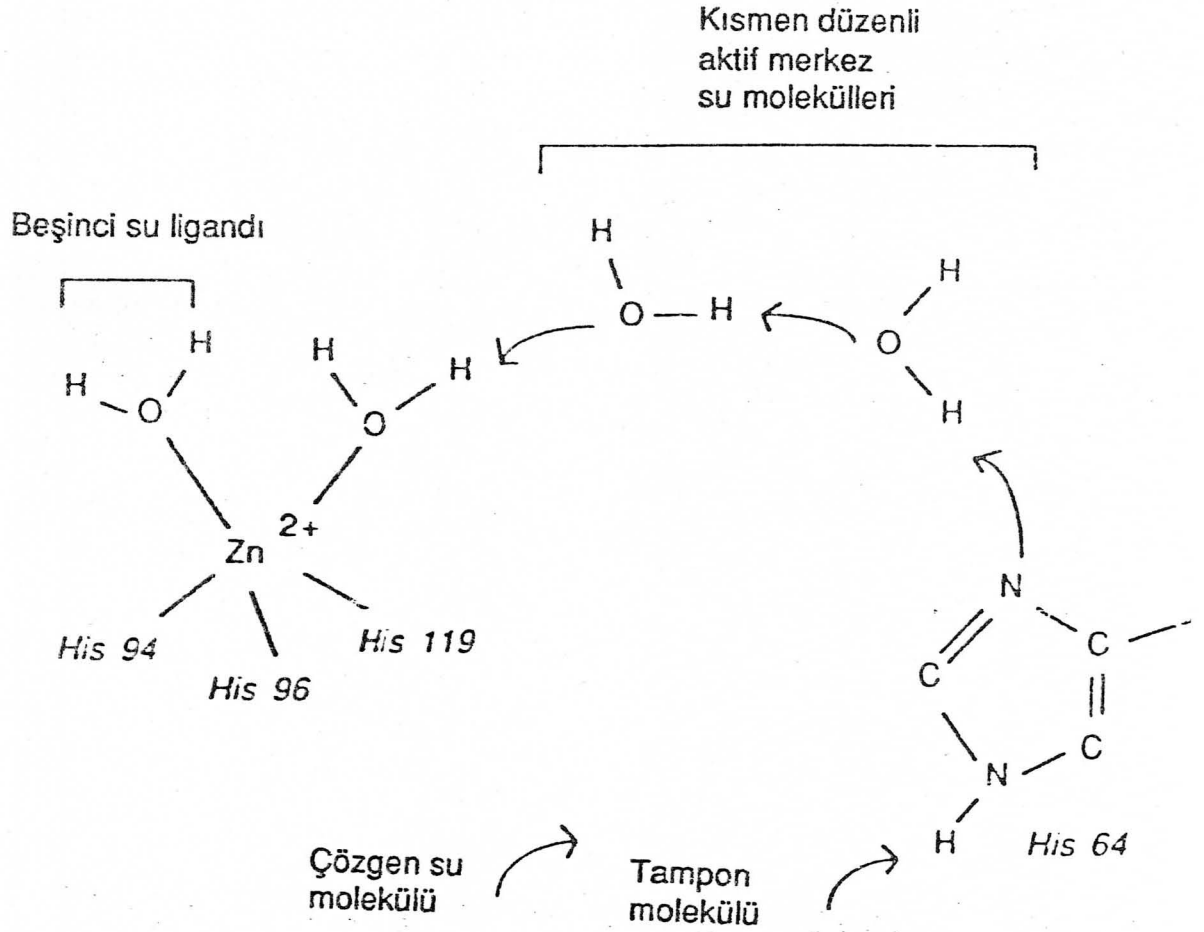
Buna karşılık hesaplamalar hidrasyon sırasında su molekülü veya hidroksit iyonunun proton alıcısı olarak davranması veya dehidrasyon sırasında su molekülü veya H_3O^+ iyonunun proton vericisi olarak davranmasıyla enzim ve çözügen arasındaki proton transferine ait pseudo first-order hız sabitinin nötral pH'da $10^3 - 10^4 \text{ sn}^{-1}$ olması gerektiğini göstermektedir (6,26,54). Bu yüzden sudan daha iyi bir alıcı- verici sistemin varlığının gerektiği düşünülmektedir.

Proton transferi için alternatif bir yol olarak tampon çözeltinin sudan daha iyi bir proton alıcısı ve fizyolojik pH da hidroksit iyonundan daha yüksek konsantrasyonda bulunması nedeniyle katalizde rol alabileceği düşünülmüştür (54, 55). Karbonik anhidrazla katalizde tampon çözelti etkileri araştırılmıştır (56, 57, 58). Tampon konsantrasyonu azaltıldıkça karbondioksitin hidrasyonu reaksiyonunun ilk hızında azalma (59) ve karbondioksit ve su arasındaki ^{18}O değişiminde yine bir azalma (60) tesbit edilmiştir. Karbondioksit ve tampon ayrı ayrı substrat olarak kullanıldığında birbirine benzer pin-pon mekanizması gösterdikleri açıklanmıştır. Bu sonuç moleküller arası proton transferinin karbondioksit ve bikarbonat iyonunun birbirine dönüşümünden bağımsız olarak gerçekleştiği izlemine vermektedir (59-61).

Karbondioksitin geri dönüşümlü hidrasyonu için Şekil 1.3 de gösterilen şu mekanizma önerilmiştir (62-64). Önce CO_2 , Zn^{2+} yakınına bağlanır. Sonra Zn^{2+} -bağlı OH^- 'in CO_2 'in karbonuna nukleofilik atağı sonucu CO_2 HCO_3^- 'a dönüşür. Daha sonra Zn^{2+} -bağlı HCO_3^- 'in kendi içinde proton transferi oluşur. Daha sonra bir molekül H_2O Zn^{2+} 'na bağlanır ve bu Zn^{2+} -bağlı H_2O iyonlaşarak HCO_3^- 'in serbest kalmasını sağlar. Son olarak da Zn^{2+} -bağlı H_2O H^+ iyonu bir proton transfer grubuna (HCA II için His 64) oradan tampona oradanda çözügene transferi gerçekleşir. Son zamanlarda bu son basamaktaki proton transferinin aktif merkezdeki düzenli iki su molekülü sayesinde gerçekleştiği X-ışını çalışmaları ile gösterilmiştir (64). Bununla ilgili önerilen şema Şekil 1.4 de görülmektedir. Bu önemli sonuçlara varılmasına yardımcı olan daha önceki bulgular HCA II (23), BCA II (65), ^{13}C -NMR (66) ve katalizin bilgisayar simülasyonu (67,68) çalışmaları sonucu ele geçmiştir.



Şekil 1.3. CO_2 'in geridönüşümlü hidrasyonu için önerilen mekanizma. (Referans 64'ten).



Şekil 1.4. Karbonik anhidrazın aktif merkezindeki proton transferi (Referans 64'ten).

X-ışını çalışmaları sonucu (69) izoenzim II'nin kataliz mekanizmasında bahsedilen proton dolanımı için His 64'ün iyi bir aday olduğu önerilmektedir. NMR çalışmaları bu histidinin pK_a 'sının 7,1 olduğunu göstermektedir (70). Hidrojen iyonunun His 64'ten çözgen ortamına transferinin bir dizi su köprüsü aracılığı ile gerçekleştiği ve reaksiyonun hızını belirleyen basamağın suyun protolizi basamağı olduğu sanılmaktadır (71). Karbonik anhidraz II enziminin kristal yapısının aydınlatılması çalışmaları sırasında, enzimin aktif merkezindeki çinko ve His 64 arasındaki düzenli bir su molekülü zincirinin varlığının saptanması bu tahmini geçerli kılmaktadır (72).

Bakır (II) ve cıva (II) nin His 64'e bağlanması sonucu enzimin karbondioksidi hidrasyon aktivitesinin inhibe olması nedeniyle His 64'ün aktivitedeki rolü ağırlık kazanmıştır (73).

Bu önerilen mekanizma site-directed mutogenesis ile test edilmiştir (74). His 64'ün lizin, alanin, glutamik asit ve glutamin ile yer değiştirmesi sonunda enzimin CO_2 hidrasyon aktivitesinde pek az bir azalma görülmüştür. Bu sonuç His 64'ün hidrasyon aktivitesi için esas olmadığı izlenimini vermektedir. Buna karşılık aktif merkez bileşenleri içinde çinko koordineli-su veya hidroksit iyonu karbonik anhidraz II'nin katalizlediği bütün reaksiyonlar için çok önemlidir.

1.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Bir değerlikli anyonların hemen hemen hepsi karbonik anhidrazı inhibe ederler. Bu inhibisyon Meldrum ve Roughton (75) tarafından fark edilmiş ve Roughton ve Booth (76) tarafından sistematik olarak incelenmiştir. Bu inhibisyonun anyonların enzime Zn^{2+} üzerinden spesifik olarak bağlanması sonucu ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır. İnhibitör etkisi CN^- iyonu ile çok fazla iken F^- iyonu ile hemen hemen yok gibidir. Bu anyonların bir listesi ve p-NPA hidroliz reaksiyonlarına ait inhibitör sabiti değerleri çizelge 1.4 de verilmiştir (77).

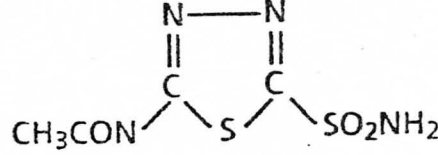
Bazı aromatik sulfonamidler hayvan ve bakteriyel karbonik anhidrazları özgün ve etkin olarak inhibe ederler. İnhibisyon etkisi için substitue olmamış

Çizelge 1.4. Karbonik anhidrazı inhibe eden anyonlar ve p-NPA hidroliz reaksiyonu için ölçülen inhibitör sabitleri. [pH 7,55; 25°C; Referans(77)]

<u>İnhibitör</u>	<u>K_i (M)</u>
CN ⁻	2,6x10 ⁻⁶
SH ⁻	1,1x10 ⁻⁵
CNO ⁻	1,1x10 ⁻⁴
SCN ⁻	5,9x10 ⁻⁴
N ₃ ⁻	5,9x10 ⁻⁴
I ⁻	8,7x10 ⁻³
ClO ₄ ⁻	1,6x10 ⁻²
HCO ₃ ⁻	2,6x10 ⁻²
HSO ₃ ⁻	3,0x10 ⁻²
NO ₃ ⁻	4,8x10 ⁻²
Br ⁻	6,6x10 ⁻²
OAc ⁻	8,5x10 ⁻²
Cl ⁻	1,9x10 ⁻¹
F ⁻	1,2

$-SO_2NH_2$ grubu gerekli olup bu grubun metillenmesi veya asetillenmesi durumunda inhibitör etkisi büyük ölçüde düşer veya kaybolur (78).

Sulfonamid inhibitörler karbonik anhidrazların fizyolojik fonksiyonlarının incelenmesi açısından çok önemlidir. Sulfonamidlerden en çok kullanılanı asetazolamid veya ticari adıyla Diamox olup glaukoma tedavisinde kullanılmaktadır. Asetazolamidin enzime bağlanması $-SO_2NH$ grubu ile



Asetazolamid

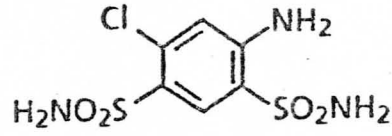
(2-asetilamino - 1,3,4 - tiyadiazol - 5 - sulfonamid)

gerçekleşir. Titre edilebilir diğer grup olan CH_3CONH grubunun enzime bağlanmada hemen hemen hiç rolü olmadığı saptanmıştır (79). Asetazolamid diyalizle uzaklaştırıldığında enzim tüm aktivitesini geri kazanmaktadır (80). Bu olay enzim ve inhibitör arasında hızlı ve geri dönüşümlü bir dengenin kurulduğunu göstermektedir.

Sulfonamidlerin enzime kuvvetli bağlanabilmesi için molekülde Zn^{2+} veya Co^{2+} nin varlığının şart olduğu gösterilmiştir (80). Apoenzim veya diğer metalokarbonik anhidrazlar sulfonamidlere çok daha zayıf bağlanırlar (81).

Sulfonamid inhibisyonu önemli bazı özellikler gösterir. Sulfonamidler karbonik anhidrazın hem hidrasyon hem de hidroliz aktivitelerini inhibe ederler. Sulfonamid-enzim kompleksinin X-ışını analizleri inhibitörün çinko atomuna veya ona çok yakın bir bölgeye bağlandığını göstermektedir. Etiketli asetazolamid kullanılarak inhibitörün moleküle kuvvetli bağlanabilmesi için metal iyonunun gerekli olduğu saptanmıştır (81). X-ışını verileri sulfonamid-metal bağlanmasının dışında sulfonamid grubu ile enzimin aktif merkez duvarı arasında başka ilişkilerin de mümkün olabileceğini göstermektedir.

Bir diğer sulfonamid inhibitör olan salamidin moleküle bağlanması da incelenmiştir (82).



Salamid
(1-amino-2,4-disulfonamid -5- klorobenzen)

Bu inhibitör metal iyonuna bağlanmasına ek olarak diğer sulfonamid grubu ile His 64'le ve amino grubu ile de His 118 ile ilişki kurar.

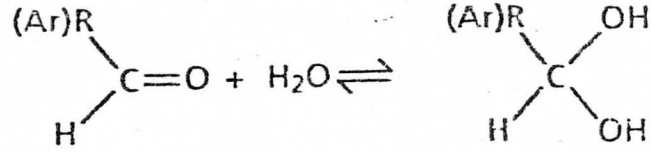
Armotik sulfonamidlerin karbonik anhidrazı inhibe etme potansiyelleri sulfonamid grubu metal iyonuna bağlanırken inhibitör molekülünün aromatik kısmının da aynı anda hidrofobik ilişkilerle stabilize olmasına bağlanmaktadır.

1.5. Karbonik Anhidrazın Katalitik Çeşitliliği

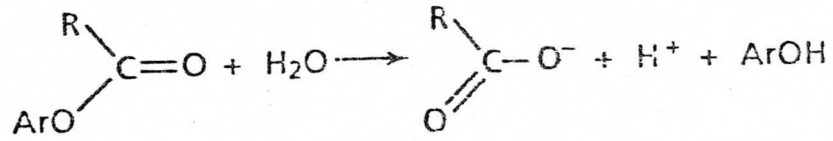
1960'ların ortalarına kadar karbonik anhidrazın en önemli özelliğinin karbondioksidin geri dönüşümlü hidrasyonuna karşı kesin özgülüğü olduğuna inanılıyordu. Fakat, Pocker ve Meany (83-85) insan ve sığır karbonik anhidrazlarının asetaldehitin hidrasyonunu da katalizlediğini saptadılar. Bu gözlem, karbonik anhidrazın katalitik çeşitliliğine başka örnekler bulmak için bir dizi çalışmanın başlamasına neden oldu. Çok geçmeden enzimin bazı aldehytlerin hidrasyonunu (86-88), 2,2-dihidroksi propiyonatın piruvat anyonuna dehidrasyonunu (89) ve bir dizi esterin hidrolizini (90-96) katalizlediği saptandı. Bazı araştırmacılar da eritrosit karbonik anhidraz fonksiyonunun kinetik analizi için esteraz aktivitesini kullanmayı tercih ettiler (97-102). Daha sonra Pocker ve Watamori (103) tarafından piridil asetatların ve Pocker ve Guilbert (104) tarafından piridilkarbonatların enzimle katalizlenmiş hidrolizi eritrosit karbonik anhidraz kullanılarak incelendi. Karbonik anhidrazın katalizlediği reaksiyonların bir listesi çizelge 1.5'de verilmiştir.

Çizelge 1.5. Karbonik Anhidraz'ın katalizlediği reaksiyonlar.

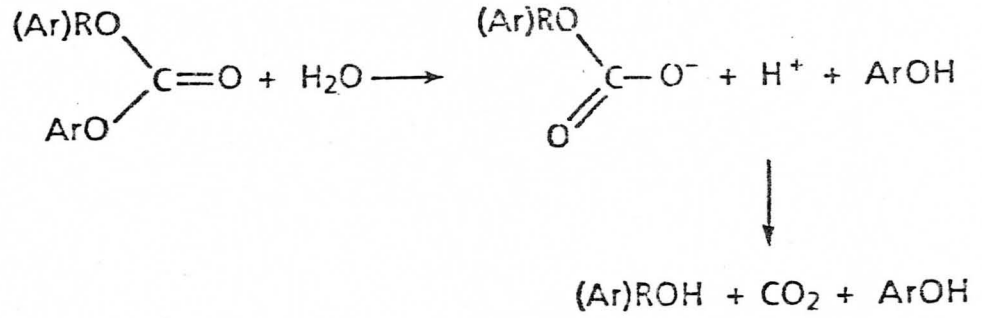
1. Aldehitlerin geri dönüşümlü hidrasyonu.



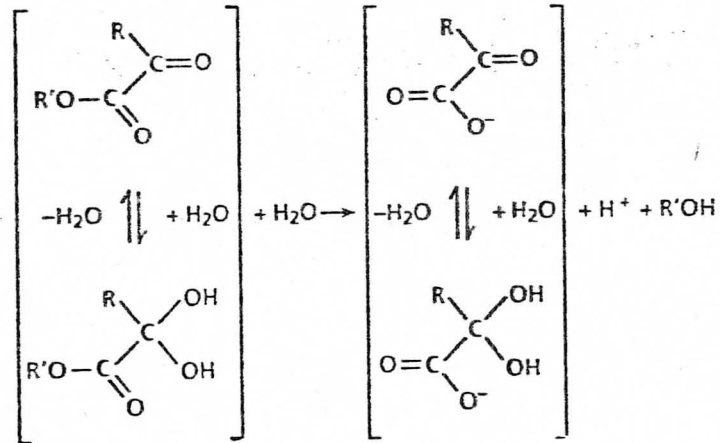
2. Aril karboksilat esterlerin hidrolizi.



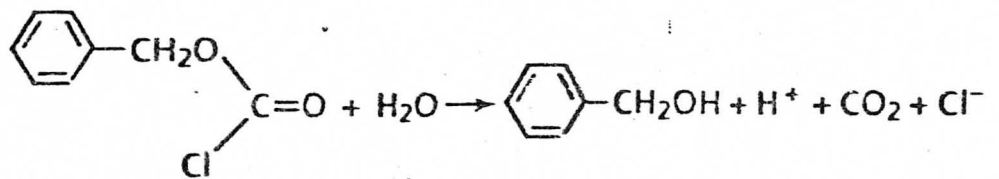
3. Alkil aril ve diaril karbonat esterlerin hidrolizi.



4. Alkil piruvat esterlerin hidrolizi.

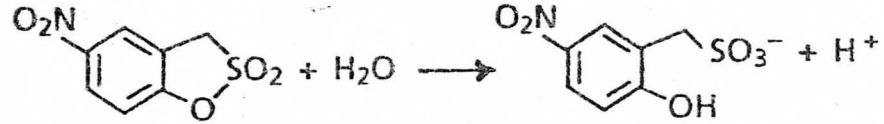


5. Karbobenzoksi klorürün hidrolizi.

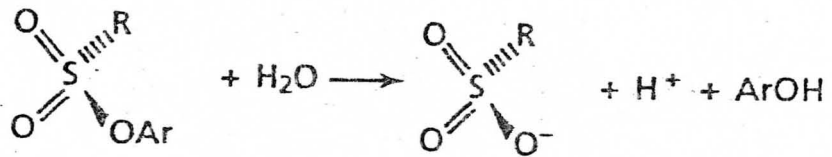


Çizelge 1.5 (devam)

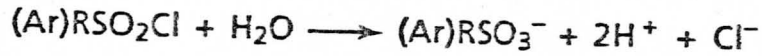
6. 3h-1,2 benzoksatiol-2,2-dioksitlerin,



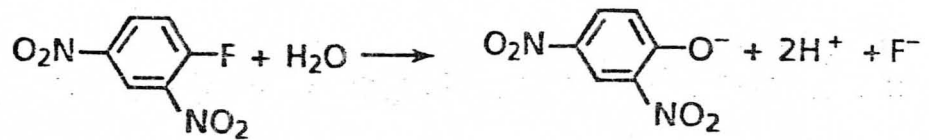
ve aril alkansulfonat esterlerin hidrolizi.



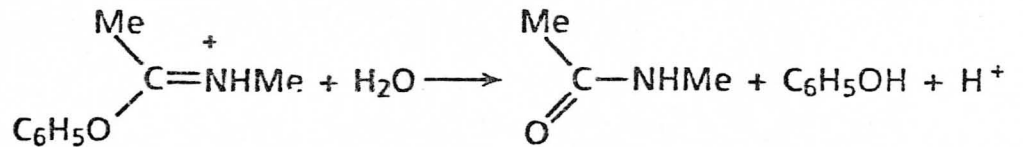
7. Sulfonil klorürlerin hidrolizi.



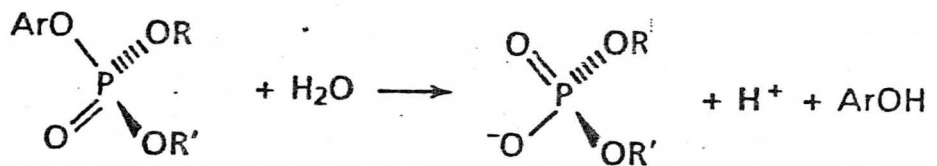
8. 1-Floro-2,4-dinitrobenzenin hidrolizi



9. Fenil-N-metil asetimidatın hidrolizi



10. Dialkil monoaril fosfat triesterlerin hidrolizi.



Bu reaksiyonların hepsi CO_2 in enzimatik hidrasyonuna benzer şekilde sulfonamidlerle büyük ölçüde inhibe olurlar. Anyon inhibisyonu da CO_2 ' inkinden daha az etkin olmak üzere mevcuttur.

1.6. Siyanojen Kimyası

Siyanojen, (etandinitril, $\text{N}=\text{C}-\text{C}=\text{N}$) çevrede yaygın olarak bulunan bir kirleticidir. Azotlu bileşiklerin yanması ile ortaya çıkar ve sigara dumanının da bir bileşenidir. Oda sıcaklığında çok zehirli bir gaz olan siyanojenin organik reaksiyonlardaki yüksek reaktivitesi oldukça iyi bilinmektedir (105). Bu küçük molekülün biyolojik moleküllerle olan reaktivitesi pek incelenmemiş olmakla beraber siyanojenin pre-biotik dünyada kondensasyon ajanı olarak bulunduğu tahmin edilmektedir (106). Bu molekülün fosfat ve ribozun (107), fosfat ve glukozun (108), fosfat ve nukleosidin (109) ve purin öncüllerinin (110) kondensasyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir.

Siyanojenin sadece molekül içi kondensasyonu sağladığı (111) molüküllerarası kondensasyonu ise etkilemediği rapor edilmiştir. Bazı model bileşiklerde (111), karbonik anhidraz enziminde (112,113) beta-laktamaz I ve tavuk yumurta akı lizoziminde (114) ve hemoglobin gibi bazı proteinlerde (114,115) siyanojen tarafından oluşturulan amid bağlarının varlığı kanıtlanmıştır.

Alfa-amino asitler birçok deney koşullarında siyanojen ile muamele edilmiş ve 0-25 °C de günler süren çok yavaş modifikasyon gözlenmiştir (114). Buna karşılık aynı sıcaklıklarda siyanojenle muamele edilen proteinler çok kısa bir süre içinde modifiye olurlar (112,116,117). Bu bulgular, proteinlerde olup amino asitlerde olmayan bazı yapısal özelliklerin kondensasyon reaksiyonunu mümkün kıldığını akla getirmiştir. Bunun üzerine, bir tuz köprüsü (salt bridge) kuracak kadar birbirine yakın olan karşıt yüklü gruplar arasındaki ilişkilerin, siyanojenin proteinlerle olan reaksiyonunu hızlandırdığı öne sürülmüştür (116).

Pro-pro dipeptidi kullanılarak siyanojen ile siklizasyon reaksiyonunun çözüme bağımlılığı araştırılmıştır. Bu dipeptid hem suda hem de organik

çözgenlerde çözünür ve çeşitli çözgenlerle ilişkisi iyi tanımlanmıştır (117). Pro-pro, metanol/dimetilsulfoksit (25:75) çözgeni içinde siyanojenle muamele edilip reaksiyon ürünleri kütle spektroskopisi ile karakterize edildiğinde prolil-prolindiketopiperazin olduğu saptanmıştır (114). Sonuçlar, pro-prodiketopiperazin standart kullanılarak NMR ile de desteklenmiştir. Bu bulgu siyanojenin amid bağı oluşturduğu konusundaki ilk delildir. Leu-leu, ala-phe, leu-gly-phe, gibi model bileşiklerin de siyanojen varlığında kolayca halka oluşturduğu buna karşılık w-fonksiyonel grubu olmayan amino asitlerin halka oluşturmadığı saptanmıştır (114).

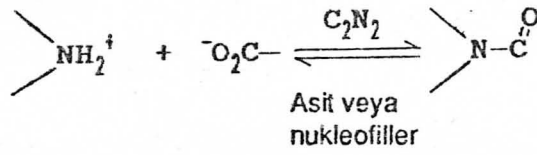
Siyanojenin aynı zamanda açıl-guanidino bileşiklerinin halka oluşturmasına da aracılık ettiği de saptanmıştır (Day, sözlü görüşme). Siyanojenin aminoasit yan zincirleri ile oluşturduğu önerilen reaksiyonlar Şekil 1.5 de gösterilmiştir.

Siyanojenin di-asitlerle reaksiyonu sonucunda bu bileşiklerin birkaç dakika içinde kolayca anhidritlerine dönüştüğü görülmüştür (Day, sözlü görüşme). Diasit modelinin seçilmesi ve anhidrit oluşumunun gözlenmesi proteinlerde siyanojenle karboksil-karboksilat ilişkilerinin aydınlatılması için bir ön çalışma olarak düşünülmüştür.

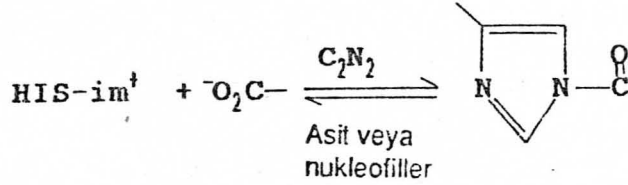
Pro-pro dipeptidinin siyanojenle indüklenmiş kondensasyon reaksiyonunun polar olmayan çözgenlerde daha hızlı yürüdüğü saptanmıştır. Bu model ile gözlenen siyanojen reaksiyonunun solvante bağımlılığı reaktifin birbirine uygun uzaklıkta ve daha hidrofobik bölgelerde yerleşmiş olan karboksi ve amino gruplarının kondensasyonunu sağladığını ima eder (116). Siyanojen, proteinlerle reaksiyonu göz önüne alındığında çözgenin hidrofobikliği proteinlerin iç kısmıyla özdeşleştirilebilir.

Proteinlerde siyanojen tarafından oluşturulan reaksiyonların önemi şudur: 1. Proteinlerdeki fonksiyonel gruplar arasındaki yakınlığı tayin etmek amacıyla oluşturulan çapraz bağlanma (cross-linking) reaksiyonları çalışılan sistemin özelliklerini değiştiren moleküllerin kullanımını gerektirebilir. Şimdiye kadar yapılan çapraz-bağlama çalışmalarında protein içinde siyanojene rastlanmadığından bu molekül, proteine bağlanmadan bu işi başarabilen yeni

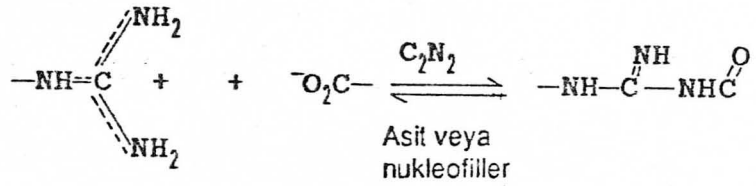
1. Kararlı amid bağı oluşumu



2. Kararsız amid bağı oluşumu



3. Açıl guanidino bağı oluşumu



Şekil 1.5. Siyanojenin aminoasit yan zincirleri ile öngörülen reaksiyonları

bir reaktif olabilir. 2. Proteinlerde iyon çiftlerinin yerini tayin etmede kullanılan X-ışını kristalografisi tekniği bazı proteinlerin kristalini elde etmedeki zorluk ve bu çalışmanın gerektirdiği uzun zaman nedeniyle her proteine uygulanmamıştır. Küçük organik moleküllerle, aminoasitlerle, peptid ve proteinlerle olan reaksiyonları siyanojenin uygun uzaklıktaki karşıt yüklü gruplarla reaksiyon verdiğini göstermektedir ki bu da siyanojenin proteinlerdeki iyon çiftlerinin yerlerini belirtmede kullanılabileceğini düşündürür. 3. Siyanojenin biyolojik önemi olan moleküllerle reaksiyonları henüz bilinmemektedir. Protein ve enzimlerle yapılan siyanojen çalışmalarının bu bileşiğin in vivo etkileri üzerine ışık tutabileceği umulmaktadır.

Yakın zamanlarda bazı karbonik anhidrazların siyanojenle muamelesi sonucu hidrataz ve esteraz aktivitelerinin farklı olarak inhibe olduğu saptanmıştır (113,119). Sığır karbonik anhidraz II, insan karbonik anhidraz I, köpek karbonik anhidraz ve tavşan karbonik anhidrazın hidrataz aktivitelerinin

sırasıyla yüzde 0, 80, 71, 0; esteraz aktivelerinin ise yüzde 97, 55, 48 ve 0 inhibisyona uğradığı bildirilmiştir (113).

Sığır karbonik anhidraz II'nin inhibisyonu sırasında inhibitörün kendisinin proteine inkorpore olmadığı kaybedilmiştir (112). İnhibitörün enzimdeki bir glutamik asidin gama-COOH grubu ile bir histidinin imidazol grubu arasında molekül içi bir çapraz bağlanmaya neden olduğu bildirilmiştir. Siyanojenle muamele edildikten sonra amino asit analizi yapılan proteinde bir glutamik asit ve bir histidin birimi eksik görülmüştür. Histidinin rolü NMR ile, glutamik asidin rolü ise modifiye birimin 2,4-diaminobutirik aside dönüştürülüp sonra aminoasit analizi ile tayini sonucu ortaya çıkarılmıştır.

Sığır karbonik anhidraz II'nin siyanojenle modifikasyonunu inceleyen bir başka çalışmada ise olduğu kabul edilen bağı radyoaktif etiketli nukleofil bağlanarak etiketli molekül ile bu bağların proteinin primer yapısındaki yerleri tespit edilmeye çalışılmıştır (117). Bu çalışmanın sonucunda proteinin üç bölgesinde bağlanma tespit edilmiş ve bu bölgelerin ikisinin aktif merkeze ait aminoasitleri içerdiği saptanmıştır.

Bu tezin amacı ise sığır karbonik anhidraz II enziminin siyanojenle muameleden sonra bazı "anormal" substratlarına karşı davranışının incelenmesi ve eğer varsa bu davranış değişikliğine neden olan modifikasyonun aydınlatılması olarak saptanmıştır. Proteinlerin primer yapısında siyanojenle reaksiyona giren amino asitin veya amino asitlerin yerinin ve kimliğinin saptanması siyanojenin biyolojik moleküller üzerindeki etkisinin mekanizmasının anlaşılması açısından önemlidir.

2. DENEYSEL BÖLÜM

2.1. Bazı Substratların Sentezi

2.1.1. Materyal

2-Hidroksipiridin, 3-hidroksipiridin, 4-hidroksipiridin, metilklorokarbonat Sigma'dan; salisil alkol Aldrich'ten; asetonitril (HPLC kalite), aseton, NaOH, dietileter, HNO₃, H₂SO₃, CaCO₃, CH₂Cl₂, POCl₃, Fischer'den; NaHSO₃ Matheson Coleman and Bell Company'den; N₂, Wright Brothers Inc. den temin edildi.

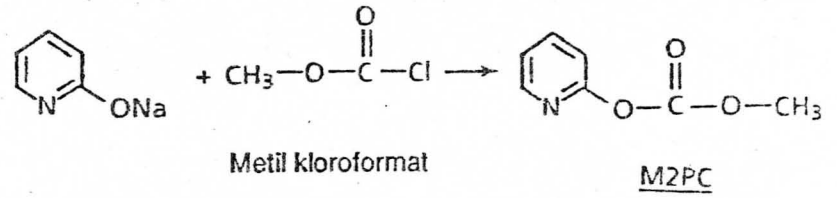
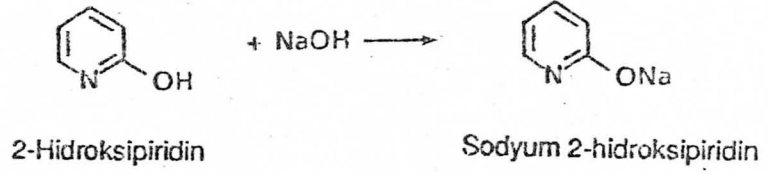
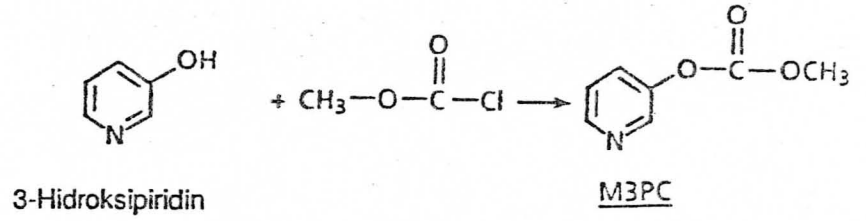
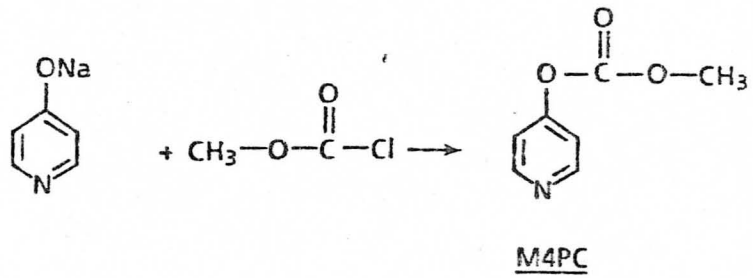
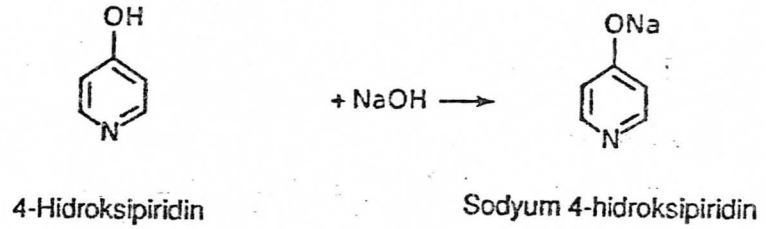
Kullanılan Rotavapor Buchler-Instruments; TLC tabakalar (Floresans indikatörlü 13181 Silikajel) Kodak'tan temin edilmişti. Act-1 Polimerik LC C-18 kolon Interaction Chem-Inc ürünüydü.

2.1.2. Metodlar.

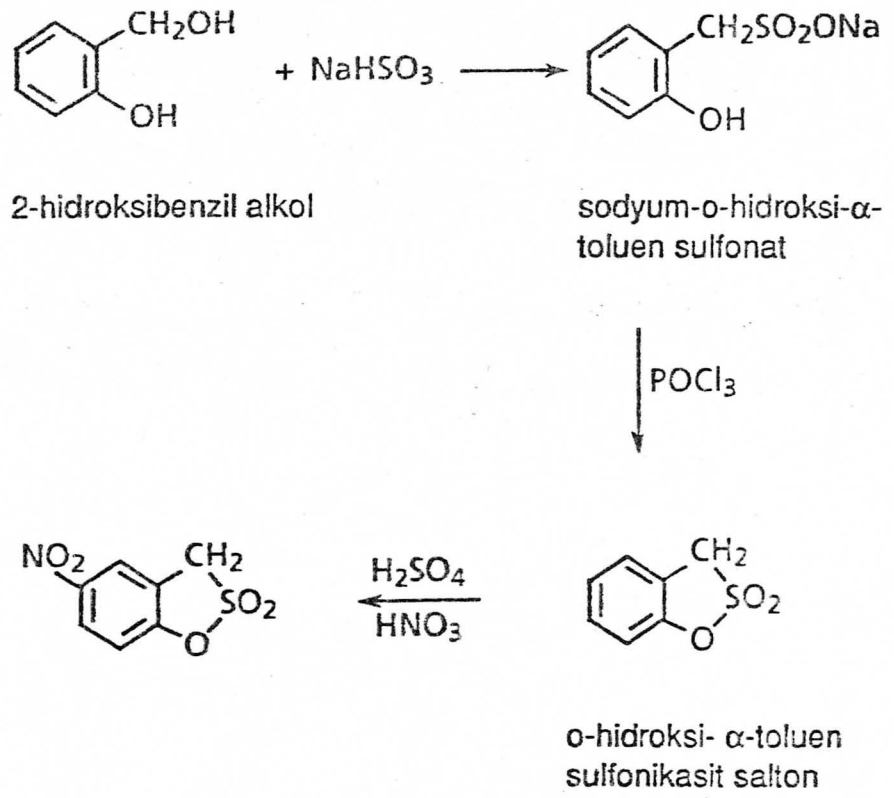
Metil piridil karbonatlar Pocker ve Guilbert (104) yöntemine göre şekil 2.1 deki reaksiyonlar uyarınca, 2-hidroksi-5-nitro- α -toluensulfonikası salton Kaiser ve Lo'ya (102) göre şekil 2.2 deki reaksiyon uyarınca sentezlendi.

2.1.3. Metil 2-Piridil Karbonat'ın (M2PC) Sentezi.

4,75 g. 2-hidroksipiridin çok az suda çözülerek aktif kömür ile renksiz sıvı edilinceye kadar muamele edildi. Bu çözeltiye çok az suda çözülmüş 2 eşdeğer miktar NaOH çözeltisi karıştırılarak eklendi ve oluşan çökelek çok az su ile yıkanarak süzüldü ve vakumlu kurutucuda bir gece kurutuldu. Bu çökeleğin dietil eterdeki karışımına 1,5 eşdeğer miktar metilkloroformat (MCC) N₂ altında ve devamlı karıştırılarak eklendi. Reaksiyon karışımı 0°C de 1 saat karıştırıldıktan sonra süzüldü. Süzüntüdeki MCC ve eter rotavapor yardımı ile oda sıcaklığında uzaklaştırıldı. Kalıntı, kısa boyunlu bir mini distilasyon düzeneği ile vakumda distillendi. Distilat aynı kaynama noktasına sahip bir safsızlık içerdiği için daha ileri saflaştırılmaya tabi tutuldu. Eterde çözülen distilat doymuş NaCl çözeltisi ile eter fraksiyonu

M2PCM3PCM4PC

Şekil 2.1. Metil piridil karbonatların sentezi



Şekil 2.2. HNTSA'nın sentezi

300 nm'de sabit absorbans gösterinceye kadar ekstrakte edildi. Ürünün hidrolizini engellemek için eter fraksiyonu hızla Na_2SO_4 kolonundan geçirildi. Çözelti 100°C 'ye soğutulmuş olarak kurutuldu. Eter fazı 20°C de rotavaporde uzaklaştırıldı. Kalıntı vakum distilasyonu ile N_2 altında distillenerek ürün elde edildi. Kimyasal yapı IR, MS, UV ve NMR ile tayin edildi.

M2PC, hidrolize diğer iki izomerden daha yatkın olması nedeniyle, çabuk bozulan bir madde olduğundan substrat olarak kullanılmadan önce HPLC ile saflaştırmaya tabi tutuldu. Polimerik C-18 kolondan asetonitril çözgeni ile geçirilerek saflaştırıldıktan sonra kullanıldı.

2.1.4. Metil 3-piridil karbonatın (M3PC) sentezi.

4,75 g. 3-hidroksipiridin tartularak muhtemel nemi uzaklaştırmak için vakumlu kurutucuda bir gece bekletildi.

Kuru 3-hidroksipiridin 250 mL'lik üç boyunlu yuvarlak balona alınarak 1 saat N_2 akımında tutuldu. Bir saatin sonunda N_2 akımı durdurularak 125 mL kurutulmuş asetonitril, devamlı karıştırılarak yavaş yavaş eklendi. Çıkan HCl'i tutmak için 5 eşdeğer miktar (12,5 g) CaCO_3 eklendi. 1,5 eşdeğer miktar (5,85 mL) metil klorokarbonat devamlı karıştırılarak damla damla eklendi. Reaksiyonun gidişi zaman zaman alınan örneklerle TLC tabakalarında aseton çözgeni kullanılarak incelendi. Üç saat sonunda karışım bir cam süzgeçten süzüldü. Filtrat bir rotavapor yardımı ile buharlaştırılarak ($36-38^\circ\text{C}$) ele geçen kahverengi yağimsı madde mini distilasyon kolonu kullanılarak vakumda distilendi. Ürün, toplama kabında beyaz kristaller olarak elde edildi. Erime noktası 33°C olarak ölçüldü. Kimyasal yapı IR, NMR ve MS ile saptandı. Beyaz kristaller neme olan duyarlılıkları nedeniyle desikatöre yerleştirilerek buzdolabında saklandı.

2.1.5. Metil 4-piridil karbonatın (M4PC) sentezi.

4,75 g. 4-hidroksipiridin çok az suda çözülerek renksiz çözelti elde edilinceye kadar aktif kömür ile muamele edildi. Bu çözeltiliye iki eşdeğer

miktar çok az suda çözülmüş NaOH ilave edildi. Oluşan çökelek süzülerek az miktar su ile yıkandı ve vakum desikatörde bir gece kurumaya bırakıldı. Kuru çökeleğe 1,5 eşdeğer miktar MCC azot altında karıştırılarak yavaş yavaş eklendi. Reaksiyon karışımı 4 saat 0°C de azot altında devamlı karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon karışımı süzülerek süzüntü 25°C de rotavaporde buharlaştırıldı.

Ham ürün minimum miktar asetonitrilde çözülerek -45°C de asetonitril/kurubuz banyosunda yeniden kristallendirildi. Kristal ürün vakum desikatöründe kurutularak kuru atmosferde buzdolabında saklandı. Kimyasal yapı IR, NMR, UV ve MS ile saptandı.

2.1.6. 2-Hidroksi-5-nitro- α -toluensulfonikasit salton'un (HNTSA) sentezi.

2,46 g 0-hidroksi-benzil alkol (salisil alkol) ile 2,05 g sodyum bisülfid 45 mL suda çözülerek 8 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Suyun büyük kısmı distilasyon ile, geri kalan kısmı ise rotavaporde uzaklaştırıldı. Beyaz kalıntı vakumlu kurutucuda kurutuldu. Ele geçen katı, Sokslet cihazında etanol ile devamlı ekstrakte edilerek beyaz kristaller halinde sodyum o-hidroksi- α -toluensulfonat elde edildi.

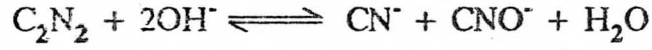
3,1 g sodyum o-hidroksi- α -toluensulfonata 15,26 mL POCl₃ eklenerek reaksiyon karışımı 125°C ye ısıtıldı. Karışım 125 °C de geri soğutucu altında HCl buharları iyice uzaklaşmaya kadar kaynatıldı. Kaynatmaya bir saat devam edildi. POCl₃'ün fazlası distilasyonla uzaklaştırılarak krem renkli kalıntı soğutuldu. Soğuyan, katı toz haline getirilerek 50 mL buzlu suya aktarıldı. Beyazlaşan katı buzlu su ile 4 saat temasta bırakıldıktan sonra süzüldü; soğuk suyla yıkandı, kurutuldu ve etanolden kristallendirildi. Oluşan o-hidroksi- α -toluensulfonikasit saltonun erime noktası 87,1°C olarak saptandı.

o-hidroksi- α -toluensulfonikasit saltonun 2,4 g'ı 20 mL derişik H₂SO₄ de çözüldü ve çözelti su banyosunda soğutuldu. Bu çözeltiye 1,07 mL % 70.3 lük HNO₃ 15 dakikada devamlı karıştırılarak ilave edildi. Oluşan uçuk sarı çözelti buz banyosunda 10 dakika bekletildi. Çözeltiye daha fazla çözelek elde edilmeyinceye kadar küçük buz parçaları eklendi. Oluşan uçuk sarı çökelek

hazırlanarak hemen kullanıldı.

Hazırlanan bu siyanojen stok çözeltisinin derişimi aşağıda açıklandığı gibi belirlendi:

Siyanojen, bazik ortamda kantitatif olarak siyanür ve siyanata hidrolizlenir.

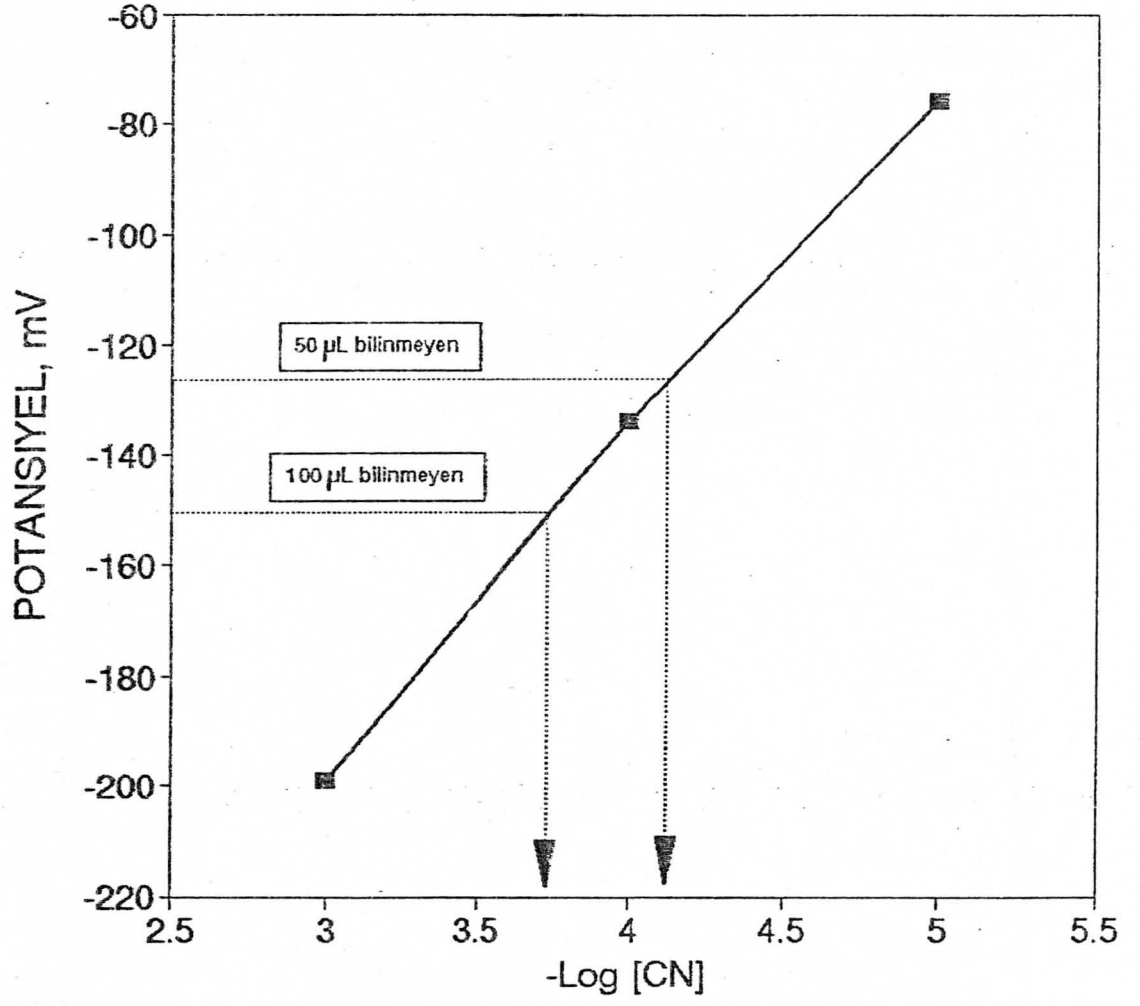


Siyanür derişimi, siyanür iyon seçici elektrodu (Orion Research) ile potansiyometrik olarak tayin edildi. Bir Ag/AgCl (Orion Research) elektrodu referans olarak kullanıldı. Elektrotlar standart KCN çözeltisi ile önce kalibre edildi. Bunun için 0,65 g kuru KCN bir litrelik balonjojede bir kısım su içinde çözüldü. Buna 10 mL iyonik şiddet ayarlayıcı (10 M NaOH) katıldı ve çözelti 1 litreye tamamlandı. Bu çözelti yardımıyla 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M siyanür çözeltileri hazırlandı. Bu standart çözeltiler plastik şişelerde saklanarak her hafta taze olarak hazırlandı.

Standart çözeltilerin 100 mL'sine 1 mL iyonik şiddet ayarlayıcısı eklenerek potansiyometrede değerleri okundu ve bu değerlerle standart kalibrasyon grafiğı elde edildi. Şekil 2.3 de standart kalibrasyon grafiğı görülmektedir.

Hazırlanan siyanojen stok çözeltisinden 50 ve 100 mL lik kısımlar 100 mL suya 1 mL 10 M NaOH çözeltisi ile birlikte eklendi. Bu yüksek pH ortamında siyanojenin tamamen siyanür ve siyanata hidroliz olması sağlandıktan sonra bu çözeltilerin de mV değerleri pH metreden okundu. Eldeki standart kalibrasyon grafiğinden bu değerlere karşı gelen CN^- derişimleri okunarak siyanojen çözeltisinin derişimi hesaplandı. Standart ve bilinmeyen CN^- derişimleri ve okunan mV değerleri aşağıda verilmiştir:

Standart(M)	mV
10^{-3}	-199
10^{-4}	-134
10^{-5}	-76
50 μL bilinmeyen	-126
100 μL bilinmeyen	-148



Şekil 2.3. C_2N_2 derişimi tayini için standart kalibrasyon grafiği.

Bu sonuçlara göre 1 mL pH'sı 4'e ayarlı suda 40 mL siyanojen gazı çözülerek elde edilen siyanojen stok çözeltisinin derişimi 0,19 M olarak saptandı. Bu sonuç daha önce rapor edilen (105) C_2N_2 gazının çözünürlük değerleriyle uyum içindedir.

2.2.4. Enzimin C_2N_2 ile muamelesi

5 mg BCA II 300 mL suda çözülerek enzimin stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti 4°C de buzdolabında bozulmadan günlerce saklanabilir. Stok çözeltinin derişimi 280 nm'deki absorbansı ölçülerek ve molar absorbans değeri $\epsilon=54\ 000\ cm^{-1}\ M^{-1}$ kullanılarak saptandı.

Bir mililitrelik reaksiyon şişesine hazırlanan enzim stok çözeltisinden ve siyanojen stok çözeltisinden hesaplanan miktarlar bir mikropipet yardımı ile aktarıldı ve pH'sı 4 olan su ile seyreltme yapılarak enzim derişimi $5,0 \times 10^{-5}$ M, C_2N_2 derişimi ise $5,0 \times 10^{-2}$ M olacak şekilde ayarlandı. Reaksiyon şişesinin ağzı kapatılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. İki saat sonunda çözelti yüzeyinden azot akımı geçirilerek içindeki siyanojen uzaklaştırıldı. Aynı hacimdeki başka bir reaksiyon şişesinde siyanojen hariç diğer bütün işlemler tekrarlanarak bir de BCA II kontrol çözeltisi hazırlandı. Kontrol ve siyanojenle muamele edilmiş BCA II çözeltileri daha sonra istenilen oranda ve istenilen tampon çözelti ile seyreltilerek deneylerde kullanıldı.

2.3. p-Nitrofenilasetat (p-NPA) Esterinin C_2N_2 ile Muamele Edilmiş BCA II ile Hidrolizi

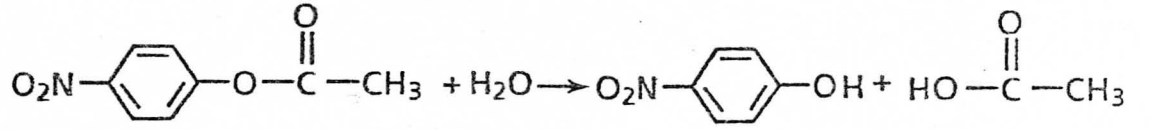
2.3.1. Materyal

p-NPA, HEPES, asetazolamid, Aldrich'ten; asetonitril Fisher'den; C_2N_2 Matheson'den temin edildi. Spektrofotometrik ölçümler Perkin Elmer Model Lambda 4B UV-VIS Spektrofotometre ile alındı. Diğer reaktif ve çözenler daha önce belirtilmişti.

2.3.2. Metod

p-NPA hidrolizine ait deneyler Pocker ve Stone'a (92) göre yapıldı. C_2N_2 ile muamele edilmiş ve edilmemiş BCA II enziminin esteraz aktivitesi p-NPA substratı kullanılarak incelendi.

BCA II p-NPA esterini aşağıda reaksiyon uyarınca p-nitrofenole hidroliz eder.



p-NPA'nın protonsuz hali 400 nm'de kuvvetli absorbands yapar. Bu ester ölçülebilir hızlarla hidroliz olması nedeniyle sabit pH'da hassas spektrofotometrik tayine imkan verdiği için BCA II enziminin aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılır.

2.3.3. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin p-NPA esteraz aktivitesinin incelenmesi

Siyanojenle muamele edilmiş enzim 50 mM HEPES (pH=7.2) tampon çözeltisi ile seyreltilerek derişimi $1,6 \times 10^{-6}$ M'a ayarlandı. p-NPA stok çözeltisi asetonitril ile hazırlandı. p-NPA stok çözeltisinin derişimi belirli miktar ester pH 10'da hidroliz edilip 400 nm'de absorbandsı ölçülerek ve $\epsilon = 18\,400 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ kullanılarak $1,125 \times 10^{-2}$ M olarak saptandı.

5 μL substrat çözeltisi kuvarz UV küvetine önceden konmuş 1,25 mL enzim çözeltisine eklendi. Küvet parafilm ile kapatılarak acele ile üç kez alt üst edildikten sonra aletin ölçme kompartmanına yerleştirilerek 40 dakika boyunca her 2 dakikada 400 nm'deki absorbands kaydedilerek ürün oluşumu izlendi.

Ölçmeler sırasında spektrofotometrenin ölçme kompartmanından bir termostator vasıtası ile devamlı su geçirilerek temperatur 25 ± 0.1 °C de sabit tutuldu.

Ölçmeler siyanojenle muamele edilmiş ve kontrol enzim çözeltileri için tekrarlandı. Her deney en az üç kez tekrarlanarak ölçümlerin ortalaması alındı.

Deney aynı şartlarda pH 7,2 HEPES tampon çözeltisi ile ortamda enzim olmaksızın tekrarlanarak tampon çözeltisinin hidroliz olayına katkısı saptandı ve bu değerler enzimle alınan ölçümlerden çıkarılarak gerçek enzim aktivitesi saptandı.

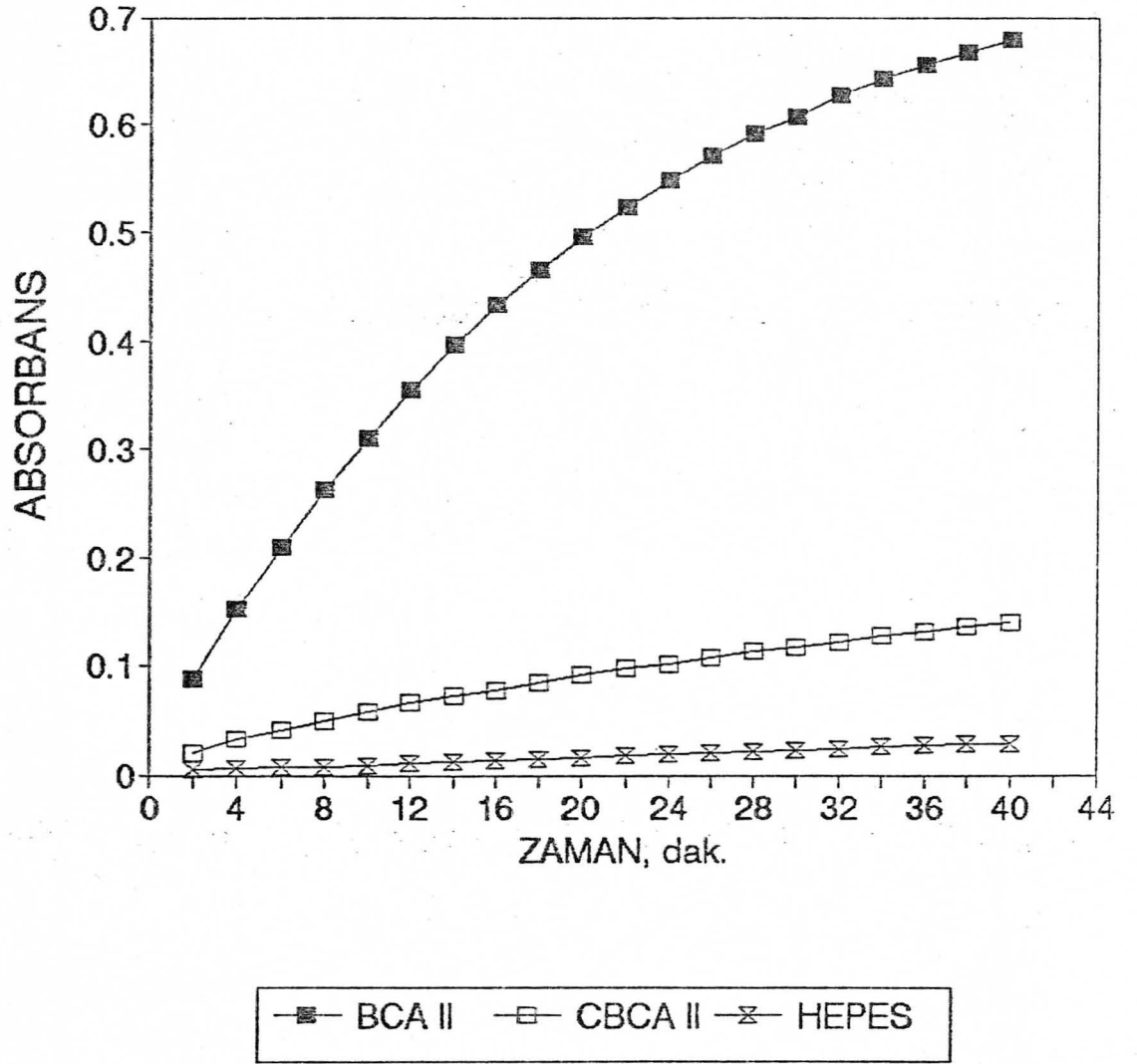
Siyanojenle muamele edilmiş enzimin p-NPA esteraz aktivitesinin % 79 inhibe olduğu hesaplandı.

Kontrol ve siyanojenle muamele edilmiş enzim ve sadece tampon çözelti ile hidroliz reaksiyonlarına ait tipik bir deney sonucu şekil 2.4'de görülmektedir.

2.3.4 BCA II ile katalizlenen p-NPA hidroliz reaksiyonunun asetazolamid ile inhibisyonu

BCA II enziminin inhibitörü olan asetazolamidin p-NPA hidrolizini inhibe ettiği rapor edilmektedir (93). Asetazolamid aktif merkezin bir titrantı gibi davranır ve 1/1 oranındaki inhibitör % 100 e yakın inhibisyona neden olur. Asetazolamid inhibisyonu enzimin aktivitesinin dedeksiyonu için bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu durumun satın alınan enzim için de geçerli olup olmadığının kontrolü için farklı inhibitör derişimleri ile inhibisyon ölçüldü.

Deney için uygun miktarda asetazolamid içeren 2,6 mL pH 7,2 HEPES tampon çözeltisine 0,09 mL BCA II stok çözeltisi eklendi. Daha sonra 0,3 mL p-NPA stok çözeltisi eklenerek hidroliz başlatıldı ve karışımındaki absorbans değişimi 400 nm'de izlendi. Küvetteki enzim derişimi $1,6 \times 10^{-6}$ M; substrat derişimi ise $4,5 \times 10^{-5}$ M olarak hesaplandı. Absorbans 40 dakika boyunca her 2 dakikada bir ölçülerek ürün oluşumu izlendi. Sonuçlar geriye kalan aktiviteye



Şekil 2.4. BCA II, CBCA II ve HEPES'in p-NPA hidroliz aktivitesi.

karşı [Asetazolamid]/[BCA II] olarak değerlendirildi. Bu değerlendirme şekil 2.5'de görülmektedir.

2.3.5. Farklı substrat derişimleri kullanılarak BCA II'nin C_2N_2 ile inhibisyonunun tayini.

Bölüm 2.3.3'de açıklanan inhibisyon tayin deneyleri farklı p-NPA derişimleri kullanılarak tekrarlandı.

Bunun için, $1,25 \times 10^{-2}$ M, $5,3 \times 10^{-2}$ M, $1,0 \times 10^{-2}$ M ve $1,5 \times 10^{-1}$ M p-NPA stok çözeltileri asetonitril çözgeninde hazırlandı. Bu çözeltilerin 5 mL'eri bölüm 2.3.3 de anlatıldığı şekilde enzim çözeltisine eklenerek 400 nm'de absorbans değişimi izlendi. Küvetteki son enzim derişimi $1,6 \times 10^{-6}$ M; son substrat derişimleri ise sırasıyla $4,80 \times 10^{-5}$ M, $1,94 \times 10^{-4}$ M, $3,80 \times 10^{-4}$ M ve $5,81 \times 10^{-4}$ M olarak hesaplandı.

Farklı substrat derişimleri ile elde edilen inhibisyon değerleri çizelge 2.1 de verilmiştir.

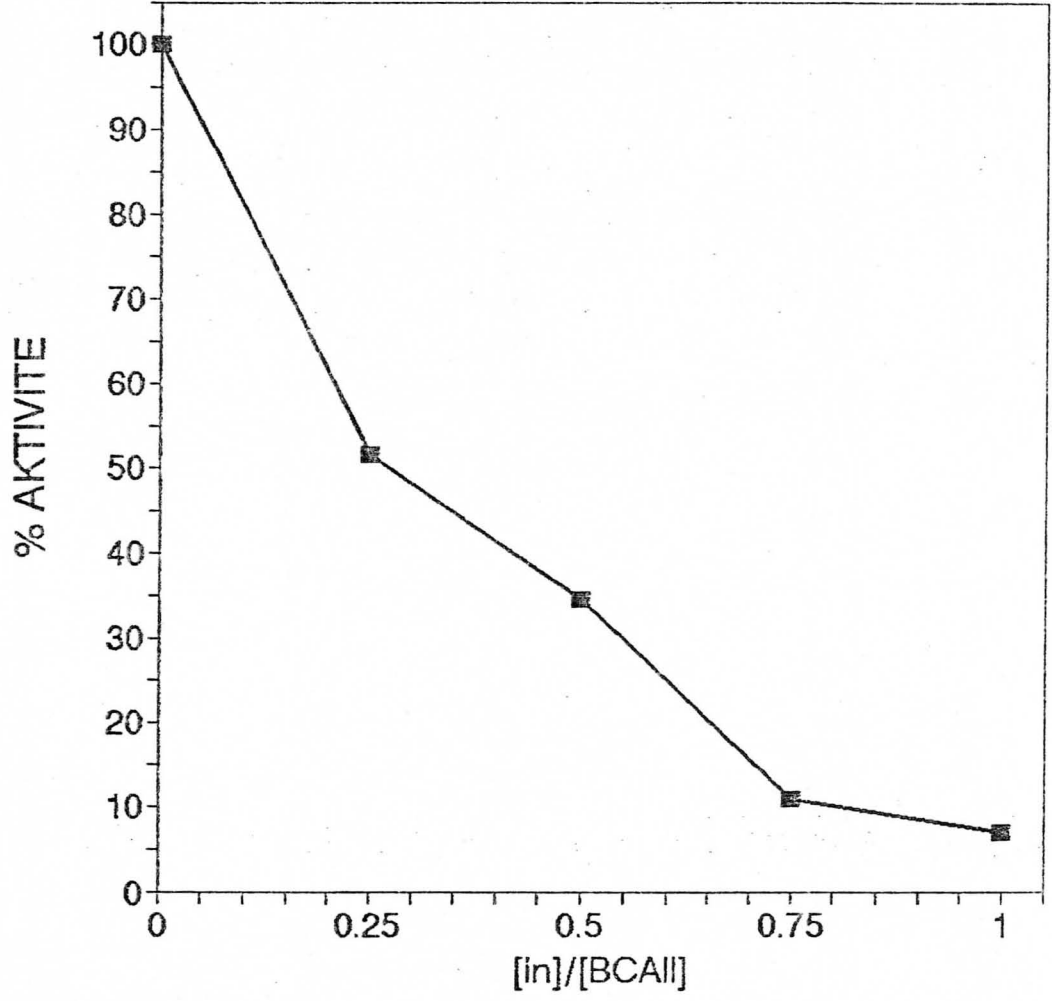
Çizelge 2.1. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin aktivitesinde farklı p-NPA derişimleri ile gözlenen inhibisyon değerleri.

[p-NPA] (M)	% İnhibisyon
4.80×10^{-5}	79
1.94×10^{-4}	77
3.80×10^{-4}	79
5.81×10^{-4}	77

2.3.6. Farklı C_2N_2 derişimlerinin BCA II'nin p-NPA hidroliz aktivitesinin inhibisyonuna etkisi.

Enzim inhibisyonunun farklı C_2N_2 derişimlerine göre değişimi izlendi.

Enzim, bölüm 2.2.'de bahsedilen şekilde C_2N_2 ile muamele edildi. Ancak muamele sırasındaki C_2N_2 derişimi her seferinde değiştirilerek 0, $1,0 \times 10^{-2}$, $5,0 \times 10^{-2}$, $1,0 \times 10^{-1}$ M değerlerine ayarlandı. Kullanılan C_2N_2 derişimlerine göre hesaplanan inhibisyon değerleri çizelge 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. BCA II'nin asetazolamid ile inhibisyonu.

Çizelge 2.2. Farklı C_2N_2 derişimleri kullanılarak muamele edilen BCA II enziminin p-NPA hidroliz aktivitesinde gözlenen inhibisyon değerleri.

$[C_2N_2]$ (M)	% İnhibisyon
0	0
1.0×10^{-2}	66
5.0×10^{-2}	78
1.0×10^{-1}	80

2.3.7. BCA II enziminin p-NPA hidroliz aktivitesinin C_2N_2 ile inhibisyonuna muamele süresinin etkisi.

BCA II enziminin C_2N_2 ile modifikasyonu zamana göre incelendi.

$5,0 \times 10^{-5}$ M BCA II çözeltisi $5,0 \times 10^{-2}$ M C_2N_2 ile 5, 15, 25, 90 ve 120 dakika muamele edildi. Bu enzim çözeltileri istenilen oranda pH 7,2 HEPES tamponu ile seyreltilerek p-NPA hidroliz aktiviteleri incelendi. Deneyler sırasında enzim derişimi $1,6 \times 10^{-6}$ M; substrat derişimi ise $4,5 \times 10^{-5}$ M'di. Belirtilen süreler sonunda enzim çözeltileri hiç vakit kaybedilmeden kullanıldı.

Her muamele süresi sonunda elde edilen aktivite değerleri dikkate alınarak % inhibisyon değerleri hesaplandı. Bu sonuçlar çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. C_2N_2 ile muamele süresine bağlı olarak BCA II enziminin p-NPA hidroliz aktivitesinde gözlenen inhibisyon.

t (dak)	% İnhibisyon
0	0
5	48
15	68
25	73
90	79
120	79

2.3.8. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II ile katalizlenen p-NPA hidroliz reaksiyonun kinetik parametrelerinin tayini.

Kinetik parametrelerin tayini için Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanıldı.

Bunun için 6 farklı substrat derişiminde çalışılması planlandı. 1 mL enzim çözeltilisine asetonitril içindeki p-NPA stok çözeltilisinden sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 100 μ L eklenerek her seferinde ürün oluşumu 400 nm'deki absorbans değişiminden izlenerek farklı substrat derişimlerinde reaksiyon ilk hızları saptandı. Reaksiyon sırasında enzim derişimi $2,10 \times 10^{-6}$ M; substrat derişimleri ise sırasıyla $1,3 \times 10^{-5}$, $2,6 \times 10^{-5}$, $3,9 \times 10^{-5}$, $5,2 \times 10^{-5}$, $6,5 \times 10^{-5}$, $1,3 \times 10^{-4}$ M olarak hesaplandı. Saptanan ilk hızlarla substrat derişim değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafikleri şekil 2.6 ve 2.7'de görülmektedir.

Bu grafiklerden yararlanarak bulunan K_m ve V_{max} değerleri aşağıda belirtilmiştir.

	$\frac{K_m(M)}{}$	$\frac{V_{max}(M/dak)}{}$
BCA II	$9,44 \times 10^{-5}$	$1,01 \times 10^{-4}$
CBCA II	$1,06 \times 10^{-4}$	$3,68 \times 10^{-7}$

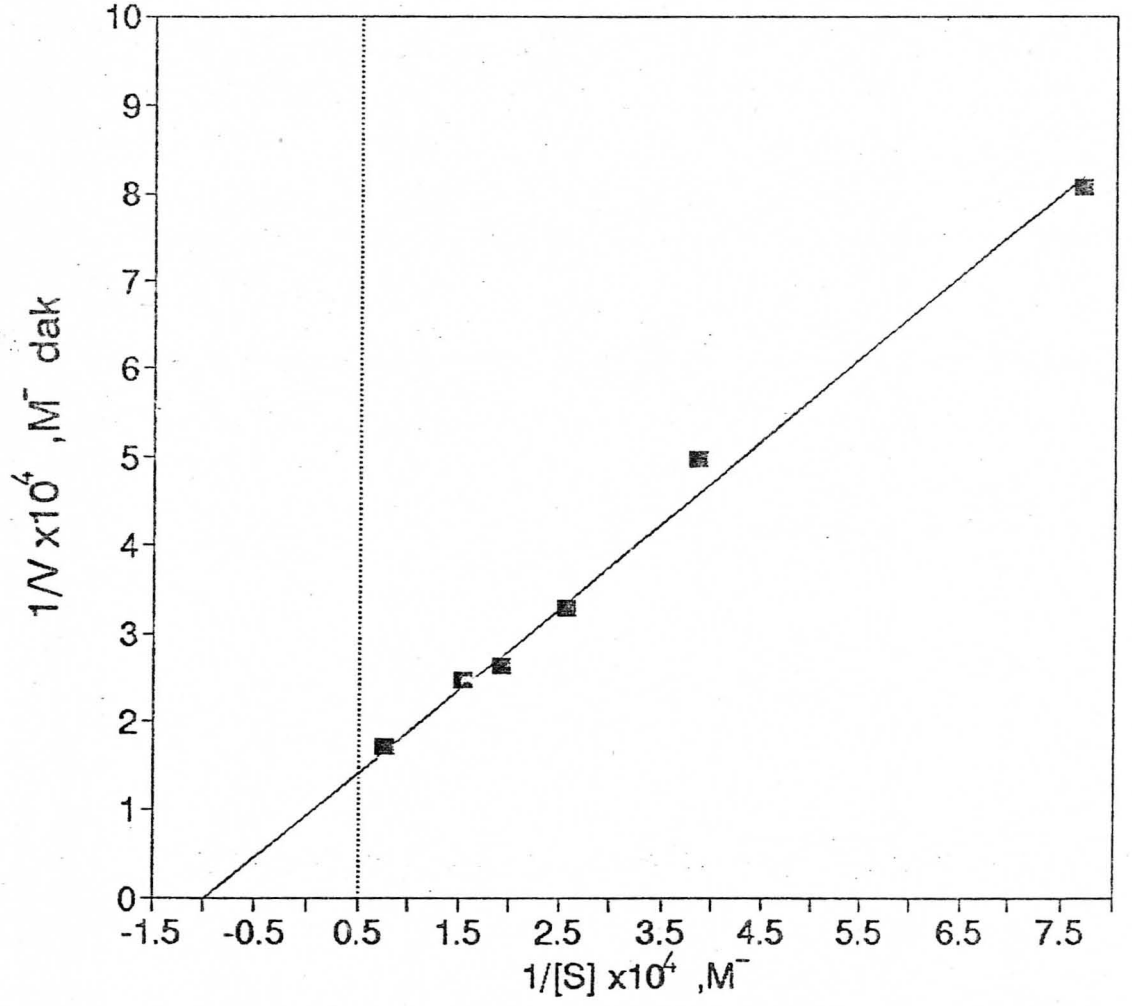
2.4. Metil Piridil Karbonatların C_2N_2 ile Muamele Edilmiş BCA II Enzimi ile Hidrolizi.

2.4.1. Materyal

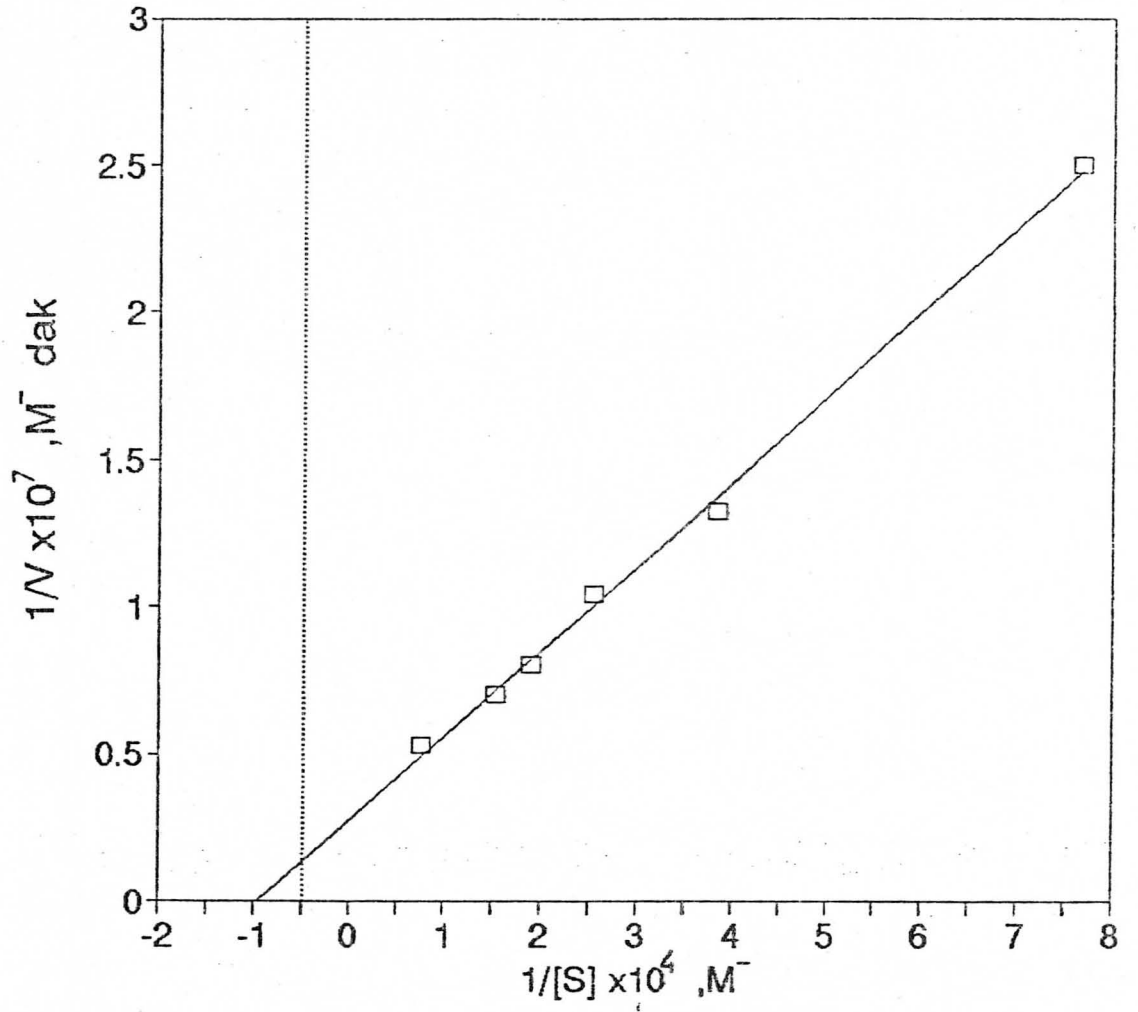
Metil 2-piridil karbonat (M2PC), metil 3-piridil karbonat (M3PC), metil 4-piridil karbonat (M4PC) bölüm 2.1'de anlatıldığı şekilde sentez edildi. Diğer reaktif ve aletler daha önce belirtilmişti.

2.4.2 Metod

Metil piridil karbonatların BCA II ile hidrolizi reaksiyonlarına ilişkin deneyler Pocker ve Guilbert (104,120) referans alınarak planlandı. Substitut



Şekil 2.6. BCA'nin p-NPA hidroliz aktivitesine ait Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 2.7. CBCA II'nin p-NPA hidroliz aktivitesine ait Lineweaver-Burk grafiği.

olmamış piridil karbonatlar divalent metal iyonları ile ilişki kurabilirler. Bu özellik bu moleküllerin bir çinko metaloenzimi olan karbonik anhidraz için uygun substrat olmasını sağlar.

Sığır karbonik anhidraz enzimi karbonik asidin diesterlerinin hidrolizi için oldukça etkin bir katalizördür. Mikromolar sığır karbonik anhidraz derişimleri 2- ve 3- metil piridil karbonatların hidroliz hızını tampon hızına göre 10 kattan daha fazla artırırken, metil 4-piridil karbonatın hidroliz hızını etkilemez.

Enzimin, C_2N_2 ile muameleden sonra estere karşı davranışında bir farklanma olup olmadığının saptanması amacıyla bu çalışmada M4PC de başlangıçta deney kapsamında düşünülmüştür.

Deney, uygun derişimdeki enzim çözeltisine hesaplanan miktarda esterin asetonitrildeki çözeltisi eklenerek absorbans değişiminin izlenmesi ile gerçekleştirildi. M2PC esterinin hidrolizi 294 nm'de 2-piridon absorbansının artması, M3PC esterinin hidrolizi 314 nm'de 3-piridolat absorbansının artması, M4PC esterinin hidrolizi ise 275 nm'de M4PC absorbansının azalması ile izlendi.

Düşük substrat derişimlerinde ($[S] \ll K_m$) birinci dereceden gözlenen hız sabiti, $k_{göz}$, $\ln [(A_\infty - A_0)/(A_\infty - A_t)]$ nin zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile incelendi. Bu grafik iki yarı ömür boyunca lineer olup A_∞ 10 yarı ömür sonunda okunan absorbans değeridir.

2.4.3. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin metil piridil karbonat hidroliz aktivitesinin incelenmesi.

BCA II bölüm 2.2'de anlatıldığı şekilde C_2N_2 ile muamele edildi.

M2PC'in substrat olarak kullanıldığı deneylerde substratın asetonitrildeki stok çözeltisinden 5 μ L alınarak pH 7,2 HEPES tamponunda hazırlanmış 1,25 mL enzim çözeltisine ilave edildi ve reaksiyon gidiş 294 nm'de her 4 dakikada bir 24 dakika boyunca absorbans ölçülerek izlendi. Küvetteki son enzim derişimi $6,8 \times 10^{-6}$ M, son substrat derişimi ise $5,0 \times 10^{-4}$ M'di. M3PC'nin substrat olarak kullanıldığı deneylerde substratın asetonitrildeki stok

çözeltisinden 5 μ L alınarak pH 7,2 HEPES tamponunda hazırlanmış 1,25 mL enzim çözeltisine ilave edildi ve reaksiyon gidişi 314 nm'de her 4 dakikada bir 32 dakika boyunca absorbands ölçülerek izlendi. Küvetteki son enzim derişimi $7,0 \times 10^{-6}$ M; son substrat derişimi ise $3,8 \times 10^{-4}$ M'dı.

M4PC'in substrat olarak kullanıldığı deneylerde substratın asetonitril-deki stok çözeltisinden 5 μ L alınarak pH 7,2 HEPES tamponunda hazırlanmış 1,25 mL enzim çözeltisine ilave edildi ve 275 nm'de absorbands değışimi izlenmeye çalışıldı. Ancak daha önce rapor edildiği şekilde (104) M4PC için kontrol enzimle hiçbir aktivite gözlenmedi. C_2N_2 ile muamele edilmiş enzim kullanıldığında da hiçbir davranış değışikliği gözlenmediği için M4PC bundan sonraki deneylerde çalışılmadı.

M2PC ve M3PC substratlarının kontrol ve C_2N_2 le muamele edilmiş enzimlerle hidrolizlerinin reaksiyonlarının $\ln [(A_\infty - A_0)/(A_\infty - A_t)]$ değerlerinin zamana karşı grafikleri şekil 2.8 ve 2.9'da görölmektedir.

Ek-1 de bahsedildiği şekilde hesaplanan inhibisyon değerleri ise aşağıda gösterilmiştir.

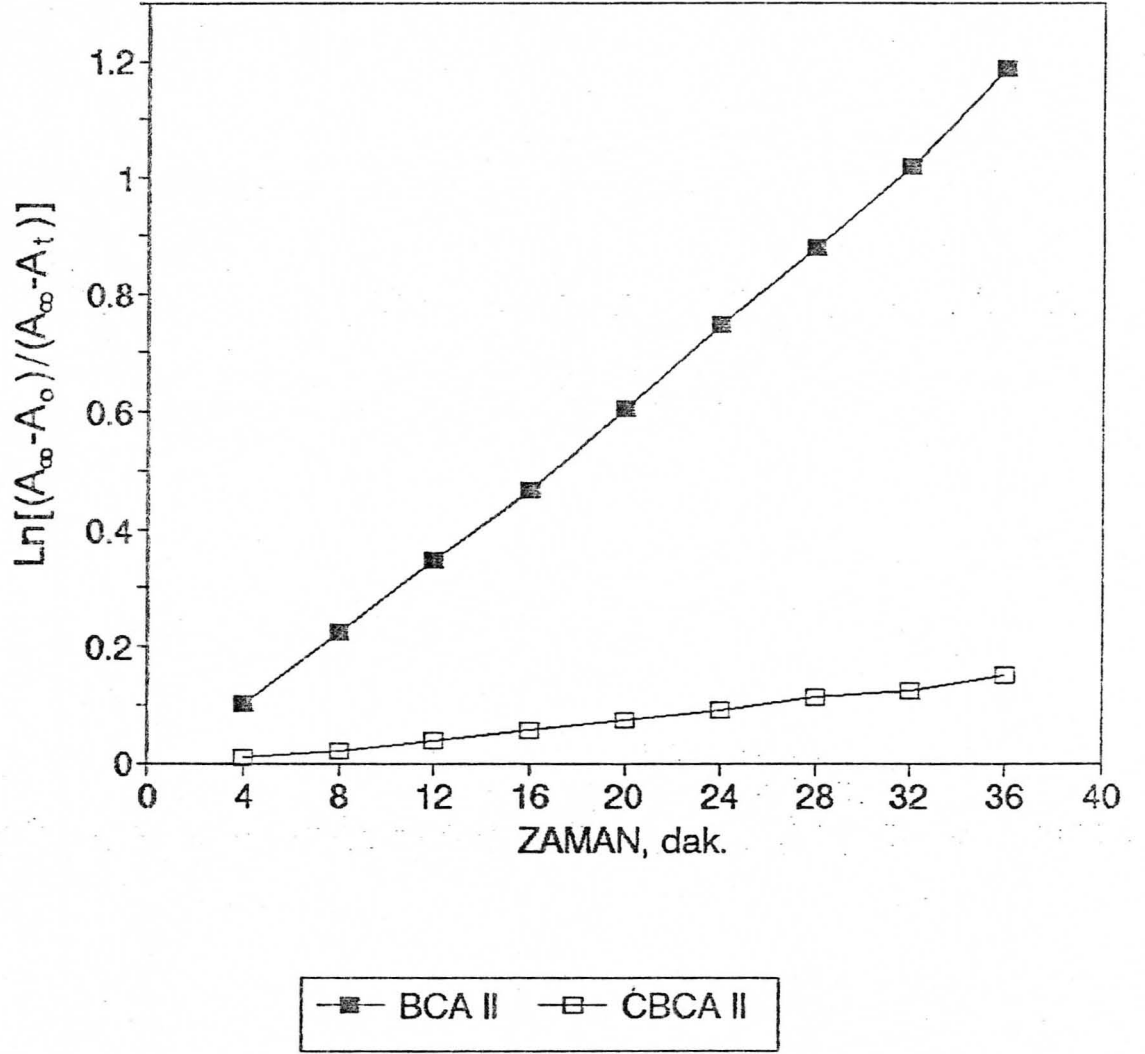
<u>Substrat</u>	<u>% İnhisyon</u>
M2PC	85
M3PC	99

2.4.4 Farklı C_2N_2 derişimlerinin BCA II metil piridil karbonat hidroliz aktivitesinin inhibisyonuna etkisi.

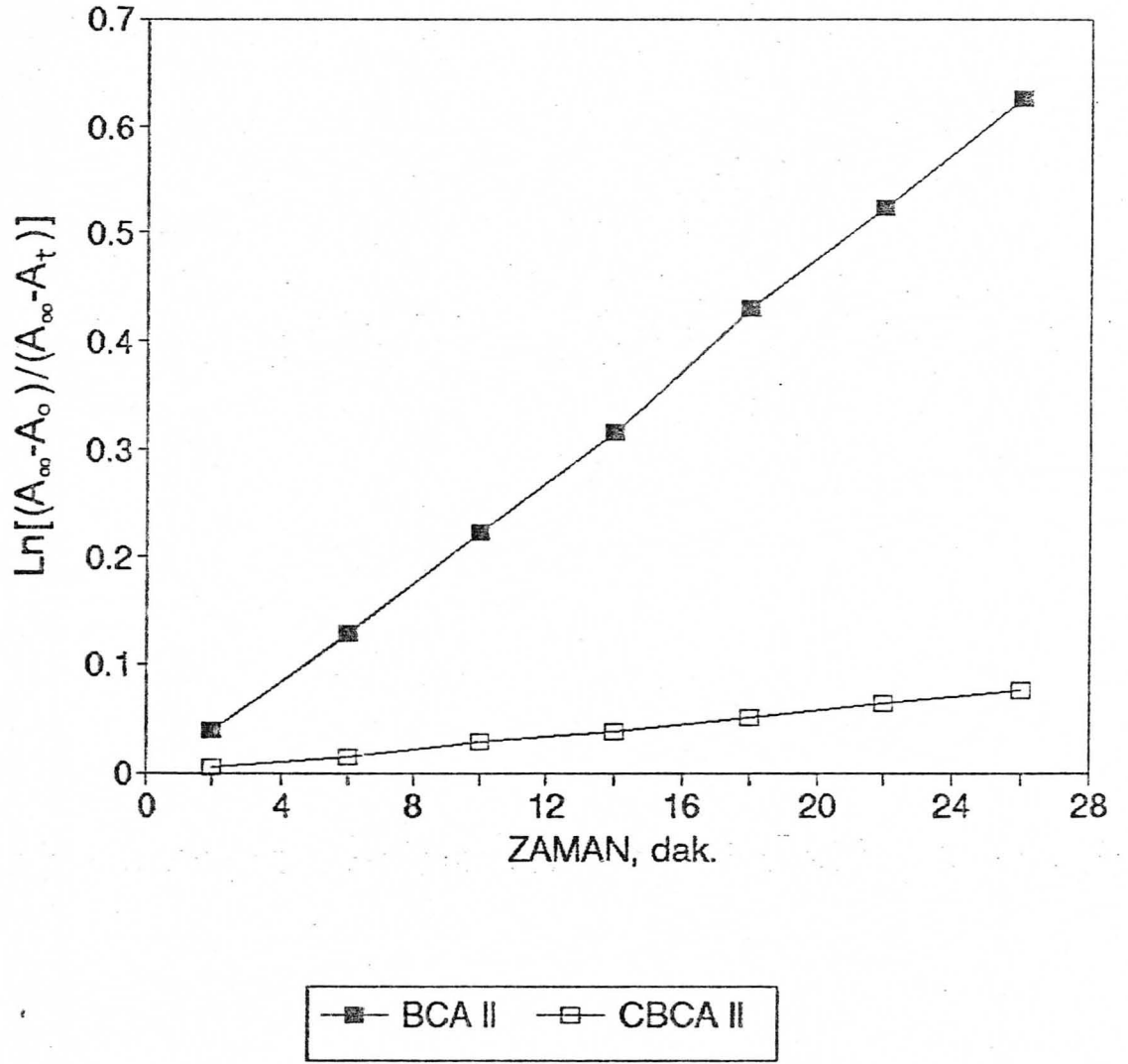
Enzim inhibisyonunun farklı C_2N_2 derişimlerine göre değışimi izlendi.

Enzim, bölüm 2.2'de bahsedilen şekilde C_2N_2 ile 120 dakika muamele edildi. Muamele sırasındaki C_2N_2 derişimi her seferinde değıştirilerek 0, $5,0 \times 10^{-4}$ M, $5,0 \times 10^{-3}$ M ve $5,0 \times 10^{-2}$ ve $5,0 \times 10^{-1}$ M'a ayarlandı. Muamele sırasındaki enzim derişimi $5,0 \times 10^{-5}$ M'dı.

Metil 2-piridil karbonat deneylerinde son enzim derişimi $8,2 \times 10^{-6}$ M; substrat derişimi ise $3,92 \times 10^{-4}$ M olarak ayarlandı.



Şekil 2.8. BCA II ve CBCA II'nin M2PC hidroliz aktivitesi.



Şekil 2.9. BCA II ve CBCA II'nin M3PC hidroliz aktivitesi

Metil 3-piridil karbonat deneylerinde son enzim derişimi $7,5 \times 10^{-6}$ M; son substrat derişimi ise $3,8 \times 10^{-4}$ M'di.

Farklı C_2N_2 derişimleri kullanılarak muamele edilen enzim çözeltilerinin her birinin M2PC ve M3PC substratlarına karşı aktivitesi uygun dalgaboyunda reaksiyon gidiş izlenerek saptandı. Kullanılan farklı C_2N_2 derişimlerinin neden olduğu % inhibisyon değerleri hesaplandı.

Çizelge 2.4'de M2PC ve M3PC substratları için kullanılan C_2N_2 miktarlarına karşı gözlenen % inhibisyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 2.4. Farklı C_2N_2 derişimleri ile inhibe edilen BCA II enzimin metil piridil karbonatları hidroliz aktivitesinin inhibisyonu.

$[C_2N_2]$ (M)	% İnhisyon (M2PC)	% İnhisyon (M3PC)
0	0	0
$5,0 \times 10^{-4}$	43	43
$5,0 \times 10^{-3}$	49	83
$5,0 \times 10^{-2}$	86	99
$1,0 \times 10^{-1}$	86	99

2.4.5. BCA II enziminin metil piridil karbonatları hidroliz aktivitesinin C_2N_2 ile inhibisyonuna muamele süresinin etkisi.

BCA II enziminin C_2N_2 ile modifikasyonu zamana göre incelendi.

M2PC substratı için $5,0 \times 10^{-5}$ M BCA II enzim çözeltisi $5,0 \times 10^{-2}$ M C_2N_2 ile 5, 15, 120 dakika muamele edildi. Onbeş dakika sonunda maksimum inhibisyona ulaşıldığı için diğer substratlara uygulanan 25 ve 90 dakika inkübasyon çalışmaları gereksiz bulundu. Deneyler sırasındaki son enzim derişimi $7,1 \times 10^{-6}$ M; son M2PC derişimi $3,8 \times 10^{-4}$ M'di.

M3PC substratı için $5,0 \times 10^{-5}$ M BCA II enzim çözeltisi $5,0 \times 10^{-2}$ M C_2N_2 ile 5, 15, 25, 90, 120 dakika muamele edildi. Son enzim derişimi $7,1 \times 10^{-6}$ M; son substrat derişimi ise $3,8 \times 10^{-4}$ M olarak hesaplandı.

Belirtilen süre muamele edilen enzim çözeltisinden azot geçirilerek C_2N_2 uzaklaştırıldı ve muhtemel C_2N_2 kalıntılarının etkisini önlemek için aktivite hiç vakit kaybetmeden ölçüldü.

Her muamele süresi sonunda elde edilen aktivite değerleri dikkate alınarak % inhibisyon değerleri hesaplandı. Çizelge 2.5'de C_2N_2 ile muamele süresine bağlı olarak ölçülen % inhibisyon değerleri görülmektedir.

Çizelge 2.5 C_2N_2 ile muamele süresine bağlı olarak BCA II enziminin metil piridil karbonatları hidroliz aktivitesinde gözlenen inhibisyon.

<u>t (min)</u>	<u>% İnhisyon (M2PC)</u>	<u>% İnhisyon (M3PC)</u>
0	0	0
5	83	55
15	85	73
25	85	93
90	85	97
120	85	99

2.4.6. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II ile katalizlenen metil piridil karbonatların hidroliz reaksiyonlarının kinetik parametrelerinin tayini.

Kinetik parametrelerin tayini için Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanıldı.

M2PC reaksiyonlarının kinetik parametrelerinin tayini için $1,4 \times 10^{-4}$ $6,4 \times 10^{-4}$ M arasında 4 substrat derişimi ile çalışıldı. Küvetteki son enzim derişimi $7,6 \times 10^{-6}$ M'di.

M3PC reaksiyonlarının kinetik parametrelerinin tayini için $6,0 \times 10^{-2}$ M $1,0 \times 10^{-2}$ M arasında 4 substrat derişimi ile çalışıldı. Küvetteki son enzim derişimi $3,4 \times 10^{-6}$ M'di.

Kullanılan her farklı substrat derişimine karşı gelen reaksiyon ilk hızı hesaplanarak Lineweaver-Burk grafiğinden kinetik parametreler okundu.

Aşağıda inhibe olmuş ve kontrol enzimlerle katalizlenen reaksiyonlara ait K_2 ve V_{max} değerleri verilmiştir.

Şekil 2.10 ve 2.11'de M2PC ve M3PC substratlarına ait Lineweaver-Burk grafikleri görülmektedir.

Substrat	Enzim	V_{max} (M/dak)	K_m (M)
M2PC	BCA II	$3,80 \times 10^{-6}$	$6,3 \times 10^{-4}$
	CBCA II	$1,98 \times 10^{-7}$	$6,9 \times 10^{-4}$
M3PC	BCA II	$2,8 \times 10^{-5}$	6,06
	CBCA II	$2,9 \times 10^{-7}$	$3,60 \times 10^{-1}$

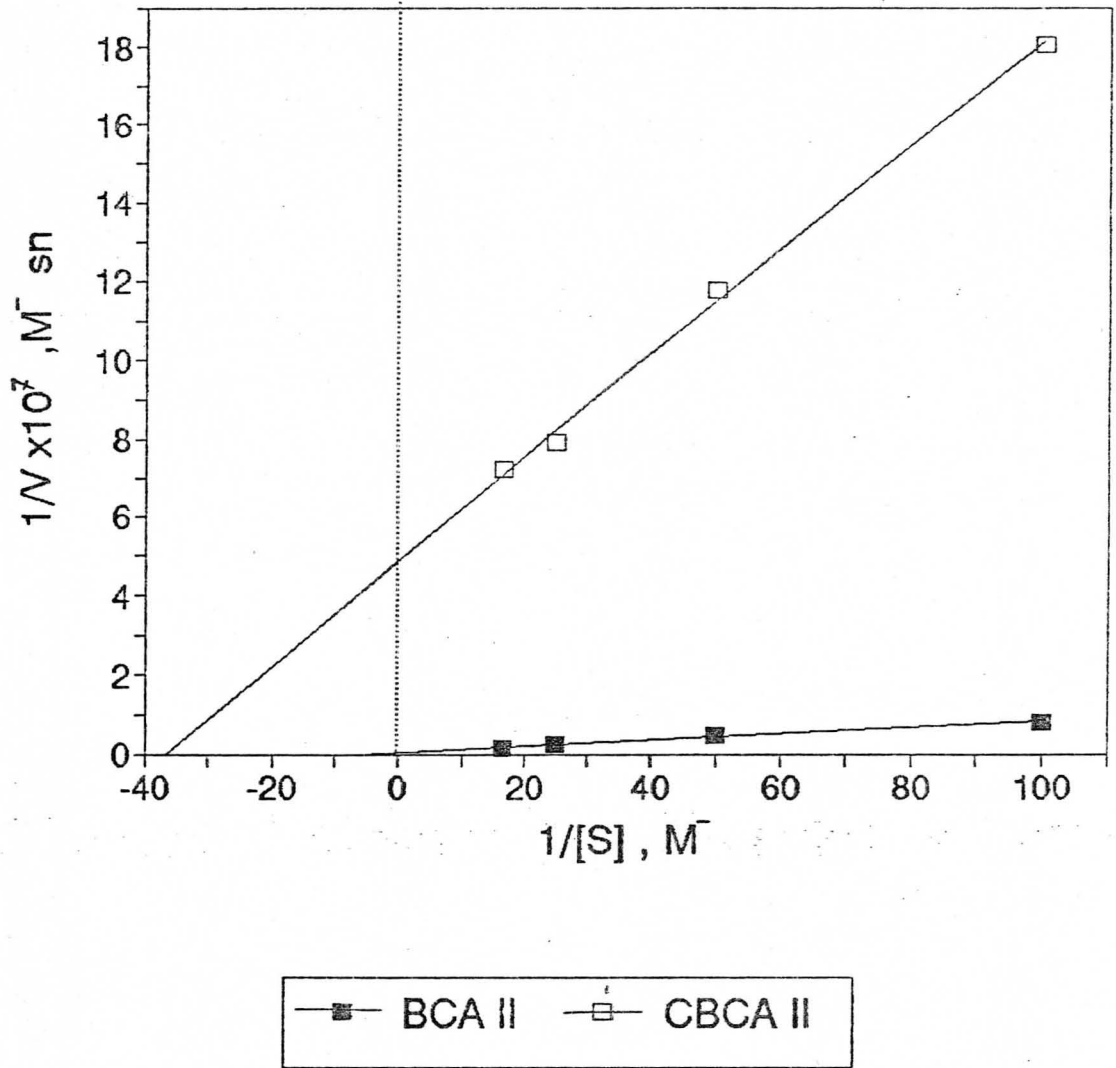
2.4.7. C_2N_2 ile kısmen modifiye olmuş BCA II enziminin M3PC hidroliz aktivitesine ait kinetik parametrelerin tayini

Kısmen modifiye olmuş BCA II enziminin M3PC hidroliz aktivitesine ait kinetik parametrelerin tayini için enzim önce $5,08 \times 10^{-4}$ M C_2N_2 ile standart yöntem kullanılarak modifiye edildi. Bölüm 2.4.4.'de anlatıldığı şekilde bu derişimdeki C_2N_2 enzimin M3PC hidroliz aktivitesinde %43'lük inhibisyona neden olmaktadır. Bu kısmen modifiye olmuş enzim çözeltisi kullanılarak hidroliz reaksiyonları tekrarlandı. Reaksiyonlar sırasındaki son enzim derişimi $3,4 \times 10^{-6}$ M; substrat derişimleri ise $6,0 \times 10^{-2}$ - $1,0 \times 10^{-2}$ M arasında tutuldu. Şekil 2.12'de bu reaksiyonlara ait $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri ile çizilen Lineweaver-Burk grafiği görülmektedir. Bu grafikten okunan K_m değeri $9,4 \times 10^{-2}$ (M); V_{max} değeri ise $1,0 \times 10^{-5}$ M sn^{-1} 'dir.

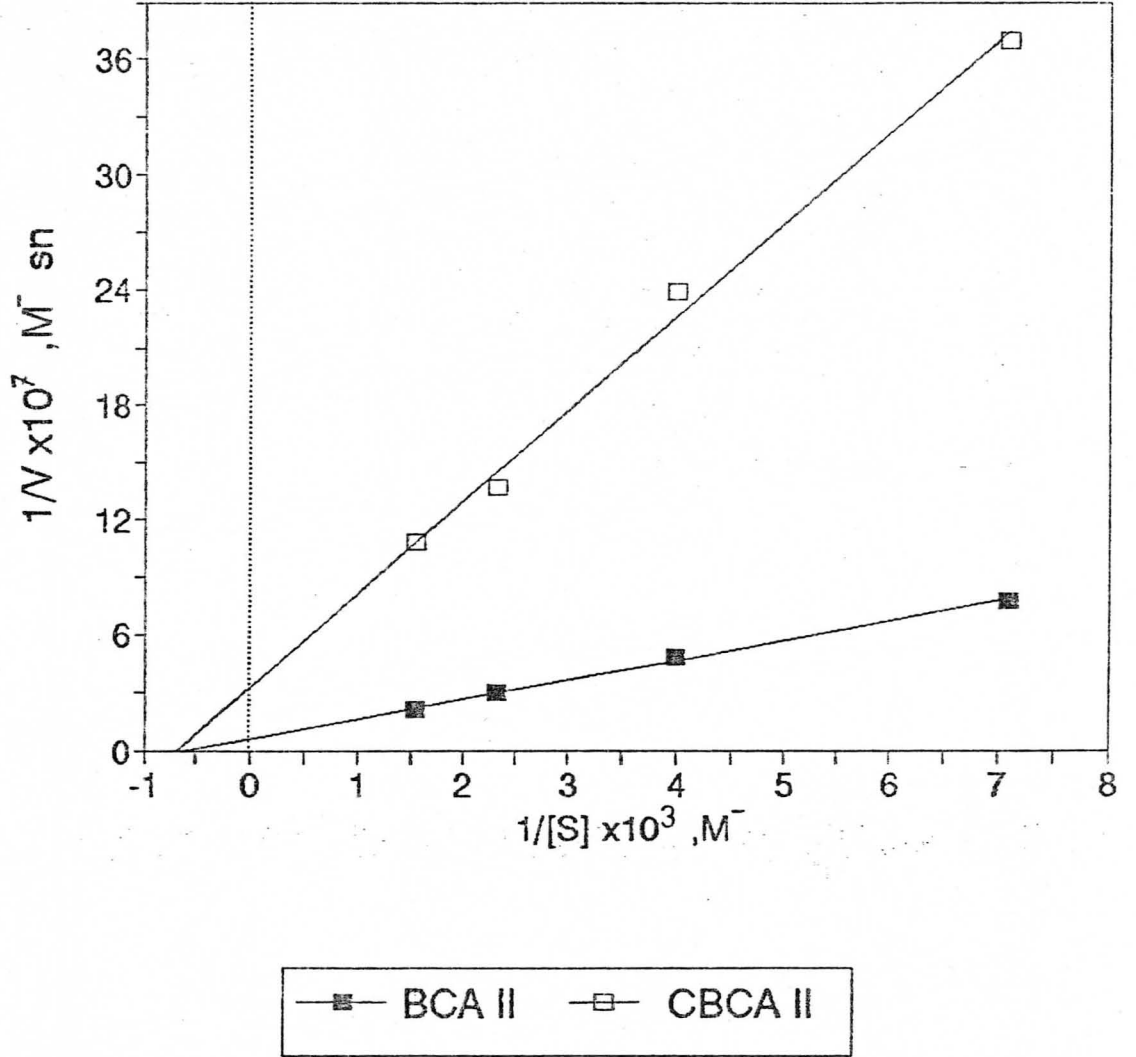
2.5. Bazı Aldehitlerin C_2N_2 ile Muamele edilmiş BCA II Enzimi ile Hidrasyonu

2.5.1. Materyal

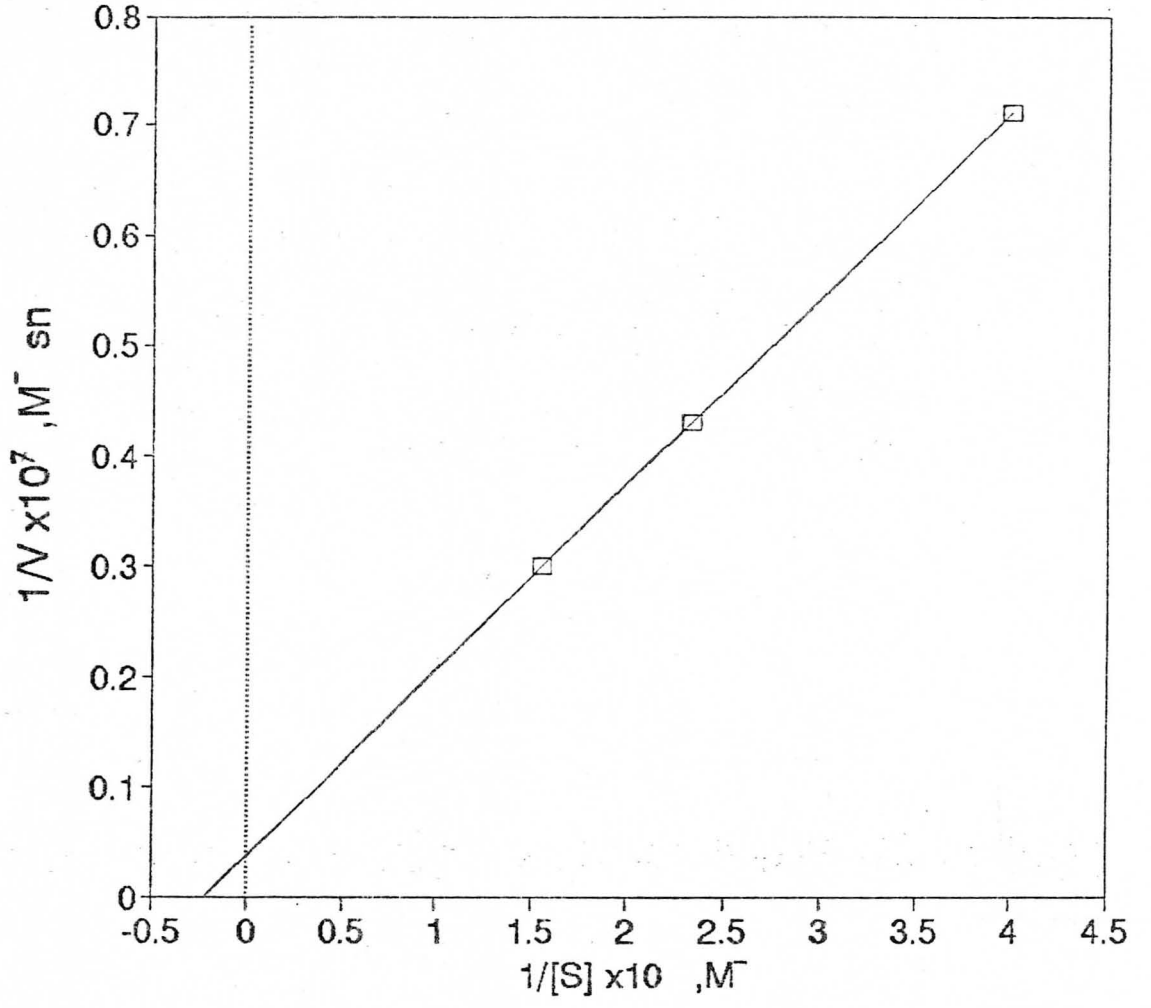
Asetalaldehit Aldrich'ten; 2-piridinkarboksialdehit(2-PA), 3-piridin karboksialdehit(3-PA), 4-piridin karboksialdehit(4-PA), dietil molonikasit Sigma'



Şekil 2.10. BCA II ve CBCA II'nin M2PC hidroliz aktivitesine ait Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 2.11. BCA II ve CBCA II'nin M3PC hidroliz aktivitesine ait Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 2.12. Kısmen modifiye olmuş BCA II'nin Lineweaver-Burk grafiği

dan temin edildi. KH_2PO_4 ve Na_2HPO_2 Fisher'den temin edildi. Diğer reaktif ve aletler daha önce belirtilmişti.

2.5.2. Metod

Karbonik anhidraz asetaldehit'in (85) ve bazı diğer karbonil bileşiklerinin (86,87) hidrasyonunu etkili ve geri dönüşümlü olarak katalizler.

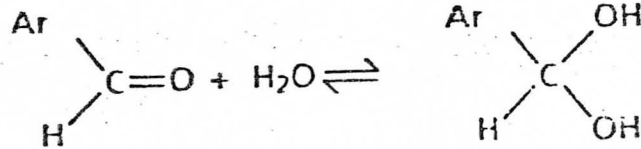
Asetaldehitin hidrasyon reaksiyonu:



genel asit , genel bazla katalizlenir ve hassas hız dadasının elde edilmesi için gerekli deneysel teknikler CO_2 'in geridönüşümlü hidrasyonu çalışmalarından çok daha basittir. Asetaldehitin çözünürlük özellikleri ve molar absorpsiyon katsayısı, tampon çözeltiye uygun miktarda ölçülmüş substratın katılması ile hassas spektrofotometrik ölçümlerin alınmasına imkan verir.

Asetaldehit 278 nm'de absorpsiyon yapar. Reaksiyonlar 278 nm'de absorpsiyon azalmasının ölçülmesi ile izlendi.

Diğer karbonil bileşiklerinin hidrasyonunun incelenmesi için substrat olarak 2-PA, 3-PA ve 4-PA seçildi. BCA II bu bileşiklerin hidrasyonunu



denklemini gereğince katalizler.

Piridinkarboksialdehitlerin hidrasyonu kinetiği asetaldehitinkine benzer özellik gösterir. Ancak, piridinkarboksialdehitlerin BCA II ile katalizlenen hidrasyonu asetaldehitinkinden çok daha hızlı ilerler.

2-PA ve 3-PA 305 nm'de; 4-PA ise 320 nm'de absorpsiyon verirler. Reaksiyonlar 2-PA ve 3-PA için 305 nm'de; 4-PA için ise 320 nm'de absorpsiyon azalmasının ölçülmesi ile izlendi.

Aldehitlerin BCA II ile katalizlenmiş hidrasyonu reaksiyonlarında HEPES tampon çözeltisinin fazla hidrasyona neden olması nedeniyle uygun olmadığı saptandığından asetaldehitin reaksiyonlarında pH 7,2 (0,002 M) fosfat tampon çözeltisi, piridinkarboksialdehit reaksiyonlarında ise pH 7,2 (0,01 M) dietilmalonat tampon çözeltisi kullanıldı. Bu tampon çözeltiler Perrin'e (121) göre hazırlandı.

Aldehitler kullanılmadan önce oksidasyon ürünlerini uzaklaştırmak için kısa bir distilasyon kolonundan azot altında 2 kez distillendikten sonra, yeni oksidasyon ürünlerinin oluşumuna izin vermemek için, vakit geçirilmeden kullanıldı. Buharlaşmayı önlemek için aldehitin bulunduğu kap buz içinde saklandı ve yine buzla soğutulmuş Hamilton şırıngası kullanılarak uygun miktarlar enzim çözeltisine aktarıldı.

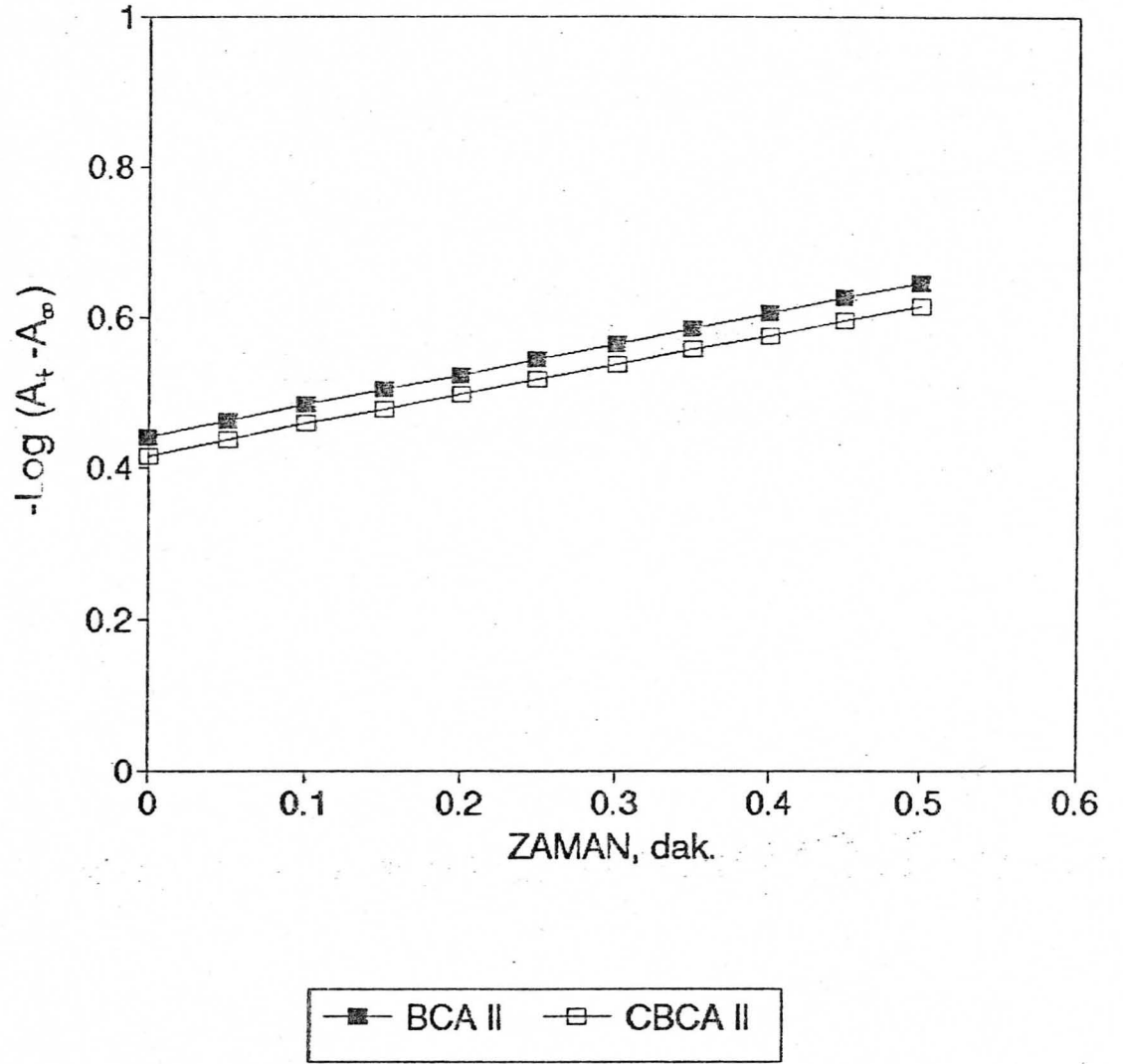
Sonuçların değerlendirilmesinde zamana karşı $\log (A_t - A_\infty)$ grafiği kullanıldı. Bu grafik ilk iki yarı ömür için linear olup $k_{göz} = 2,303x$ eğim'dir. Reaksiyon geri dönüşümlü olduğu için $k_{göz}$ gerçekte ileri reaksiyonun hız sabiti k_f ile geri reaksiyonun hız sabiti k_r 'nin toplamına eşittir.

2.5.3. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin asetaldehit ve piridinkarboksialdehit hidrasyon aktivitesinin incelenmesi.

BCA II bölüm 2.2 de anlatıldığı şekilde C_2N_2 ile muamele edildi.

Asetaldehitin substrat olarak kullanıldığı deneylerde 2 μ L asetaldehit pH 7,2 (0,002 M) fosfat tamponundaki enzim çözeltisinin 1 mL'sine eklendi. Absorbans azalması 278 nm'de 1 dakika boyunca her 0,05 dakikada bir ölçüldü. Küvetteki son enzim derişimi $1,6 \times 10^{-7}$ M, son substrat derişimi ise $3,65 \times 10^{-2}$ M'di.

Asetaldehitin C_2N_2 ile muamele edilmiş ve edilmemiş BCA II ile katalizlenen hidrasyon reaksiyonlarına ait tipik bir grafik Şekil 2.13'de görülmektedir. A_∞ 10 yarı ömür sonunda ölçülen absorbans değeridir.



Şekil 2.13. BCA II ve CBCA II'nin CH_3CHO hidrasyon aktivitesi

Şekil 2.13'den de görülebileceği gibi C_2N_2 ile muamele edilmiş ve edilmemiş BCA II ile katalizlenen asetaldehitin hidrasyon reaksiyonları arasında aktivite bakımından bir fark yoktur.

2-PA, 3-PA ve 4-PA'in substrat olarak kullanıldığı reaksiyonlarda 0,5 μ L saflaştırılmış substrat dietilmalonat tamponu içindeki 1 mL enzim çözeltisine eklendi ve absorban azalması, kullanılan substrata göre, uygun dalga boyunda izlendi. Küvetteki son enzim derişimi $4,5 \times 10^{-6}$ M, son substrat derişimleri sırasıyla $5,6 \times 10^{-3}$ M, $6,5 \times 10^{-3}$ M, $7,0 \times 10^{-3}$ M'di.

2-PA, 3-PA ve 4-PA'in C_2N_2 ile muamele edilmiş ve edilmemiş BCA II ile katalizlenen hidrasyon reaksiyonlarına ait tipik grafikler Şekil 2.14, 2.15 ve 2.16'da görülmektedir.

Şekillerden de görülebileceği gibi C_2N_2 ile muamele edilmiş ve edilmemiş BCA II ile katalizlenen 2-PA, 3-PA ve 4-PA'lerin hidrasyon reaksiyonlarında aktivite bakımından çok az fark vardır. Hesaplamalar sonunda elde edilen inhibisyon değerleri 2-PA için %8, 3-PA için % 8, 4-PA için % 9'dur.

C_2N_2 ile modifiye olmuş BCA II'nin aldehit hidrasyon aktivitelerinin inhibisyonu ya 0, ya da çok düşük değerlerde olduğu için C_2N_2 modifikasyonu-na derişimin ve muamele süresinin etkisi ve kinetik parametrelerin derişimi incelenmedi.

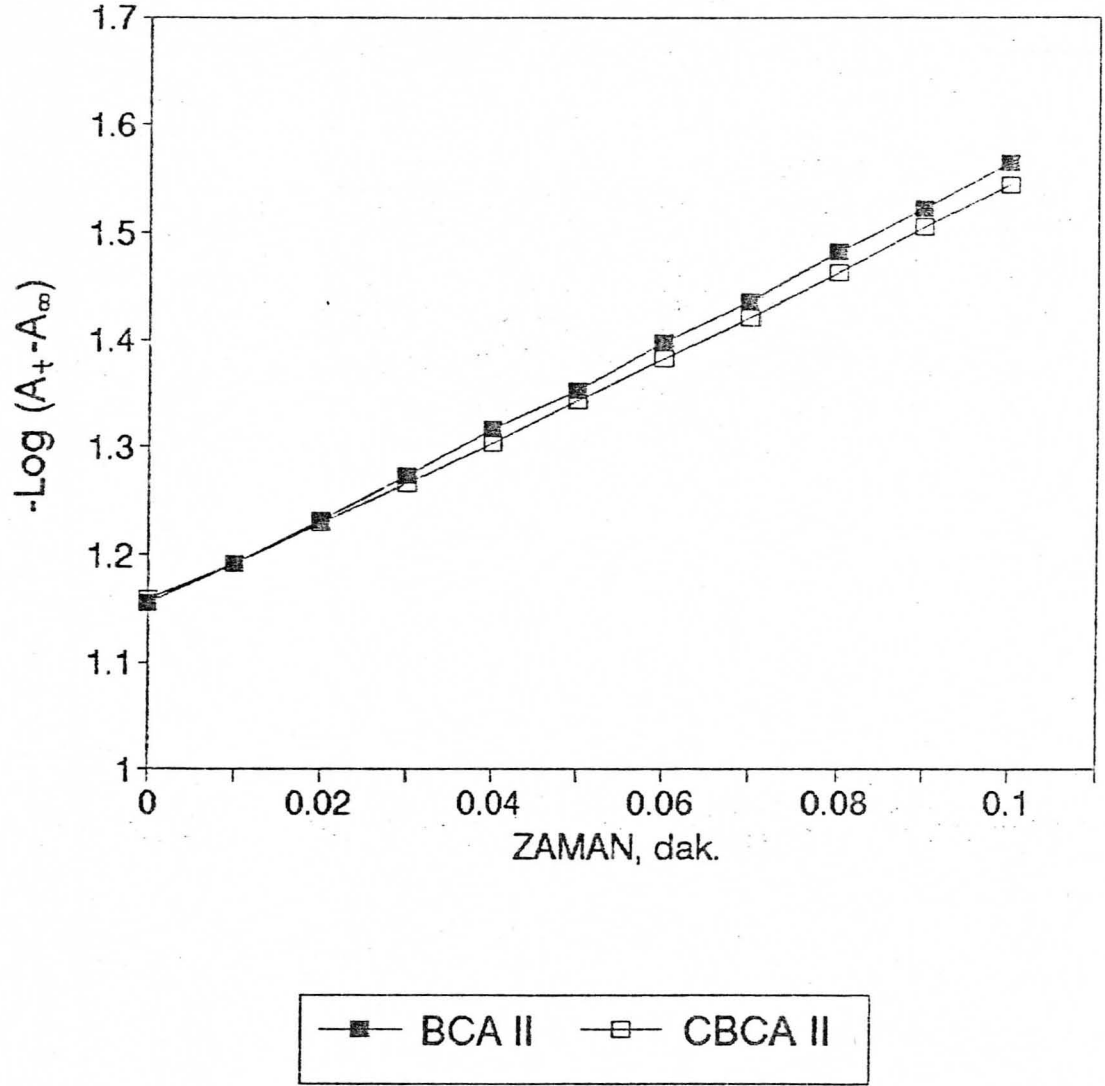
2.6. 2-Hidroksi-5-Nitro-Toluen Sulfonikası Salton'un C_2N_2 ile Muamele Edilmiş BCA II Enzimi ile Hidrolizi

2.6.1 Materyal

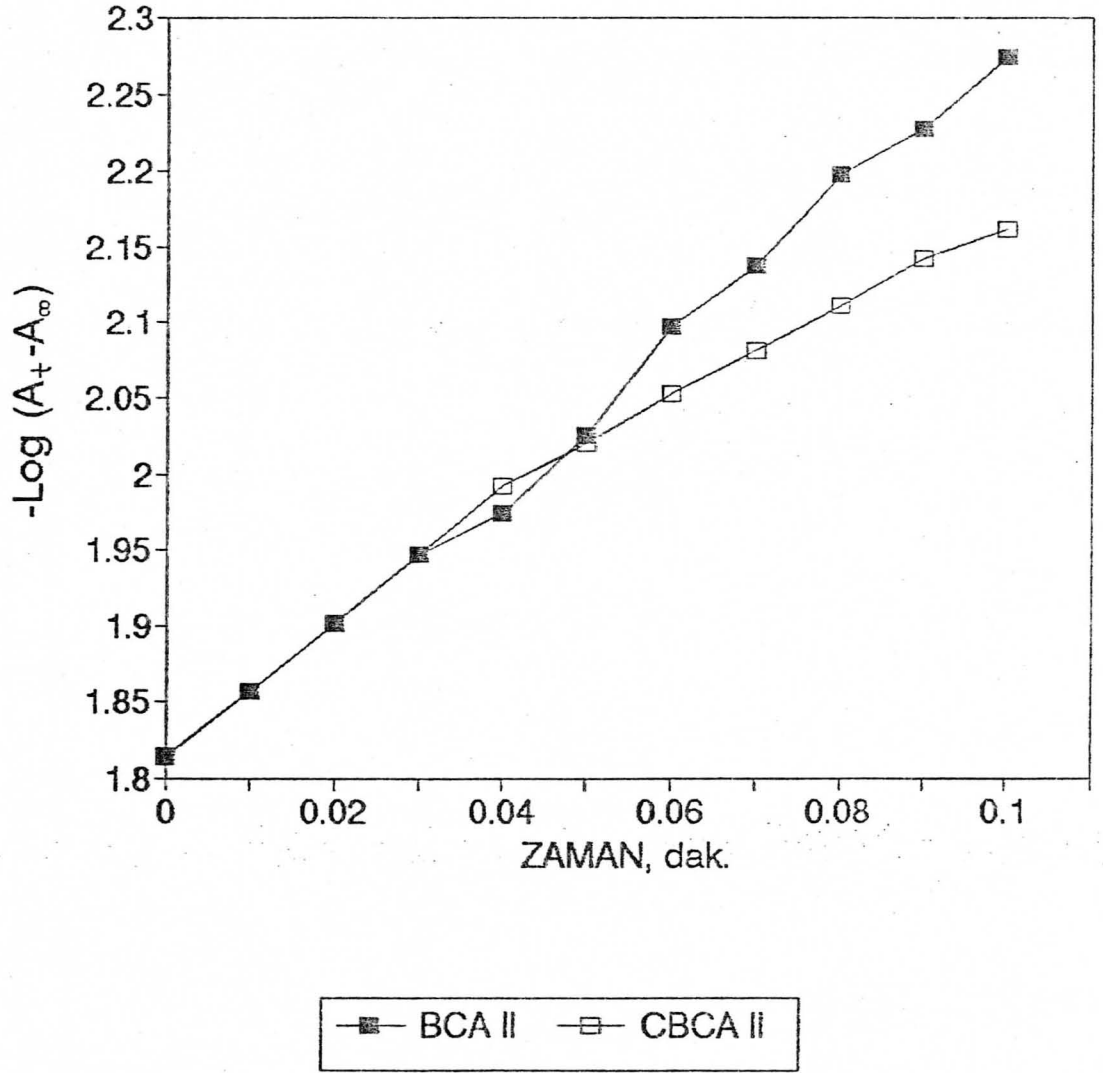
2-Hidroksi-5nitro- α - toluensulfonikası salton (HNTSA) bölüm 2.1'de anlatıldığı şekilde sentezlendi. Diğer reaktif ve aletler daha önce belirtilmişti.

2.6.2. Metod

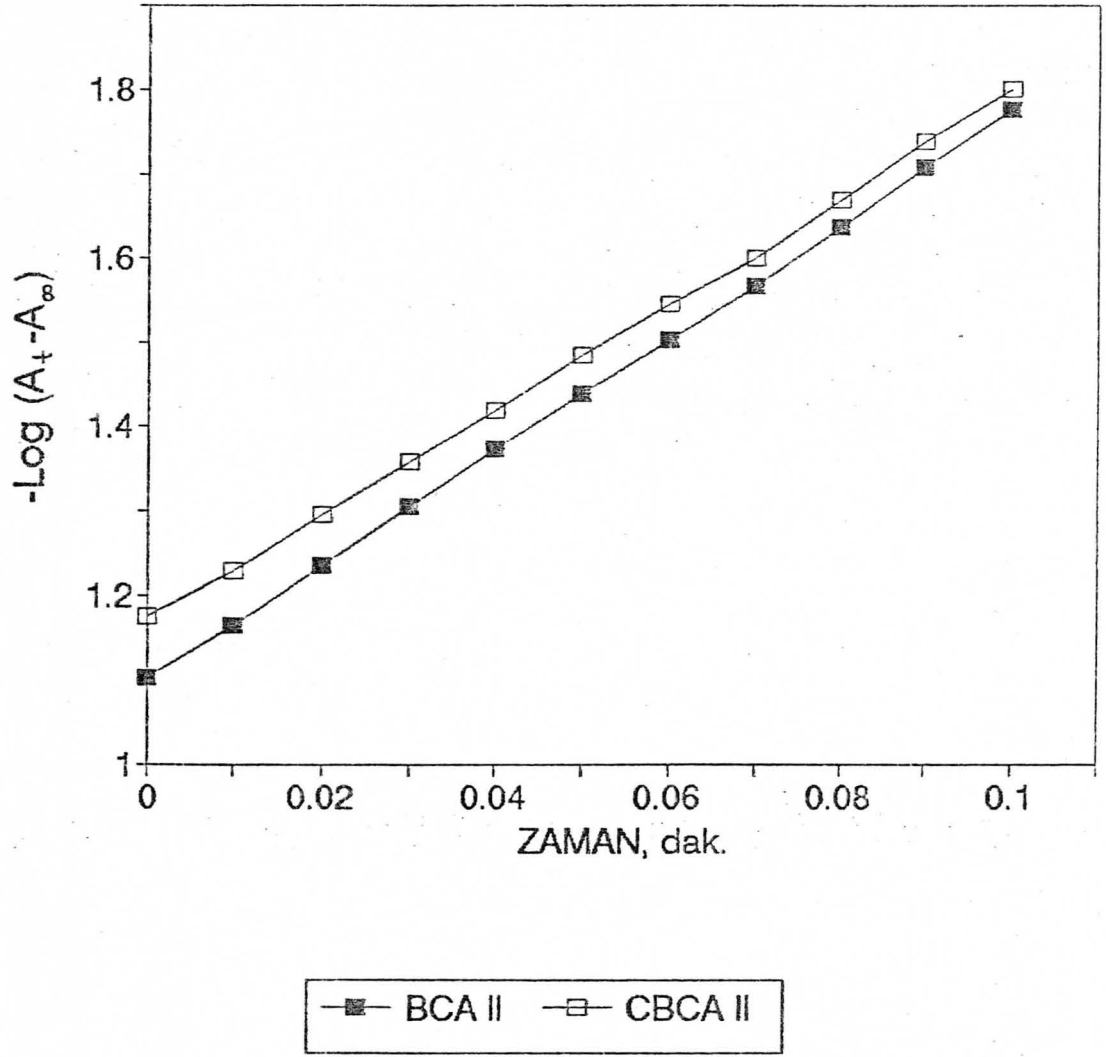
HNTSA'un BCA II enzimi için substrat olarak kullanıldığı deneyler Kaiser ve Lo'nun (102) çalışmaları referans alınarak planlandı.



Şekil 2.14. BCA II ve CBCA II'nin 2-PA hidrasyon aktivitesi

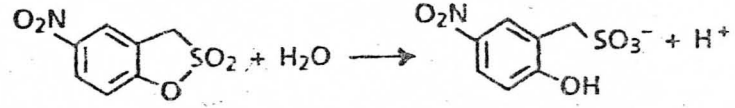


Şekil 2.15. BCA II ve CBCA II'nin 3-PA hidrasyon aktivitesi



Şekil 2.16. BCA II ve CBCA II'nin 4-PA hidrasyon aktivitesi

Karbonik anhidraz bu siklik sulfonatu yüksek etkinlikle hidroliz eder.



HNTSA'nun hidrolizi fenolat anyonunun 410 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesi ile izlendi.

Bu substratın HEPES tamponu ile hidrolizi çok zayıf olduğundan tampon olarak pH 7,2 (50 mM) HEPES çözeltisi kullanıldı.

2.6.3. C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin HNTSA hidroliz aktivitesinin incelenmesi

BCA II bölüm 2.2'de anlatıldığı şekilde C_2N_2 ile muamele edildi.

HNTSA'un asetonitrildeki stok çözeltisi $2,5 \times 10^{-3}$ M olarak hazırlandı. Bu çözeltinin 10 μL si 1 mL enzim çözeltisine ilave edilerek 410 nm'deki absorbans artışı ölçüldü. Küvetteki son substrat derişimi $2,5 \times 10^{-5}$ M, son enzim derişimi ise $2,96 \times 10^{-7}$ M'di.

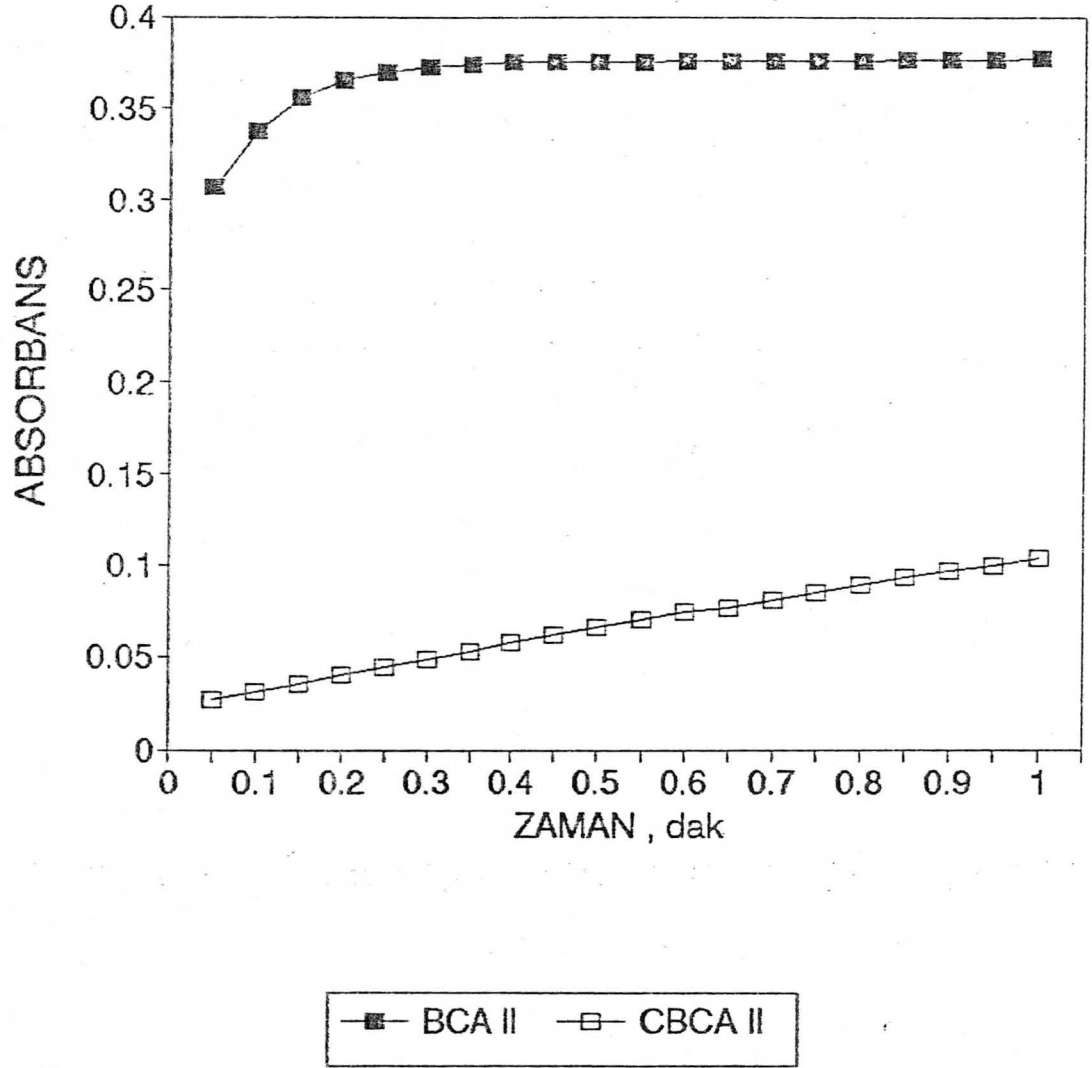
Şekil 2.17'de C_2N_2 ile muamele edilmiş ve edilmemiş BCA II'nin HNTSA' un hidrolizi reaksiyonuna ait tipik absorbans değişimleri görölmektedir.

İlk hızların hesaplanması sonucu C_2N_2 ile muamele edilmiş enzimin HNTSA hidroliz aktivitesinin % 86 inhibe edildiği görüldü.

2.6.4. Farklı C_2N_2 derişimlerinin BCA II'nin HNTSA hidroliz aktivitesinin inhibisyonuna etkisi

Enzim inhibisyonunun farklı C_2N_2 derişimlerine göre değişimi izlendi.

Enzim, bölüm 2.2'de anlatıldığı şekilde C_2N_2 ile 120 dakika muamele edildi. İşlem sırasındaki C_2N_2 derişimi her seferinde değiştirilerek 0, $5,0 \times 10^{-4}$ M, $5,0 \times 10^{-3}$ M, $5,0 \times 10^{-2}$ M, $1,0 \times 10^{-1}$ M olmak üzere 5 farklı enzim çözeltisi hazırlandı. Bu işlemler sırasındaki enzim derişimi $5,0 \times 10^{-5}$ M'di.



Şekil 2.17. BCA II ve CBCA II'nin HNTSA hidroliz aktivitesi

Bu farklı enzim çözeltilerinin HNTSA'un hidroliz reaksiyonunu katalizlemesi bölüm 2.6.3'de anlatıldığı şekilde izlendi. Deneyler sırasındaki son enzim derişimi $3,43 \times 10^{-7}$ M; son substrat derişimi ise $2,5 \times 10^{-5}$ M'di.

Çizelge 2.6'da HNTSA substratı için, kullanılan C_2N_2 miktarlarına karşı gözlenen % inhibisyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 2.6 farklı C_2N_2 derişimleri ile muamele edilen BCA II'nin HNTSA hidroliz aktivitesinin inhibisyonu.

$[C_2N_2]$ (M)	% İnhibisyon
0	0
$5,0 \times 10^{-4}$	46
$5,0 \times 10^{-3}$	70
$5,0 \times 10^{-2}$	86
$5,0 \times 10^{-1}$	86

2.6.5. BCA II enziminini HNTSA hidroliz aktivitesinin C_2N_2 ile inhibisyonuna muamele süresinin etkisi.

BCA II enziminin HNTSA hidroliz aktivitesinin C_2N_2 ile inhibisyonuna muamele süresinin etkisinin incelenmesi için enzim bölüm 2.2'de anlatıldığı şekilde C_2N_2 ile muamele edildi. Muamele süresi her seferinde farklı tutularak 5, 15, 25, 90 ve 120 dakikalara ayarlandı. Bu sürelerin sonunda enzim çözeltisinden azot geçirilerek C_2N_2 uzaklaştırıldı ve muhtemel C_2N_2 kalıntılarının etkisini önlemek için enzim çözeltisi hiç vakit kaybetmeden kullanıldı. Bu reaksiyonlar sırasında son enzim derişimi $3,0 \times 10^{-7}$ M; son substrat derişimi ise $2,5 \times 10^{-5}$ M idi.

Her muamele süresi sonunda elde edilen aktivite değerleri dikkate alınarak inhibisyon yüzdesi hesaplandı.

Çizelge 2.7'de C_2N_2 ile muamele süresine bağlı olarak elde edilen inhibisyon değerleri görülmektedir.

Çizelge 2.7. BCA II enziminin HNTSA hidroliz aktivitesinin inhibisyonuna muamele süresinin etkisi.

<u>t (dak)</u>	<u>% İnhibisyon</u>
0	0
5	36
15	75
25	76
90	78
120	86

2.6.6. C₂N₂ ile muamele edilmiş BCA II ile katalizlenen HNTSA hidroliz reaksiyonunun kinetik parametrelerinin tayini.

Kinetik parametrelerinin tayini için Lineweaver- Burk grafiğinden yararlanıldı.

HNTSA'un kinetik parametrelerinin tayini için substrat derişimleri $1,99 \times 10^{-4}$ - $7,96 \times 10^{-4}$ M arasında seçildi. Küvetteki son enzim derişimi $3,42 \times 10^{-7}$ M idi. Substratın asetonitrildeki çözeltisi küvetteki 1 mL enzim çözeltisine eklenerek ürün oluşumu 410 nm'de absorbans artışı şeklinde gözlemlendi. Her substrat derişimine karşı gelen ilk hız değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafiği hazırlandı. Şekil.2.18'de bu grafik görülmektedir.

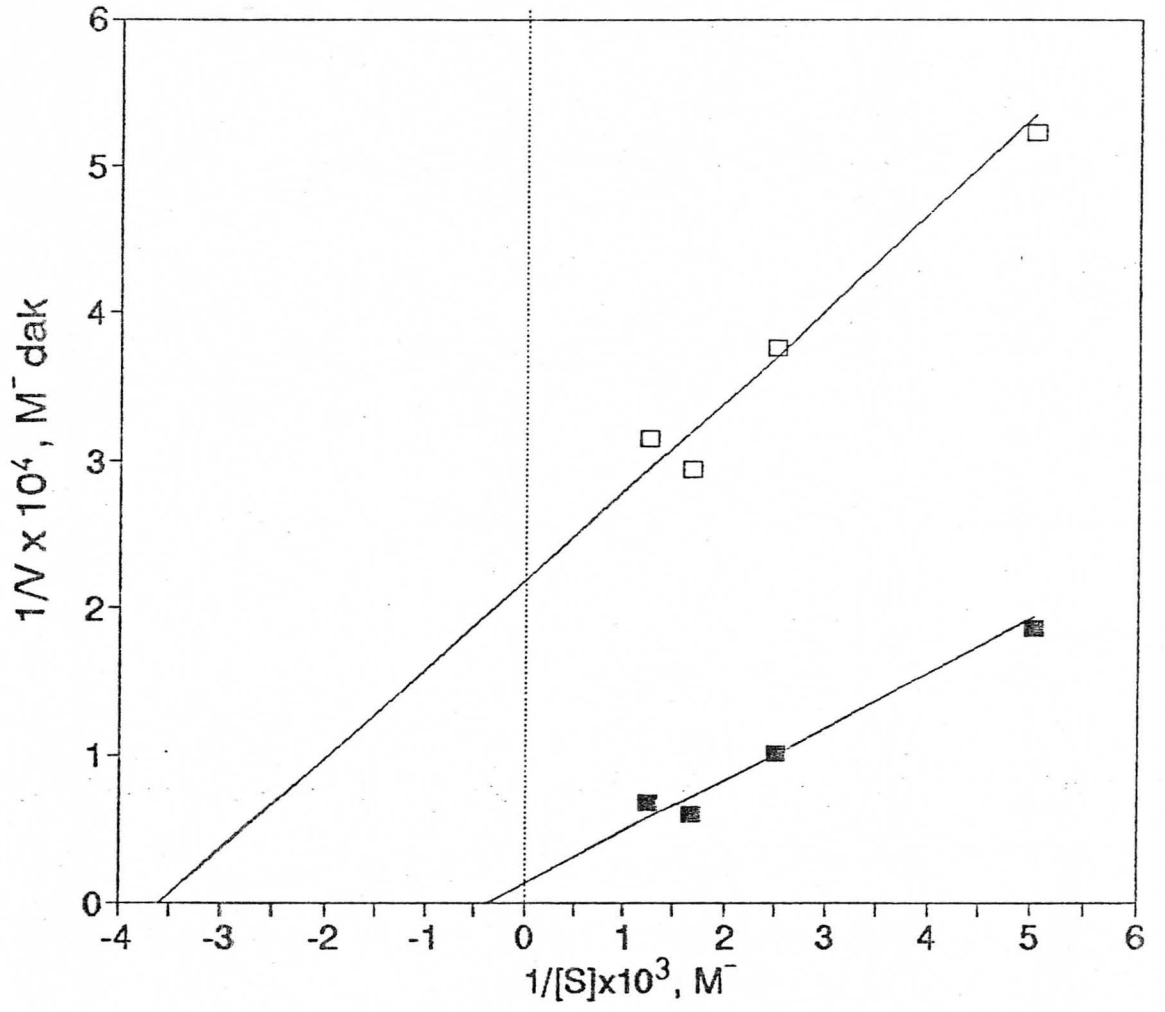
Bu grafikten yararlanarak hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri aşağıdadır.

<u>Enzim</u>	<u>K_m (M)</u>	<u>V_{max} (M/dak)</u>
BCA II	2,85	$8,37 \times 10^{-4}$
CBCA II	$2,75 \times 10^{-1}$	$4,61 \times 10^{-5}$

2.7 BCA II'nin C₂N₂ ile Modifikasyonunun Aydınlatılması

2.7.1. Materyal.

BCA II, tripsin, Tris, Sigma'dan; etilalkol, CH₃NH₂.HCl, asetonitril (HPLC kalite), CH₂Cl₂, Fisher'den; V8 proteaz (Endoproteinaz Glu-C)



Şekil 2.18. BCA II ve CBCA II'nin HNTSA hidroliz aktivitesine ait Lineweaver-Burk grafiği

Boehringer Mannheim'dan; p-anisidin, TFA, amonyum asetat, sodyum fosfat Aldrich'ten temin edildi. Sıvı kromatografik ayırmalar KRATOS HPLC aygıtında Vydac C-18 (0.46x25 cm) kolonu ile gerçekleştirildi. Enjeksiyondan önce enzim çözeltileri Millipore Centricon membran filtreleri ile süzüldü. Spektrofotometrik ölçümler Perkin Elmer Model Lambda 4B UV-VIS spektrofotometre ile alındı.

2.7.2 Metod

C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminde ortaya çıkan modifikasyonun incelenmesi için bazı özellikleri ve nükleofillere karşı davranışı incelendi. Enzim, tripsin ve V8 proteaz ile sindirilerek kromatogramları yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak karşılaştırıldı. Daha önceden bazı nükleofillere karşı dayanıksız olduğu saptanan (113, 117) C_2N_2 modifikasyonunun bu özelliği metilamin (CH_3NH_2) kullanılarak incelendi. Nükleofil olarak p-anisidin kullanıldığında enzimin sıvı kromatografideki davranışı incelendi.

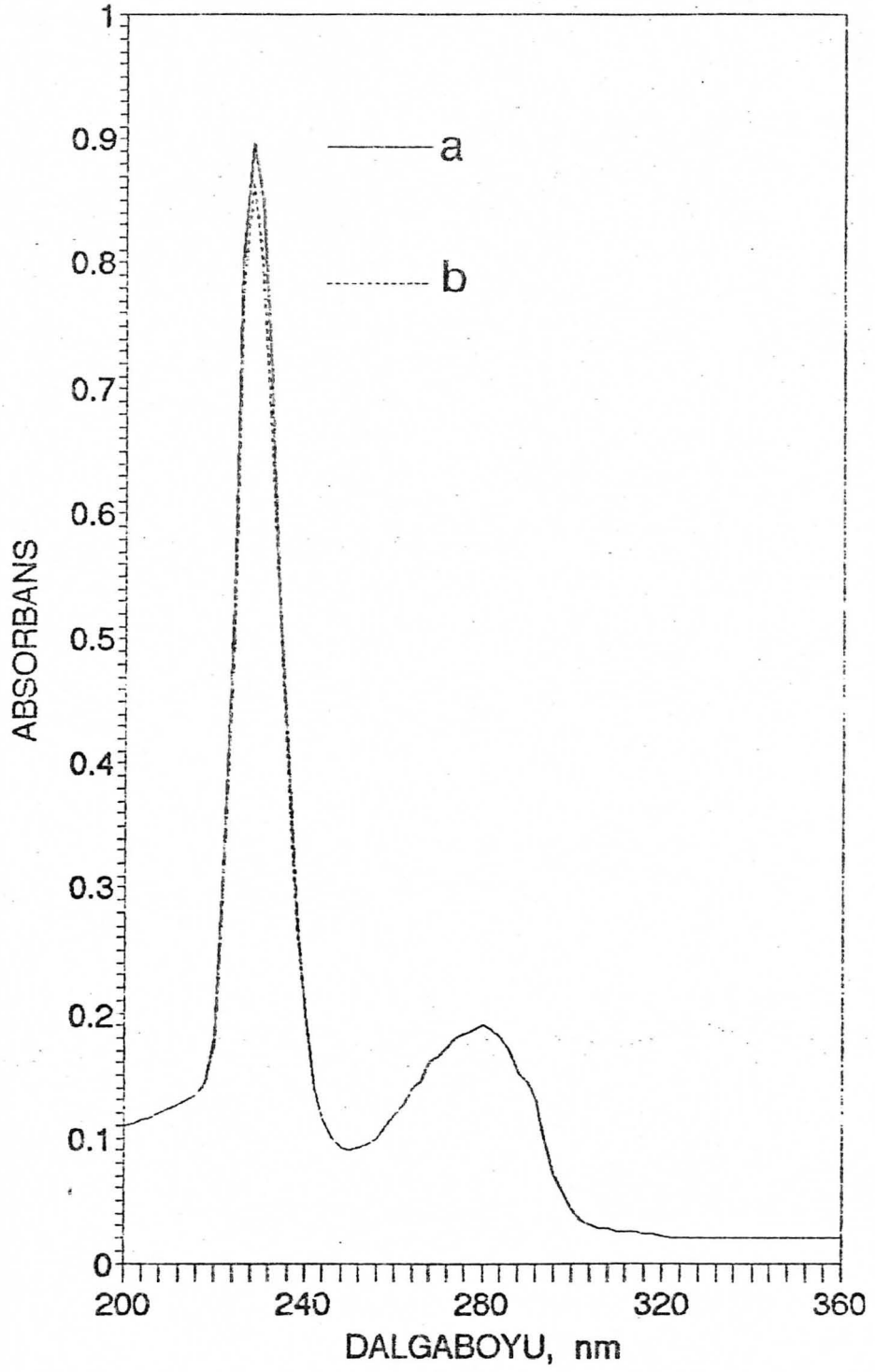
BCA II bazı inhibitörlerin varlığında C_2N_2 ile muamele edilerek bu inhibitörlerin modifikasyona karşı enzimi koruyup korumadığı kontrol edildi ve modifikasyonda rol alan amino asit(ler) aydınlatılmaya çalışıldı.

2.7.3 C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminin bazı özelliklerinin incelenmesi.

BCA II, C_2N_2 ile muamele edildikten sonra UV-VIS absorban spektrumları incelendi. Şekil 2.19'da aynı derişimdeki modifiye ve kontrol enzimlerin spektrumları görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi bu iki enzim çözeltilisinin spektrumları birbirinin aynı bulundu.

Bölüm 2.2'de anlatılan standart yöntemle modifiye edilmiş enzim, soğukta kurutma yöntemi ile çözgeninden arındırıldıktan sonra tekrar suda çözülmek istendiğinde kontrol enzime göre suda çözünürlüğünün çok azaldığı gözlemlendi.

Modifiye enzimin yüksek basınç sıvı kromatografisindeki kromatografik karakteristikleri incelendi. Bunun için bir Vydac C-18 (0.46x25 cm) kolon



Şekil 2.19 BCA II ve CBCA II'nin UV-VIS absorbans spektrumları.
(a) BCA II'ye ait spektrum, (b) CBCA II'ye ait spektrum.

kullanıldı. Çözgen sistemi % 0.1 TFA içeren H₂O (A) ve % 0.1 TFA içeren asetonitril (B) den oluştu. Gradient koşulları :

Başlangıç : % 90 A-% 10 B
 Son : % 10 A-% 90 B
 Süre : 30 dak.
 Akış hızı : 1 mL/dak.
 Dalgaboyu : 280 nm.

Bu şartlarda hazırlanan kromatogramlar karşılaştırıldığında C₂N₂ ile muamele edilmiş BCA II enziminin tutulma zamanının kontrole göre biraz daha büyük olduğu ve enzim pikinin genişlediği gözlemlendi. Şekil 2.20 de C₂N₂ ile muamele edilmiş ve edilmemiş BCA II enziminin, ayrı ayrı ve birlikte, kromatogramları görülmektedir.

Modifiye enzimin tripsin ile sindirildikten sonraki kromatogramının incelenmesi için enzim tripsin ile muamele edildi. Bunun için C₂N₂ ile muameleden sonra enzim soğukta kurutuldu. Daha sonra enzimin 1 mg'ına etanolün sudaki % 70 (v/v)'lik çözeltisinden 1 mL eklenerek 1,5 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. N₂ akımı ile kuruluğa kadar buharlaştırıldıktan sonra 1 mL (pH 8,5) TRIS HCl tamponunda çözüldü. Bu çözeltiliye 1 mg'ı 1 mL (0,001 N) HCl çözeltisinde çözülmüş tripsin çözeltisinden 20 µL eklenerek 37°C' de 18 saat devamlı karıştırılarak inkübe edildi. Daha sonra milipor mikro filitrelerinden geçirilerek süzülme ve HPLC ile incelendi. C₂N₂ ile muamele edilmemiş bir kontrol enzim çözeltisi de aynı basamaklardan geçirilerek hazırlandı.

HPLC için Vydac C-18 (0,46x25 cm) kolon kullanıldı. Çözgen sistemi % 0,1 TFA içeren H₂O (A) ve % 0.1 TFA içeren % 70 Asetonitril/H₂O (B) den oluştu. Gradient koşulları.

	<u>1. Gradient adımı</u>	<u>2. Gradient adımı</u>
Başlangıç :	% 100 A	% 35 A - % 65 B
Son :	% 35 A - % 65 B	% 0 A - % 100 B
Süre :	75 dak.	10 dak.
Akış hızı :	1 mL/dak.	1 mL/dak.
Dalgaboyu :	220 nm	220 nm

Bu şartlarda alınan kromatogramlar karşılaştırıldığında modifiye enzim ile kontrol enzim profilleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Şekil 2.21'de C_2N_2 ile muamele edilmiş ve edilmemiş BCA II enziminin tripsin ile sindirildikten sonraki kromatogramları görülmektedir.

Modifiye enzim V8 proteaz (Endoproteinase Glu-C) ile iki farklı pH'da sindirilerek kontrol enzim ile HPLC kromatogramları karşılaştırıldı.

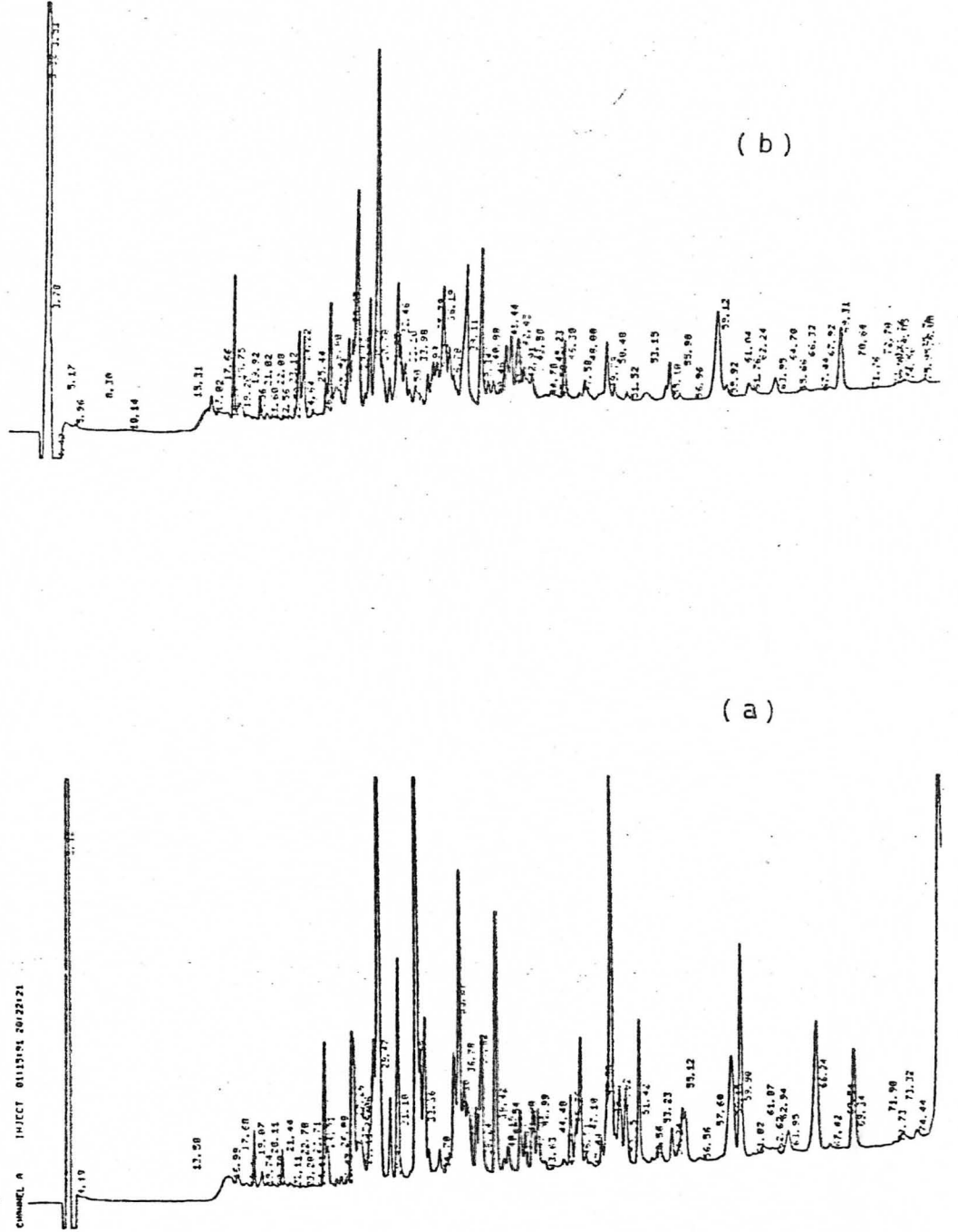
V8 proteaz bir serin proteazdır. Bu enzim, amonyum bikarbonat (pH 7,8) veya amonyum asetat (pH 4,0) tamponunda proteinleri glutamat birimlerinin karboksil terminal ucundan spesifik olarak hidroliz eder. Aynı enzim fosfat tamponunda (pH 7,8) hem Glu-x hem de Asp-x peptid bağlarını koparır (122-124).

Enzimi V8 proteazla muamele etmek için iki tampon çözelti hazırlandı. Birinci tampon çözelti 50 mM amonyum asetat ile pH 4'e ayarlanarak; ikinci tampon çözelti 50 mM sodyum fosfat ile pH 7,8'e ayarlanarak hazırlandı. Modifiye ve kontrol BCA II'nin birer miligramlık ikiye örneğine etanol ile soğukta denaturasyon uygulandıktan sonra örneklerin birer tanesi amonyum asetat diğerleri ise sodyum fosfat tamponunda çözüldü ve 1:30 oranında V8 proteaz kristalleri ilave edildi. Devamlı karıştırılarak $37^{\circ}C$ de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hidroliz bir damla trikloro asetik asit ilavesi ile durduruldu. Enzim çözeltileri milipore mikrofiltrelerden geçirildikten sonra HPLC ile kromatogramları alındı.

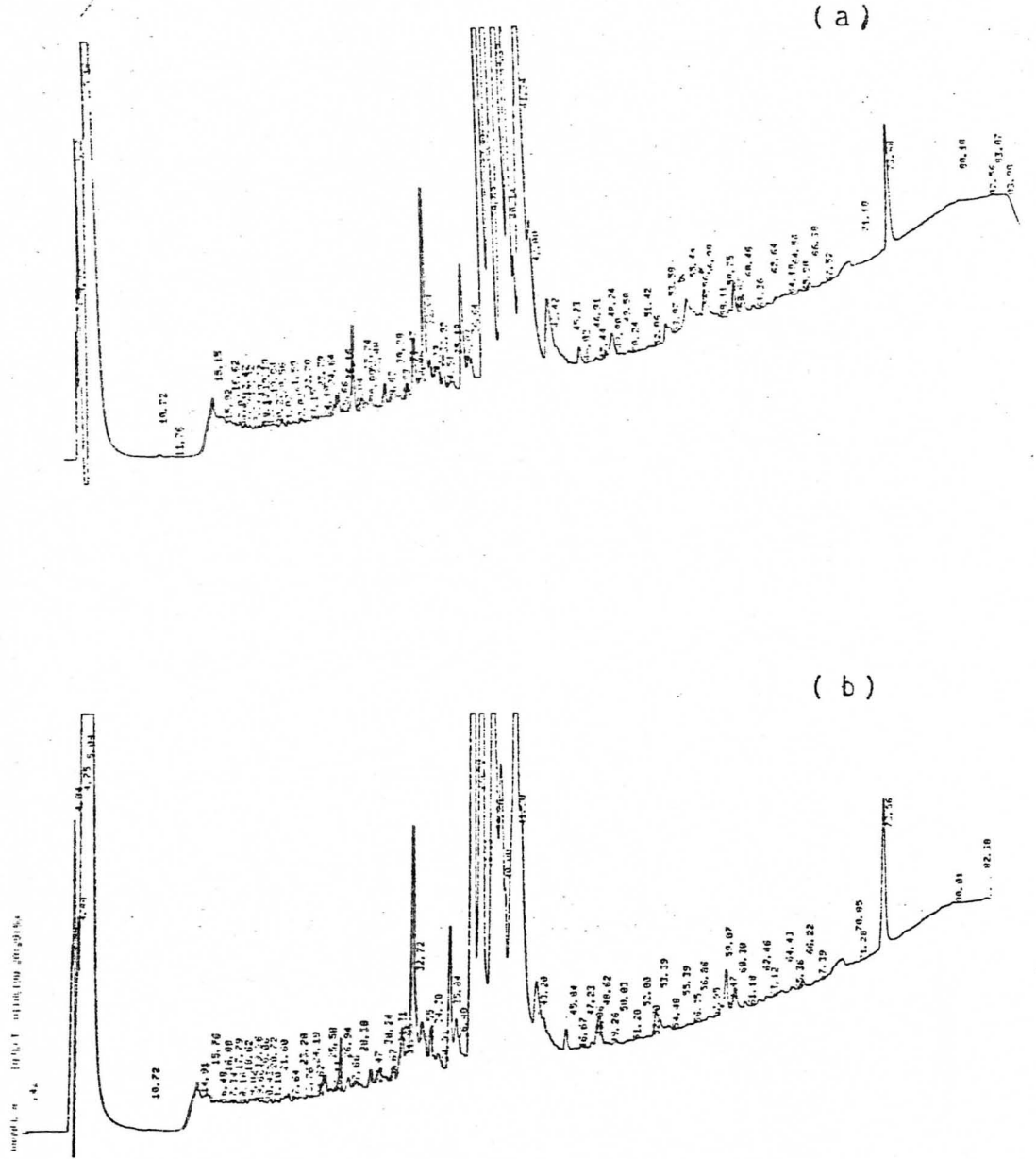
Uygulanan gradient koşulları tripsin ile sindirilmiş enzim çözeltilerinin HPLC kromatograflarının eldesi için uygulananın aynısıydı. Şekil 2.22'de ve şekil 2.23'de V8 proteazla amonyum asetat ve sodyum fosfat tamponlarında hidroliz edilen kontrol ve modifiye BCA II enzimlerinin kromatogramları görülmektedir.

2.7.4. C_2N_2 modifikasyonunun nükleofillere karşı dayanıksızlığı.

C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II, pH 10'da bir müddet tutulup tekrar pH 7,2'ye getirildiğinde aktivitesini geri kazanmaktadır (113,117). Bu durum oluşan modifikasyonun nükleofillere karşı dayanıksız olduğunu gösterir. Enzim



Şekil 2.21. BCA II ve CBCA II'nin tripsin hidrolizinden sonraki HPLC kromatogramları. (a) BCA II'ye ait kromatogram, (b) CBCA II'ye ait kromatogram.



Şekil 2.22. BCA II ve CBCA II'nin V8 proteaz ile pH 4'de amonyum asetat tamponunda hidrolizinden sonraki HPLC kromatogramları. (a) BCA II'ye ait kromatogram, (b) CBCA II'ye ait kromatogram.

N-metilamin ile muamele edildikten sonra pH 10'a yükseltile bile aktivite geri gelmemekte bu da N-metil aminin modifikasyonda rol alan gruplardan birisine bağlanıp enzimi inhibe ettiği şeklinde açıklanmaktadır (113, 117). C_2N_2 modifikasyonun nukleofillere karşı dayanıksızlığını incelemek için nukleofil olarak metilamin (CH_3NH_2) kullanıldı.

Metilamin kuvvetli bir baz olup sudaki çözeltisinin pH'sı 10'dan yüksek olduğundan ve oluşan modifikasyonun pH 10'da geri dönüştüğü daha önceden bilindiğinden metilaminin sudaki çözeltisinin kullanılmıyacağı düşünüldü. Bu yüzden enzimin metilamin ile etkileştirilmesi susuz ortamda, metilenklorür (CH_2Cl_2) çözgeninde gerçekleştirildi.

Enzimin CH_3NH_2 ile muamelesi şöyle yapıldı : Önce 2 ayrı 1 mg enzim tartılarak 500 μ L toplam hacimde birisi C_2N_2 ile etkileştirildi diğeri ise kontrol olarak alındı. Standart C_2N_2 ile muamele yöntemi ile modifikasyondan sonra her iki çözeltinin 100 μ L'si ayrılarak pNPA hidroliz aktivitesine bakıldı. Kontrol enzim çözeltisinin aktivitesi normal bulunurken modifiye enzimin inhibe olduğu saptandıktan sonra geriye kalan 400 μ L enzim çözeltileri soğukta kurutma işlemine tabi tutuldu.

Öte yandan, metilaminin metilenklorürdeki çözeltisi hazırlandı. Piyasadan temin edilen metilamin HCl tuzu halinde olduğu için 0,675 g. $CH_3NH_2 \cdot HCl$ 0,550 g Na_2CO_3 içeren 10 mL metilenklorür içinde 2 saat karıştırıldı. Bu çözeltideki metilamin derişimi titrasyon ile 0,5 M olarak hesaplandı.

Soğukta kurutulan kontrol ve modifiye enzimin 0,4 mg'ı ayrı ayrı iki reaksiyon şişesine konarak üzerlerine hazırlanan metilamin çözeltisinden 1 mL eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı. Daha sonra bir rotavapor yardımı ile çözgen uzaklaştırılarak kuru enzim ele geçirildi.

Bu enzim örnekleri üzerine 0,1 M NaOH çözeltisinden 2'şer mL eklenerek (pH 10) 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.

2 saat sonunda enzim çözeltisi Centricon membran filtreleri kullanılarak minimum hacme santifüjlendi. Daha sonra enzim çözeltileri aynı santrifüj filtreleri kullanılarak pH 7,2 (50 mM) HEPES tampon çözeltisi ile yıkama

çözeltisi pH 7,2'ye erişinceye kadar yıkandı. Daha sonra çözeltiler pH 7,2 (50 mM) HEPES tamponu ile 10 mL'ye ayarlandı. Bu enzim çözeltilerinin p-NPA ve HNTSA hidroliz aktiviteleri tayin edildi. p-NPA hidroliz aktivitesi tayini deneylerinde enzim derişimi $3,52 \times 10^{-6}$ M; substrat derişimi ise $3,9 \times 10^{-5}$ M idi. HNTSA hidroliz aktivitesi tayini deneylerinde ise enzim derişimi $7,1 \times 10^{-7}$ M, substrat derişimi $2,66 \times 10^{-5}$ M idi.

Şekil 2.24 ve 2.25'de C_2N_2 ile muamele edilmiş ve kontrol enzimlerin daha sonra metilenklorür içindeki metilamin ile muamelesi sonucu p-NPA ve HNTSA hidroliz aktivitelerinin profilleri görülmektedir. Bu şekilden de görülebileceği gibi metilaminle muameleden sonra pH 10'a yükseltilmesine rağmen aktivite tam olarak geri gelmemektedir.

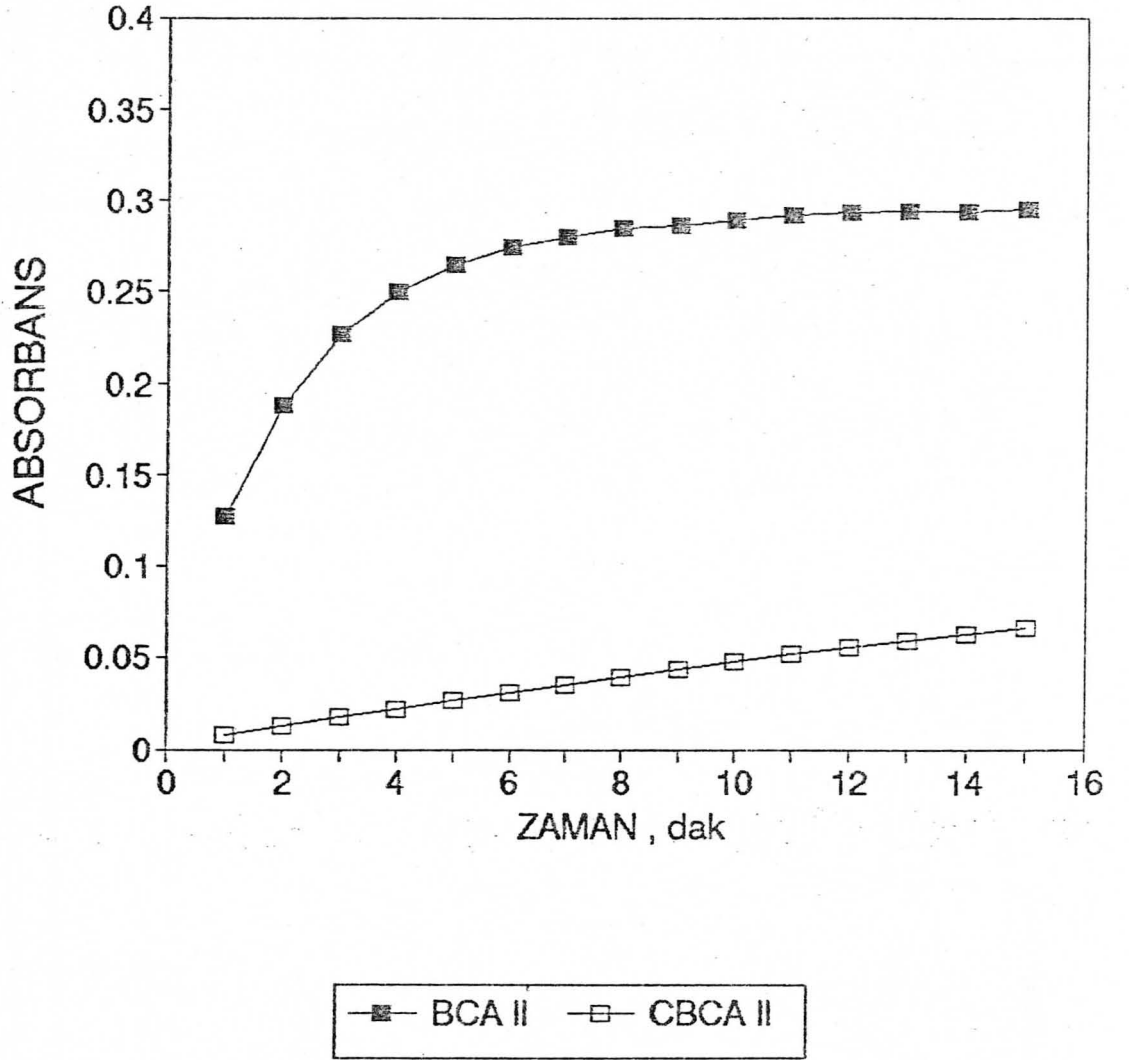
Bu deneyler susuz ortamda metilenklorür çözgeninde yapıldığı için gözlenen profillere metilenklorürün de etkisi olabileceği varsayılarak yukarıda anlatılan işlemler içinde metilamin çözünmemiş metilenklorürle tekrarlanarak çözgenin etkisi incelendi.

Şekil 2.26'da metilenklorür ile muamele edilmiş modifiye ve kontrol enzimlerin p-NPA ve HNTSA hidroliz reaksiyonlarının absorbans değışimleri görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi metilenklorürle muameleden sonra pH 10'a çıkarıldığında enzim aktivitesini tekrar kazanmaktadır.

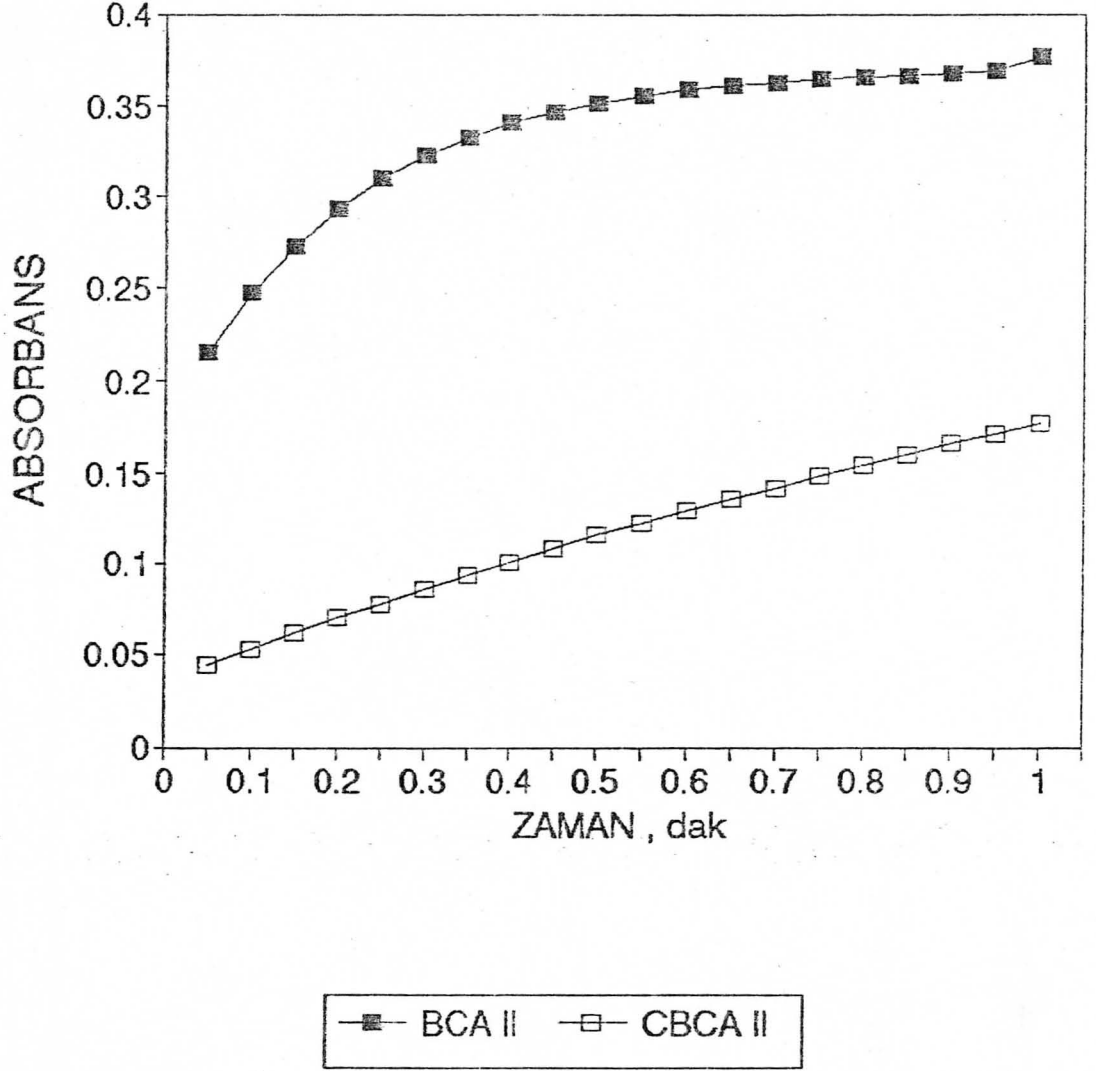
Bu deneylerin sonuçları CH_3NH_2 'in C_2N_2 'in neden olduğu çapraz bağlanmayı sağlayan gruplara nükleofil olarak bağlanabileceği fikrini vermektedir. Bu bağlamanın hangi gruplara olduğu işaretli metilamin ile izlenebilirse C_2N_2 modifikasyonun aydınlatılabileceği düşünöldüğünden $^{14}C-CH_3NH_2$ ile yukarıdaki deneyler tekrarladı. Ancak non-spesifik bağlanma nedeniyle radyoaktivitenin bütün proteine dağıldığı gözleendiği için bu yöntemin üzerinde daha fazla durulmadan daha belirgin tayin edilebilecek başka bir nükleofil arandı.

2.7.5 C_2N_2 ile modifiye edilmiş BCA II enziminin p-anisidin ile muamelesi.

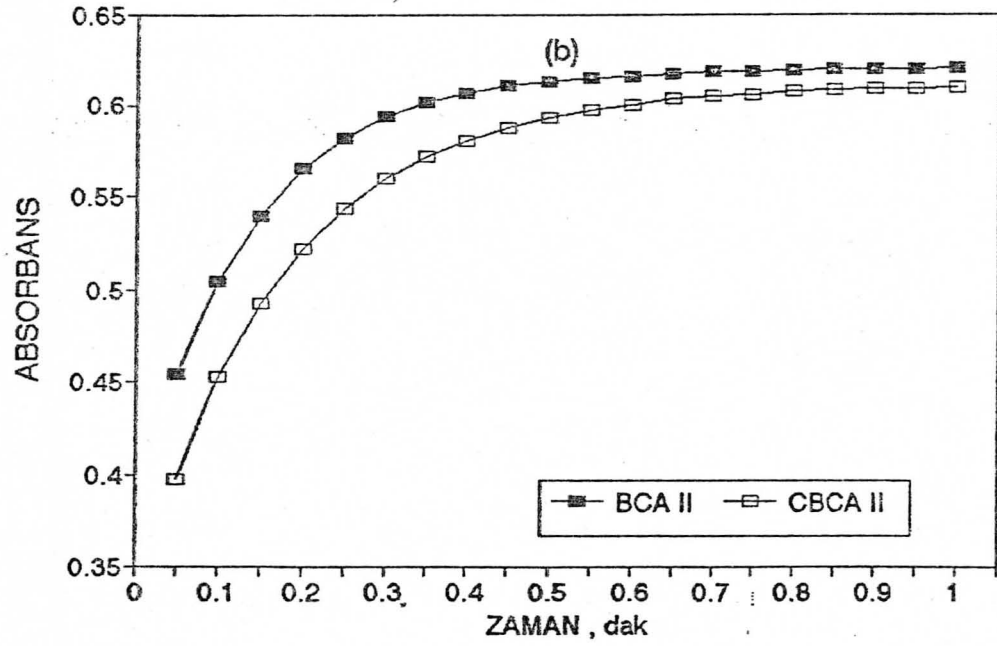
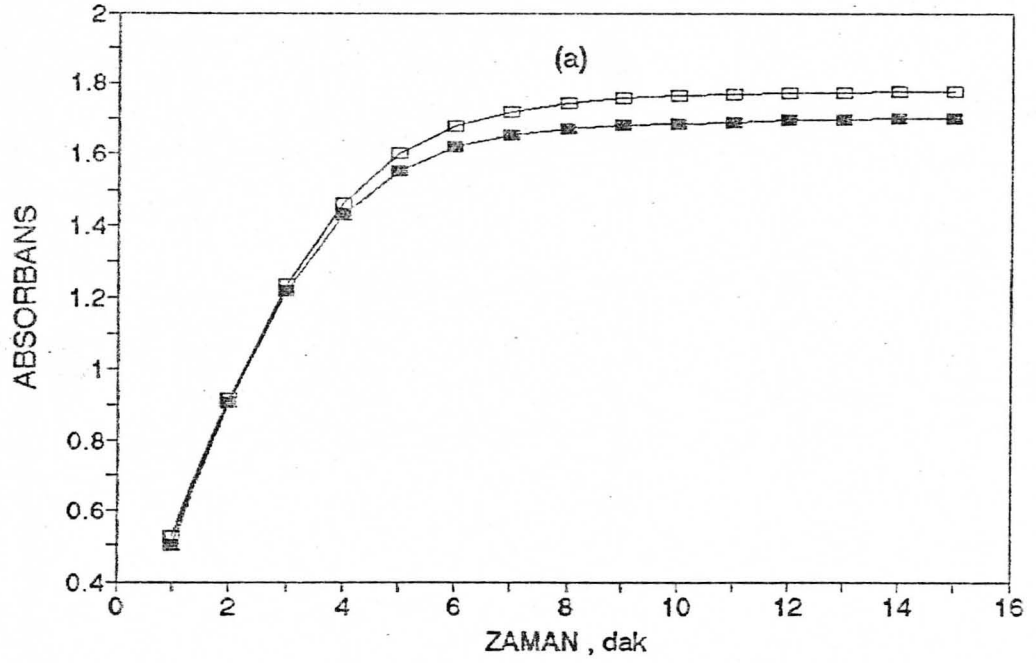
Enzim modifikasyonunun aydınlatılabilmesi için modifiye proteine p-anisidinin bağlanması düşünöldü. Kuvvetli nükleofil fakat zayıf baz olması



Şekil 2.24 BCA II ve CBCA II'nin CH_3NH_2 ile muameleden sonraki p-NPA aktivitesi.

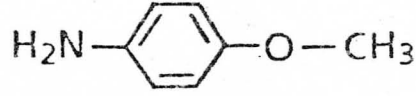


Şekil 2.25. BCA II ve CBCA II'nin CH_3NH_2 ile muameleden sonra HNTSA aktivitesi



Şekil 2.26. BCA II ve CBCA II'nin CH_2Cl_2 ile muameleden sonra pNPA ve HNTSA aktivitesi

özelliği ile p-anisidinin modifiye enzime bağlanabilecek uygun bir molekül olabileceği düşünöldü.

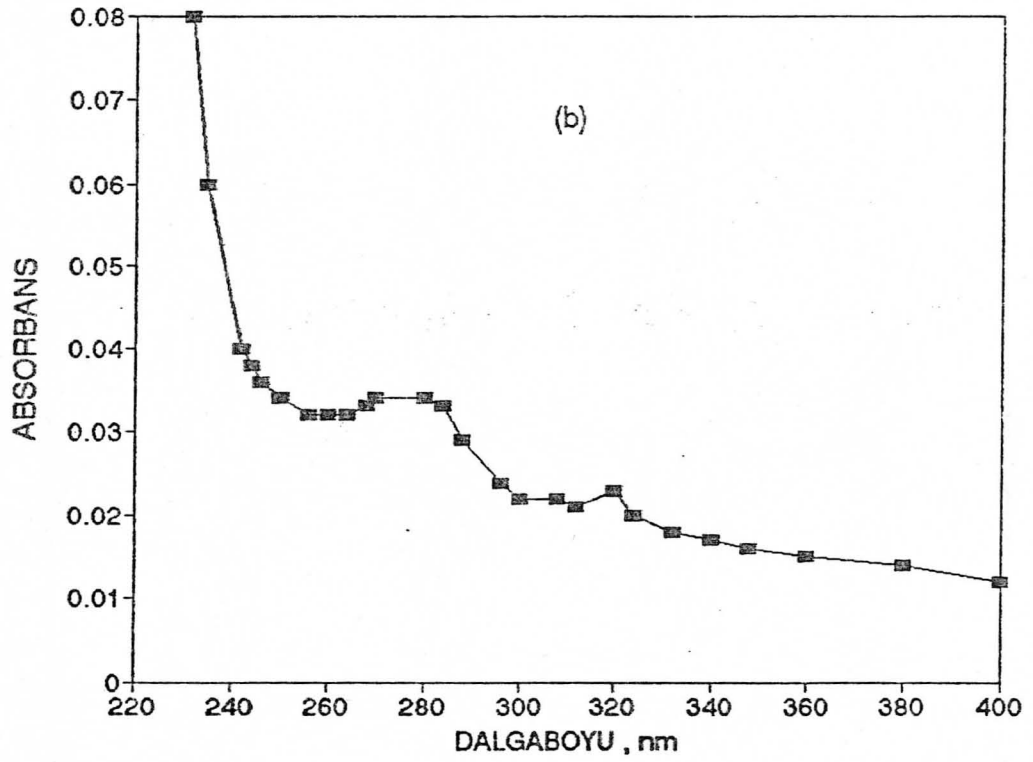
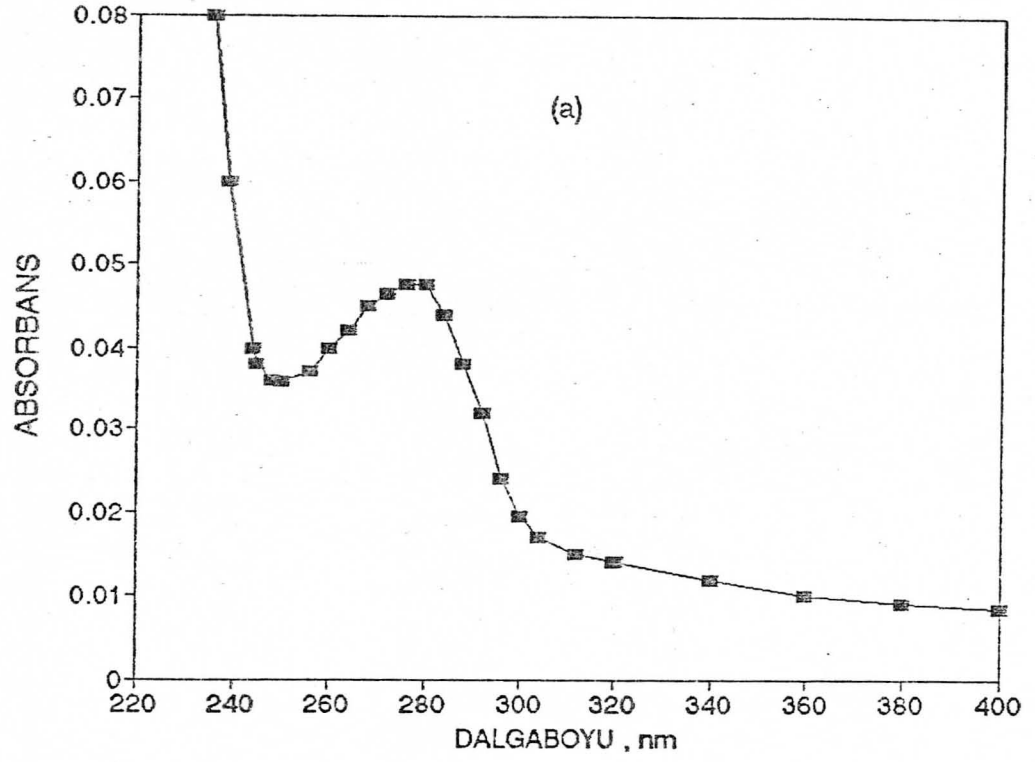


p-Anisidin

p-Anisidinin sulu çözeltilsinin pH'sı 7,84 dür. Molekül, 235 ve 300 nm'de olmak üzere iki dalga boyunda kuvvetli absorbands yapar. Enzimle muameleden sonra tripsinle sindirilmiş proteinin kromatogramda 300 nm (veya civarında) yeni pikler görülmesi bağlanmanın gerçekleştiğinin göstergesi sayılabilir.

C_2N_2 ile muamele edilmiş enzimin p-anisidinle muamelesi şöyle yapıldı: 1 g p-anisidin 100 mL suda 1 saat karıştırılarak p-anisidinin sudaki çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti çok kararsız olduğundan her seferinde taze hazırlanarak hemen kullanıldı. BCA II enzimi standart yöntemle C_2N_2 ile muamele edilip soğukta kurutuldu. C_2N_2 ile muamele edilmeyen aynı miktarda enzim de kontrol olarak çalışıldı. Bu iki enzim örneğinin her mg'ı 0,5 mL suda çözülerek 10 dakika karıştırıldıktan sonra daha önce hazırlanan p-anisidin çözeltisinin 0,5 mL'si eklenerek azot altında 2 saat devamlı karıştırıldı. Daha sonra azot akımı kullanılarak çözeltiler 300 μ L'ye kadar deriştirildi. 700 μ L EtOH eklenerek proteinler çökünceye kadar karıştırıldı. Daha sonra santrifüjlenerek EtOH atıldı ve çökelek 0,5 mL EtOH ile 4 kez yıkandıktan sonra kurutuldu.

Bu şekilde p-anisidin ile muamele edilen enzimler daha ileri deneylere tabi tutulmadan önce suda çözülerek HCl ile hafifçe asitlendirilip UV absorbsiyon spektrumları alındı. Şekil 2.27'de C_2N_2 ile modifiye edilmiş ve kontrol BCA II enzimlerinin p-anisidin ile muameleden sonraki UV absorbsiyon spektrumları görölmektedir. Modifiye enzimin spektrumunda 320 nm civarında gözlenen absorbsiyon kontrol enzimin spektrumunda gözlenmemektedir. Bu farklılık C_2N_2 ile modifiye edilmiş enzime p-anisidinin nükleofil olarak bağlanmış olabileceğini düşöndürdüğünden bu bağlanmanın proteinin hangi bölgesine olduğunun saptanmasına çalışıldı. Bunun için p-anisidin ile muamele edilmiş enzim örneklerinin 1 mg'ı pH 8,5 TRIS HCL tamponunda



Şekil 2.27. BCA II ve CBCA II'nin p-anisidin ile muameleden sonraki UV absorpsiyon spektrumları. (a) BCA II'ye ait spektrum, (b) CBCA II'ye ait spektrum.

çözülerek 20 μ L Tripsin (1mg/1 mL 0,001N HCl) çözeltisi eklendi ve 37°C'de 20 saat karıştırıldı. Daha sonra enzim çözeltileri milipor filtrelerinden süzülerek HPLC kromatogramları alındı. Bu işlem için Vydac C-18 kolon kullanıldı. Çözgen sistemi %0,1 TFA içeren H₂O (A) ve % 0,1 TFA içeren % 70 Asetonitril/H₂O (B) den oluştu. Uygulanan gradient koşulları:

	<u>1.Gradient adımı</u>	<u>2.Gradient adımı</u>
Başlangıç :	% 100 A	% 35 A - % 65 B
Son :	% 35 A - % 65 B	% 0 A- % 100 B
Süre :	75 dak.	10 dak.
Akış hızı :	1 mL/dak	1 mL/dak.
Dalga boyu :	320 nm	320 nm

Bu şartlar uygulandığında kontrol ve modifiye enzim çözeltileri için elde edilen kromatogramlar şekil 2.28 de görülmektedir.

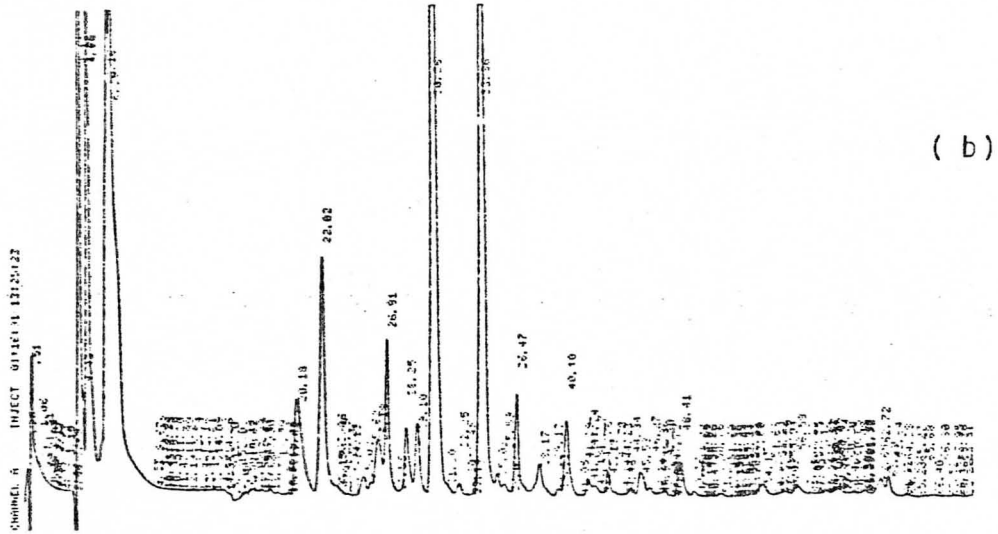
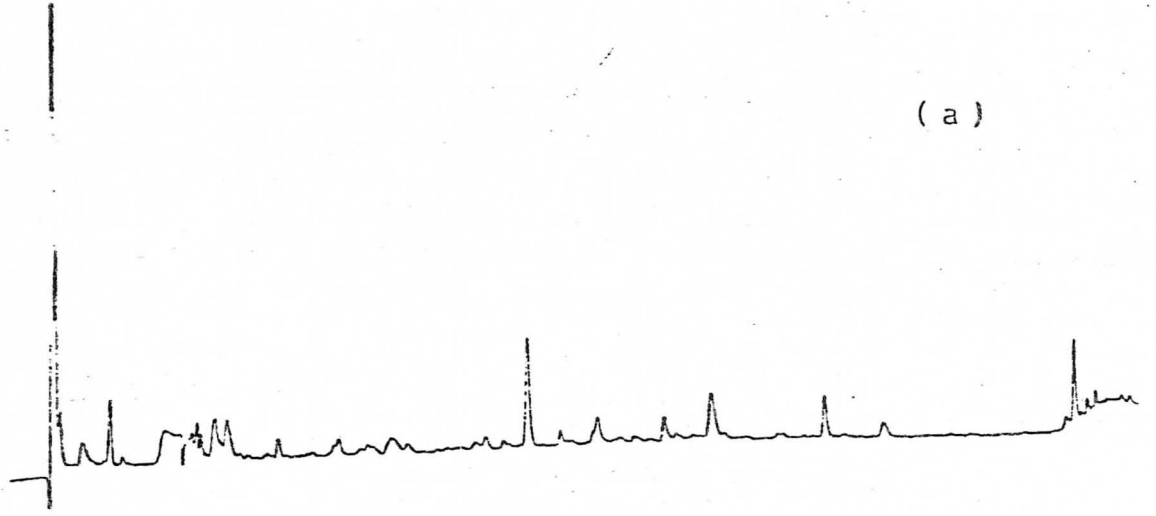
Kontrol ve modifiye enzimin 320 nm'de alınan HPLC kromatogramlarının bu farklanma p-anisidinin modifiye enzime bağlanmış olabileceği izlenimini vermektedir. Kromotogramlarda görülen piklerin içeriklerinin tayini için en şiddetli üç pik ayrı ayrı toplanarak her biri tekrar daha yayvan bir gradient uygulanarak temizlendi. Temizleme işlemi için şu gradient uygulandı:

	<u>1.Gradient adımı</u>	<u>2.Gradient adımı</u>	<u>3.Gradient adımı</u>
Başlangıç :	% 100 A	% 90 A - % 10 B	% 60 A - % 40 B
Son :	% 90 A - % 10 B	% 60 A - % 40 B	% 0 A - % 100 B
Süre :	5 dak.	75 dak.	10 dak.
Akış hızı :	1 mL/dak.	1 mL/dak.	1 mL/dak.
Dalga boyu :	320 nm	320 nm	320 nm

Temizlenen fraksiyonlar amino asit analizine tabi tutuldu.

2.7.6 BCA II enziminin C₂N₂ ile modifikasyonuna inhibitörlerin etkisi

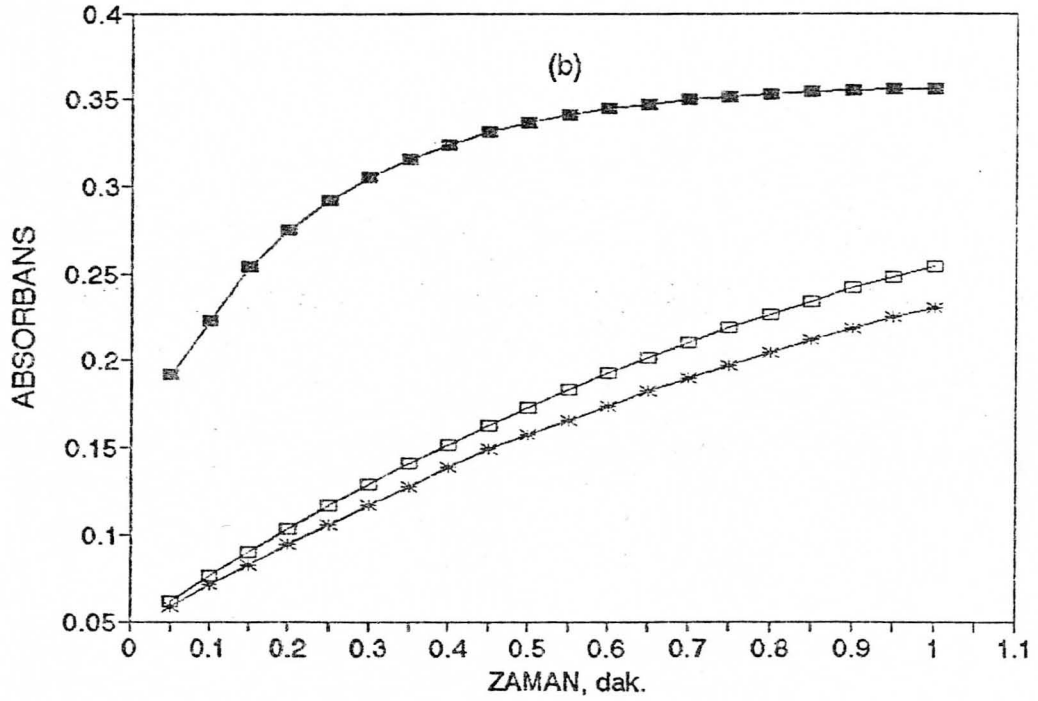
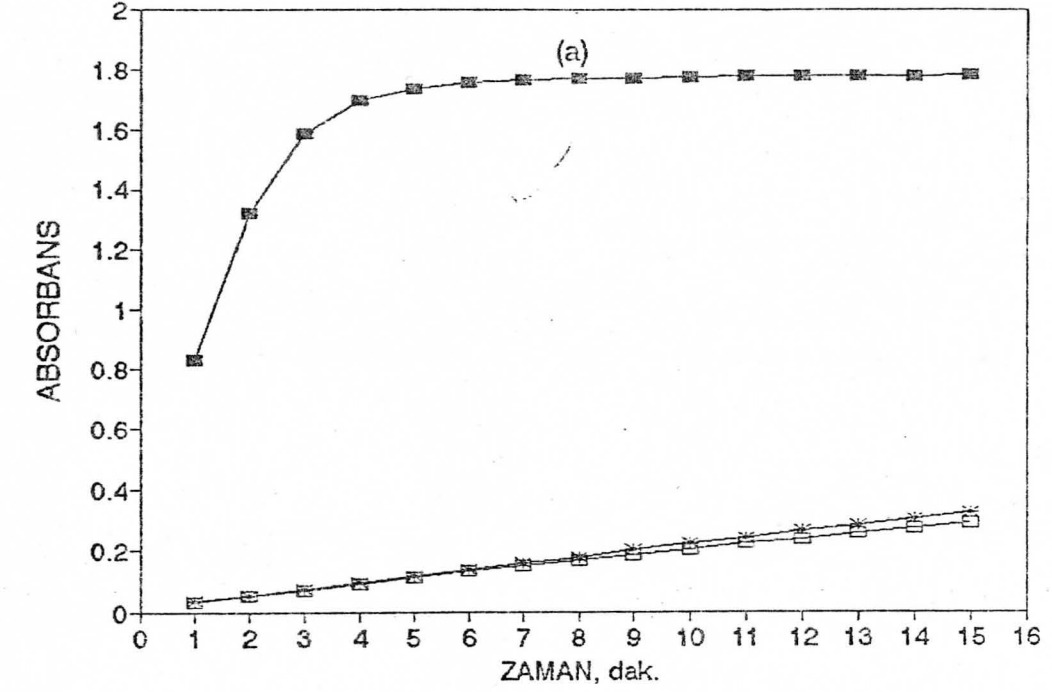
Asetazolamid ve salamid inhibitörleri ile etkileştirilmiş BCA II'nin C₂N₂ ile modifikasyonu incelendi. Asetazolamidin inhibitör olarak kullanıldığı



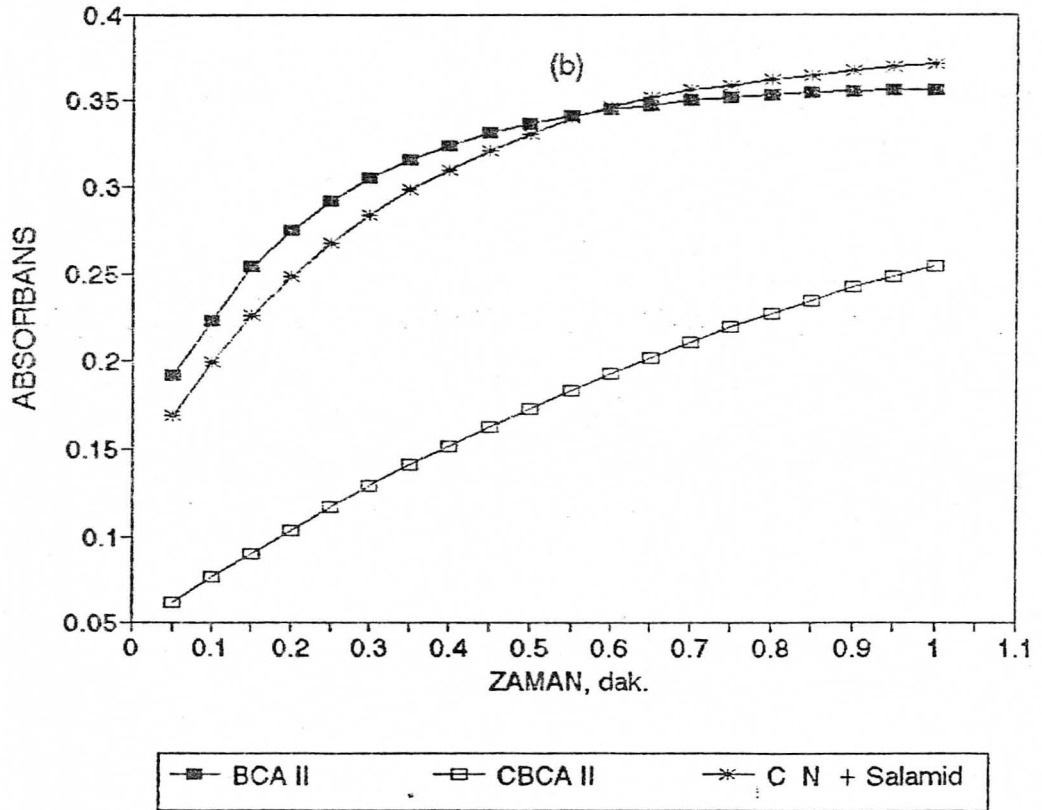
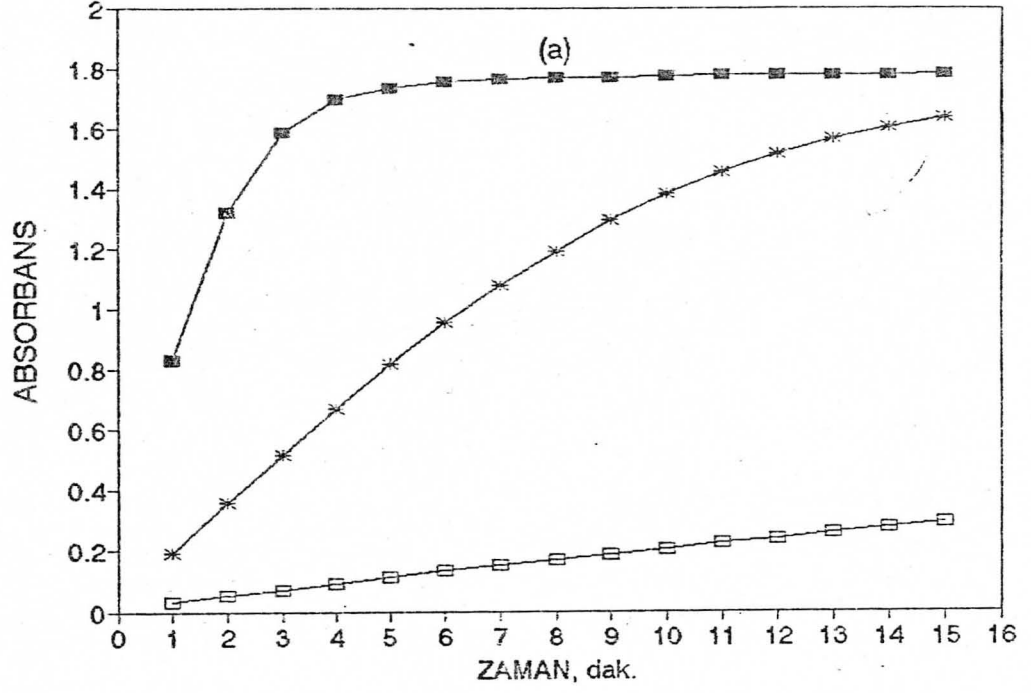
Şekil 2.28. BCA II ve CBCA II'nin p-anisidin ile muameleden sonra tripsin ile hidrolizleri sonucu gösterdikleri HPLC kromatogramları. (a) BCA II'ye ait kromatogram, (b) CBCA II'ye ait kromatogram.

deneyler şöyle yapıldı: 3 ayrı reaksiyon şişesinin herbirine 1 mg BCA II tartıldı. Bu örneklerden bir tanesine 1 mL pH'sı 4'e ayarlanmış su kondu. İkinci örnek 200 μL pH'sı 4'e ayarlı su içinde çözüldükten sonra derişimi $2,47 \times 10^{-3}$ M olan asetazolamidin sudaki çözeltisinden 200 μL eklendi. On dakika sonra bu ikinci örneğe 170 μL C_2N_2 stok çözeltisi ve 430 μL pH'sı 4'e ayarlı su eklenerek hacim 1 mL'ye tamamlandı. Üçüncü örnek ise 200 μL pH'sı 4'e ayarlı su içinde çözüldükten sonra 170 μL C_2N_2 stok çözeltisi ve 630 μL pH'sı 4'e ayarlı su eklenerek hacmi 1 mL'ye tamamlandı. Bu üç enzim çözeltisi 2 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra Centricon mikrokon-santrator tüplere aktarılarak pH'sı 4'e ayarlı su ile 4 defa santrifüjlenip yıkandı. Daha sonra pH 7,2 HEPES tampon çözeltisi ile seyreltilerek istenen derişime ayarlanan enzim çözeltilerinin hidroliz aktiviteleri pNPA ve HNTSA substratlarına karşı izlendi. Bu tayinlerin detayı bölüm 2.3'de ve bölüm 2.6'da verilmiştir.

Salamid'in inhibitör olarak kullanıldığı deneyler için ise su yol izlendi: 3 ayrı reaksiyon şişesinin herbirine 1 mg BCA II tartıldı. Bu örneklerden bir tanesine 1 mL pH'sı 4'e ayarlı su kondu. İkinci örnek 200 μL pH'sı 4'e ayarlı su içinde çözüldükten sonra derişimi $2,47 \times 10^{-2}$ M olan salamidin asetonitrildeki çözeltisinden 20 μL eklendi. On dakika sonra bu örneğe 170 μL C_2N_2 stok çözeltisi ve 610 μL pH'sı 4'e ayarlı su eklenerek hacim 1 mL'ye tamamlandı. Üçüncü örnek 200 μL pH'sı 4'e ayarlı su içinde çözüldükten sonra 170 μL C_2N_2 stok çözeltisi ekleyip 630 μL pH'sı 4'e ayarlı su ilavesiyle hacim 1 mL'ye tamamlandı. Bu üç enzim çözeltisi 2 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Daha sonra çözeltiler Centricon mikrokonsantratör tüplere aktarıl-arak pH'sı 4'e ayarlı su ile 4 defa santrifüjlenip yıkandı. Daha sonra pH 7,2 HEPES tampon çözeltisi ile istenen derişime ayarlanan enzim çözeltilerinin p-NPA ve HNTSA hidroliz aktiviteleri izlendi. Şekil 2.29 ve şekil 2.30'da asetazolamid ve salamid varlığında C_2N_2 ile modifiye edilen BCA II enziminin p-NPA ve HNTSA hidroliz aktiviteleri kontrol ve inhibitörsüz ortamda C_2N_2 ile muamele edilmiş enzimleriyle karşılaştırılmıştır.



Şekil 2.29. Asetazolamid varlığında C_2N_2 ile muamele edilen BCA II'nin p-NPA ve HNTSA aktivitesi. (a) p-NPA aktivitesine ait ürün oluşumu eğrileri, (b) HNTSA aktivitesine ait ürün oluşumu eğrileri.



Şekil 2.30. Saliamid varlığında C_2N_2 ile muamele edilen BCA II'nin p-NPA ve HNTSA aktivitesi. (a) p-NPA aktivitesine ait ürün oluşumu eğrileri, (b) HNTSA aktivitesine ait ürün oluşumu eğrileri.

Şekilden de görülebileceği gibi asetazolamidli ortamda C_2N_2 ile muamele edilmiş BCA II enziminde inhibisyon yine gözlenirken salamidli ortamda C_2N_2 ile muamele edilen BCA II enzimi inhibisyona karşı korunmaktadır.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bölüm 2.1'de bahsedilen substratların sentezi sırasında karşılaşılan en büyük zorluk vakumda distilleme işlemi sırasında çalışılan madde miktarının çok küçük olması nedeniyle buharların distilasyon kolonundan geçmeden geri dönmesi olmuştur. Bunun önlenmesi için piyasadan temin edilebilecek en kısa boyunlu ve en küçük distilasyon düzeneği kullanılmış ve distilasyon kolunun boyun kısmı ısıtıcı elementlerle sarılarak buharın yoğunlaşmadan soğutucuya ulaşması sağlanmıştır. Substratların saflığı enzim kinetiği açısından son derece önemli olduğundan mümkün olduğunca saf madde elde edilmeye çalışılmış ve saflık dereceleri spektrofotometrik yöntemlerle kesin olarak saptandıktan sonra kullanıma geçilmiştir. Sentezlenen bütün substratların spektrumlarının literatürde belirtilenlerle yüzde yüz uyum içinde olduğu görülmüştür.

Enzimin siyanojen ile muamelesi sırasında sürenin 2 saatle sınırlandırılmasının nedeni bütün inhibisyon reaksiyonlarında maksimum inhibisyona iki saatte erişilmesi idi. Ayrıca siyanojenin pH 4'teki çözeltisinde 3-4 saat sonra kahverengimsi çökelek gözlenmeye başlanır. Ortamda başta parasiyanojen olmak üzere pek çok ürünün oluştuğu sanılmaktadır. Bu muhtemel ürünlerin enzime etkilerinin önlenmesi için 2 saatten daha uzun süreli inkübasyonlardan kaçınılmıştır. Öte yandan, enzimin denature olmadan saklanabildiği pH sınırları 5.5-10.5 olarak rapor edilmektedir. Ancak, muamele pH 4'te yapılmaktadır. Bu nedenle enzimi pH 4'te 2 saatten fazla tutmayarak muhtemel denaturasyonun önlenildiği sanılmaktadır. Bu muhtemel etki, kontrol RCA II'nin de aynı koşullarda tutulması suretiyle kontrol altına alınmıştır.

p-Nitrofenilasetatin karbonik anhidraz için bir substrat olabileceği ilk kez Pocker ve Stone (91) tarafından ortaya çıkarılmış ve enzimin bu substrata karşı esteraz aktivitesi oldukça iyi incelenmiştir. Bu reaksiyon, sulfonamidler ve tek değerli anyonlar tarafından nonkompetatif biçimde inhibe edilir (93). p-NPA'daki nitro grubunun başka gruplarla değiştirilmesi katalitik etkinliği büyük ölçüde düşürmektedir (125).

Bu çalışmada BCA II'nin siyanojen ile muamelesi sonucu enzimin p-NPA hidroliz aktivitesinin % 79 inhibisyona uğradığı saptanmıştır. Bu sonuç, Ghenbot (117) tarafından rapor edilen sonuca yakınlık göstermektedir. Kirley (113), aynı inhibisyonu % 97 olarak rapor etmektedir. Çok dikkatli yapılan çalışmalarla bile bu inhibisyon değerine bu çalışmada ulaşılamamıştır. Kirley'in kullandığı enzim kendisi tarafından izole edilmiş, bu çalışmada kullanılan enzim ise satın alınmıştır. İnhibisyon değerleri arasındaki bu fark çalışma yöntemi ve enzimin elde edildiği kaynak farkından gelebilir.

Kullanılan enzimin daha önce çalışılan karbonik anhidrazilara uygun kinetik gösterdiği potent inhibitör olan asetazolamid ile kontrol edilmiştir. Asetazolamid 1:1 oranında enzimle inkübe edildiğinde p-NPA aktivitesinde % 100 inhibisyona neden olur. Bu durum, farklı inhibitör derişimleri ile enzimi inkübe ettikten sonra p-NPA hidroliz aktivitesinin ölçülmesi ile saptandı. Şekil 2.5'den görüleceği gibi [In]/[BCA II] oranın 1 olduğu durumda enzim hemen hemen % 100 inhibe olmaktadır.

Dört farklı substrat derişimi kullanılarak p-NPA hidroliz aktivitesinin inhibisyonu saptanmış ve her seferinde % 77-79 arası değerler bulunmuştur.

Metil piridil karbonatlardan 2- ve 3- izomerlerin hidrolizi karbonik anhidraz tarafından etkin bir şekilde katalizlenirken, 4-izomerin hidrolizi enzimden etkilenmez (104). M4PC'nin başlangıçta sentezlenip çalışma kapsamına alınmasının nedeni siyanojen ile muameleden sonra enzimin bu substrata karşı davranışında bir farklanma olup olmadığının saptanmasıydı. Pocker ve Janjic (126) karbonik anhidrazı akrolein ile muamele ettikten sonra p-NPA ve asetaldehit substratlarına karşı aktivite artışı saptamışlardır. Benzer şekilde Kirley (113), tavşan eritrosit karbonik anhidraz enzimini siyanojenle muamele ettikten sonra hidrataz ve esteraz aktivitelerinde artış saptamıştır. Bu çalışmalar göz önüne alınarak, M4PC da çalışma kapsamına alınmış ancak enzimin siyanojenle muameleden sonra da bu substrata karşı aynı şekilde davrandığı tespit edildiği için bu substrat daha sonraki deneylerin dışında bırakılmıştır.

M3PC, karbonik anhidraz tarafından M2PC'a göre daha etkin katalizlenir (104). Asetazolamid, M2PC hidrolizini kompetatif tarza inhibe ederken M3PC hidrolizini nonkompetatif tarzda inhibe eder. Aynı moleküle ait izomerlerin hidrolizinin aynı enzimle ve aynı inhibitörle farklı tarza inhibe edilmesi bu iki izomerin enzime bağlanma bölgelerinin biraz farklı olduğu izlenimini vermektedir. M3PC için bu çalışmada saptanan inhibisyon değeri % 99 iken M2PC için % 86 olması da bu bağlanma bölgelerinin birbirinden hafifçe farklı olabileceği fikrini desteklemektedir.

Siyanojenle modifiye edilmiş BCA II'nin karbondioksiti hidrasyon aktivitesinin değişmediği rapor edilmiştir (113). Asetaldehitin karbonik anhidrazla katalizlenmiş hidrasyonu karbondioksitinkine benzer tarzda gerçekleşir. Bu iki substrat için aktif bölgenin aynı olduğu öne sürülmektedir (85). Asetazolamid, asetaldehitin hidrasyonunu da nonkompetatif olarak inhibe eder. Bu çalışmada BCA II enzimi ile asetaldehitin hidrasyonu reaksiyonunun siyanojen modifikasyonundan etkilenmediği saptanmıştır. Bu sonuç, karbondioksit ve asetaldehitin enzimin aynı bölgesine bağlandıkları ve aynı mekanizma ile ürüne dönüştürüldükleri iddiasını desteklemektedir.

Karbonik anhidrazın katalitik etkinliği, turnover sayıları göz önüne alındığında, aldehit molekülünün büyüklüğü ile ters orantılıdır (86). Piridinkarboksialdehitlerin karbonik anhidraz tarafından katalizlenen hidrasyon reaksiyonları da bu kurala uyarlar. Bu aldehitler enzim tarafından daha az etkinlikle fakat daha sıkı bağlanma ile hidrasyona uğrarlar. Sıkı bağlanmaya piridinkarboksialdehitlerin içerdiği azot atomunun enzimin aktif merkezindeki çinko atomuna koordine olmasının neden olduğu sanılmaktadır. Siyanojenle muamele edilmiş BCA II enziminin 2-PA, 3-PA ve 4-PA hidrasyon aktivitelerinde sırasıyla yüzde 8, 8 ve 9 inhibisyon ölçülmüştür. 2- ve 4- piridinaldehitlerin BCA II ile hidrasyon reaksiyonları asetazolamid ile, asetaldehit ve karbondioksitle gözlenenin aksine, kompetatif olarak inhibe edilir. Bu da, asetaldehit ve karbondioksit hidrasyon reaksiyonlarında hiç inhibisyon gözlenemezken piridinaldehitlerin hidrasyonunda düşük bir inhibisyon ölçülmesini açıklayabilir. Bu gözlemlerden, daha önce iddia edildiği gibi (86) enzimin bir dizi substratın

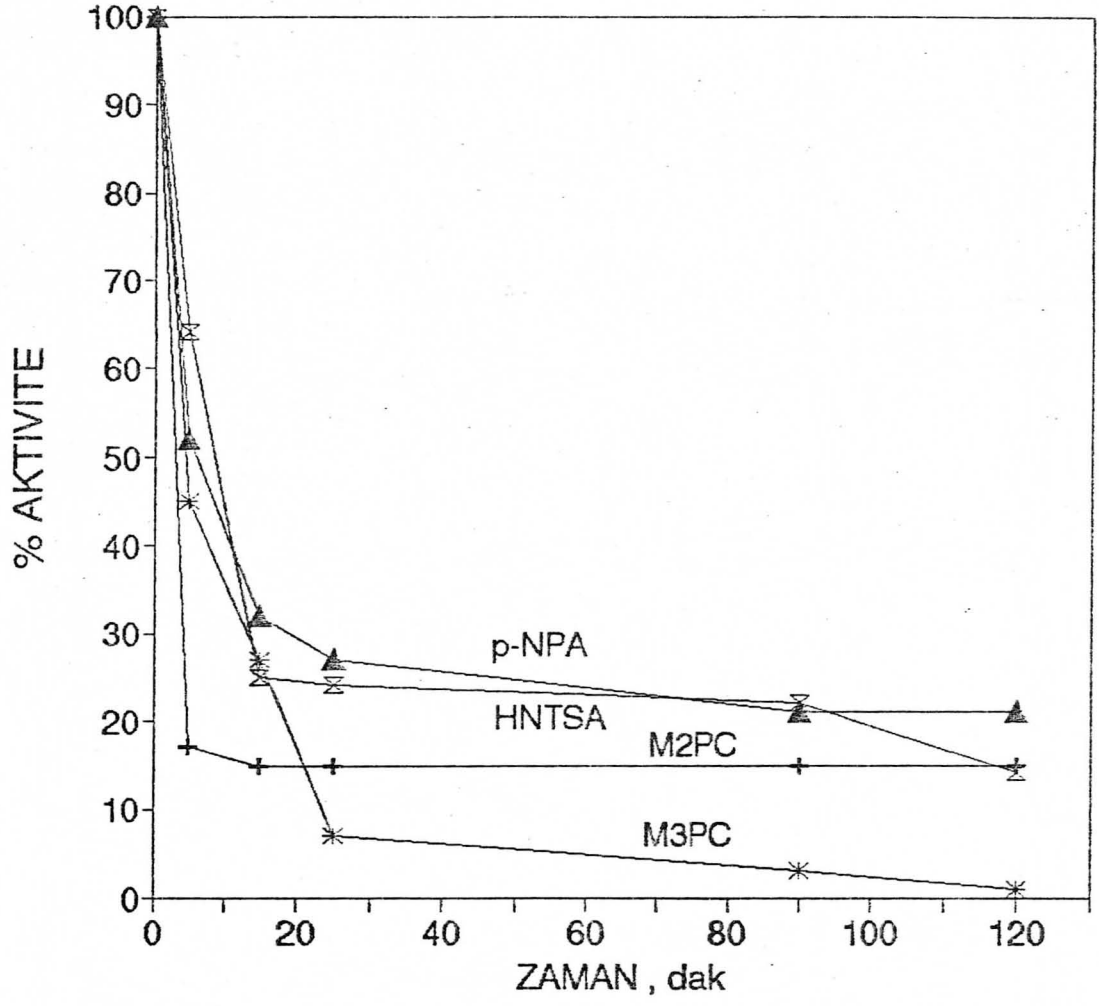
hidrasyonunu katalizlerken bu işlemi farklı yollarla yaptığı sonucuna varılabilir.

Bir siklik sulfonat olan HNTSA, incelenen diğer substratlara göre farklı bir yapı gösterdiği için çalışma kapsamına alınmıştır. HNTSA'nın hidroliz reaksiyonu da asetazolamid ile nonkompetatif olarak inhibe edilir. Moleküldeki benzen halkasına bağlı nitro grubunun enzime bağlanmada önemli olduğu bildirilmiştir (102). Siyanojenle muamele edilmiş BCA II'nin HNTSA hidroliz aktivitesinde kontrol BCA II'e göre % 84 inhibisyon gözlenmiştir.

Çalışılan tüm substratlara ait gözlenen inhibisyon değerleri toplu olarak çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Karbondioksit inhibisyonu bu çalışmada incelenmemesine rağmen enzimin esas substratı olduğu için referans olması bakımından listeye eklenmiştir. Çizelgede yer alan ilk beş substrat BCA II enziminin hidrasyon aktivitesi ile son dört substrat ise hidroliz aktivitesi ile ilgilidir. Çizelgeden görüleceği gibi siyanojenle muamele edilmiş BCA II enziminin hidrasyon aktivitesinde ya hiç değişme olmamakta veya çok az değişme gözlenmektedir. Buna karşılık hidroliz aktivitesi büyük ölçüde inhibe olmaktadır.

Enzimin hidroliz aktivitesinin inhibisyonu muamele sırasındaki siyanojen derişimi ve muamele süresine bağlı olarak incelenmiştir. Muamele sırasında $[C_2N_2]/[Enzim]$ oranı 1000 olduğunda maksimum inhibisyon gözlenmiştir. Daha düşük siyanojen derişimlerinde inhibisyon yüzdesi de düşük olmakta ve her substrat için farklı bir değer göstermektedir.

Her substrat için inhibisyonun muamele süresine bağımlılığı şekil 3.1 de görülmektedir. Bu grafiğin kayda değer sonucu, BCA II enziminin siyanojenle modifikasyonunun iki fazlı olduğunun görülmesidir. İnhibisyonun büyük kısmı ilk 5 dakikada ortaya çıkmakta, daha sonra yavaş bir artma gözlenerek 120 dakika sonunda maksimuma ulaşmaktadır.



Şekil 3.1 BCA II'nin C_2N_2 ile inhibisyonunun zamana bağımlılığı

Çizelge 3.1 Siyanojenle muamele edilmiş BCA II enziminin farklı substratlara göre hidrasyon ve hidroliz aktivitesinde gözlenen inhibisyon değerleri.

<u>Substrat</u>	<u>% inhibisyon</u>	<u>Referans</u>
CO ₂	0	(113)
CH ₃ CHO	0	Bu çalışma
2-PA	8	"
3-PA	8	"
4-PA	9	"
p-NPA	79	"
M2PC	86	"
M3PC	99	"
HNTSA	84	"

İnhibisyonun siyanojen derişimine ve muamele süresine bağımlılığının incelenmesi ile elde edilen sonuçlar, enzimde siyanojen tarafından modifikasyona uğratılan birden çok (iki, belki de daha çok) bölgenin olabileceğini düşündürmektedir. Elektrostatik kuvvetlerle bir arada duran iyonik grupların (salt bridges) oluşturduğu düşünülen bu bölgeler proteinlerde birden çok bulunabilir. Bu bölgelerden birisinin siyanojene karşı daha yüksek afinite gösterdiği ve kovalent bağlanmanın, dolayısıyla modifikasyonun hemen oluştuğu; ancak bu modifikasyonun enzimin tamamen inhibisyonuna neden olmadığı, daha düşük afiniteli diğer bölgelerin de zamanla modifikasyona uğrayarak inhibisyonun tamamlandığı varsayılabilir.

Siyanojenle modifiye edilen BCA II, +4°C'de günlerce saklanıp tekrar aktivitesi ölçüldüğünde inhibisyonun devam ettiği saptanmıştır. Ayrıca, nötral pH'da defalarca diyaliz edilse bile enzimin aktivitesi geri gelmemektedir. Bu gözlemlerle, enzimde oluşan modifikasyonun kovalent karakterli olduğu sonucuna varılmıştır.

İncelenen substratların siyanojenle inhibe edilen hidroliz reaksiyonlarına ait hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri çizelge 3.2'de toplu olarak verilmiştir. Aynı çizelgede kontrol ve inhibe enzimlere ait turnover sayıları da hesaplan

mıştır. Beklenildiği gibi inhibe enzime ait turnover sayıları oldukça düşüktür. Kontrol enzime ait turnover sayılarından en büyüğünün HNTSA substratının hidrolizi reaksiyonuna ait olması daha önceki rapora uygunluk göstermektedir (102). Yine M3PC substratının hidrolizi reaksiyonuna ait turnover sayısının M2PC'ninkine göre çok büyük olması (kontrol BCA II göz önüne alındığında) literatüre uygunluk göstermektedir (104). Siyanojenle modifikasyondan sonra V_{\max} son derece düşük değerler alırken gözlenen K_m değerlerindeki değişim belli bir kuralı takip etmemektedir. Lineweaver-Burk grafikleri ve hesaplanan K_m (gözlenen) değerleri siyanojeni Dixon ve Webb'in tanımına göre (127) karışık tip (mixed-type) inhibisyona neden olan inhibitörler sınıfına koymaktadır. Karışık inhibitör kinetik olarak, $1/v$ ye karşılık $1/[S]$ grafiği çizildiğinde, inhibe olan ve olmayan reaksiyonlara ait lineer doğruların y ekseninin solundaki herhangi bir yerde (x ekseninin üzeri hariç) kesiştiği inhibitör olarak tanımlanmıştır. Bu durumda inhibisyondan sonra V_{\max} değeri daima düşerken K_m (gözlenen) değeri artmış veya azalmış olabilir. Bu tip inhibisyonun kinetiği oldukça karmaşıktır.

Çizelge 3.2. Siyanojenle modifikasyondan sonra BCA II aktivitesinde yüksek oranda inhibisyon gözlenen substratlara ait Kinetik parametreler.

Substrat	Enzim	E_0 (M)	V_{\max} (M/dak)	V_{\max}/E_0 (sn ⁻¹)	K_m (M)
p-NPA	BCA II	$1,6 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-4}$	3780	$9,44 \times 10^{-5}$
p-NPA	CBCAII	$1,6 \times 10^{-6}$	$3,68 \times 10^{-7}$	12	$1,06 \times 10^{-4}$
M2PC	BCA II	$7,6 \times 10^{-6}$	$3,80 \times 10^{-6}$	30	$6,3 \times 10^{-4}$
M2PC	CBCAII	$7,6 \times 10^{-6}$	$1,98 \times 10^{-7}$	2	$6,9 \times 10^{-4}$
M3PC	BCA II	$3,4 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-5}$	492	6,06
M3PC	CBCAII	$3,4 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-7}$	5	$3,60 \times 10^{-1}$
HNTSA	BCA II	$3,42 \times 10^{-7}$	$8,37 \times 10^{-4}$	14682	2,85
HNTSA	CBCAII	$3,42 \times 10^{-7}$	$4,6 \times 10^{-5}$	8100	$2,75 \times 10^{-1}$

Enzimin esteraz aktivitesini etkileyip hidrataz aktivitesini etkilemeyen modifikasyonun aydınlatılması için önce molekülün bazı özellikleri araştırıl

di. Siyanojen ile muameleden sonra sudaki çözünürlüğünün azalması, protein modifikasyonu sonucu hidrofobik karakterin arttığı şeklinde yorumlandı. Daha önceki bir çalışmada siyanojen ile modifikasyonun proteinin elektroforetik mobilitesini etkileyip etkilemediği araştırılmış ve SDS-PAGE ile incelendiğinde kontrol ve modifiye enzimlerin davranışında bir değişiklik gözlenmediği rapor edilmiştir (113).

Kontrol ve modifiye enzimlerin UV-VIS spektrumları (Şekil 2.19) bantların konumları açısından birbirinin aynı olmasına rağmen bantların şiddetinde, modifiye enziminkinin daha düşük olması şeklinde bir fark gözlemlendi. Buradan molekülün absorbtivitesinde hafif bir düşme olduğu sonucuna varılabilir.

Siyanojenle muamele edilmiş BCA II'nin sıvı kromatografisindeki davranışı da benzer bir özellik göstermektedir. Asetonitril/su çözgen sistemi kullanılarak C-18 kolonda yürütülen örnek, kontrol enzime göre daha büyük tutulma zamanı göstermekte ve pikin şiddeti kontrolünkine göre daha düşük görülmektedir (Şekil 2.20). Aradaki fark, kontrol ve modifiye enzim çözeltileri birlikte enjekte edildiğinde çok daha çarpıcı olarak ortaya çıkmakta ve enzimin kromatografik özelliklerinin siyanojen modifikasyonundan sonra değiştiğini açıkça göstermektedir. Tutulma zamanının kontrolünkine göre biraz daha büyük olması modifiye proteinin hidrofobik karakterinin arttığı şeklinde yorumlanabilir.

Tripsin, proteinleri lizin ve arjinin birimlerinden hidrolize uğratar. Kontrol ve siyanojenle modifiye edilmiş BCA II enzimlerinin tripsin ile muameleden sonra hidroliz ürünleri arasındaki fark araştırılmıştır. Ancak, burada karşılaşılan zorluk standart tripsin hidrolizinde ilk adım olan proteinin denature edilmesi olmuştur. Bölüm 2.7.4'de belirtildiği gibi siyanojenle oluşan modifikasyon nukleofillere karşı dayanıksızdır. pH 7,2 günlerce saklanmasına rağmen geri gelmeyen aktivite, enzimi pH 10 ortamına alıp tekrar pH 7,2'ye getirildiğinde, geri kazanılmaktadır. O halde, tripsin hidrolizinden önce denaturasyon için kullanılan pH 10,5 ortamı oluşan modifikasyonu da ortadan kaldıracaktır. Bu yüzden enzimin, oluşan modifikasyona zarar vermeksizin,

daha ılımlı koşullarda denature edilebileceği öngörüldü. Bunun için % 70 etanol çözeltisinde ısıtma yöntemi kullanıldı (Day, sözlü görüşme). Daha sonra ısıtmanın da gerekli olmadığı, proteini % 70 etanol çözeltisi içinde 1.5-2 saat karıştırmanın denaturasyonu gerçekleştirdiği görüldü.

Kontrol ve modifiye enzimin tripsin ile sindirildikten sonraki kromatogramları arasında önemli bir fark gözlenemedi (Şekil 2.21). Piklerin tutulma zamanlarının hemen hemen aynı buna karşılık şiddetlerinin farklı olduğu saptandı. Bu şiddet farklılığı hemen hemen her pikte görüldüğü için bunların ayrılıp saflaştırılması yerine kromatogramlarda daha belirgin farkların görülebileceği başka yöntemler arandı.

Bir serin proteaz olan V8 proteaz, kullanılan tampon çözeltiye bağlı olarak, proteinleri glutamat birimlerinin karboksil ucundan veya Glu-x, Asp-x birimlerini yine karboksil ucundan koparır. Siyanojenle modifikasyon sonunda enzimin bir Glu eksik amino asit analizi göstermesi glutamik asidin muamele sonunda bir nukleofil ile çapraz bağlanmaya girdiğini düşündürmektedir (113). Bir Glu eksik olan proteinin hidroliz sırasında farklı bir kopma göstereceği varsayılarak V8 proteaz ile sindirilmiş kontrol ve modifiye enzimlerin kromatogramları incelendi. Şekil 2.22 ve 2.23'te görüldüğü gibi kromatogramlar arasında anlamlı bir fark gözlenememektedir.

Hem tripsin hem de V8 proteazla gerçekleştirilen hidroliz sonucunda modifiye enzimin kontrolden daha farklı bir kromatogram vermemesi, ya oluşan modifikasyonun hidroliz sırasında herhangi bir nedenle ortadan kalktığı veya oluşan bağların peptidlerin büyük yapısına oranla çok küçük değişiklikler olması nedeniyle tayin edilemediği şeklinde açıklanabilir.

Daha önceki çalışmalarda siyanojenin proteinlerde ve model bileşiklerde tuz köprüleri (salt bridges) ile ilişki kurarak bunları kovalent bağlara dönüştürdüğü açıklanmıştır (111-117).

Siyanojenin enzimdeki modifikasyonu, karbonik anhidraz molekülünde birbirine yeteri kadar yakın bulunan glutamin ve histidin amino asitlerinin yan zincirleri arasında gerçekleştirdiği önerilmiştir (112). Siyanojenin kovalent bağ

oluşturduğu tuz köprüsünün (salt bridge) nukleofil kısmı için aday olabilecek serin, treonin, lizin ve triptofan gibi aminoasitlerin kimyasal modifikasyonu enzimin hidrataz ve esteraz aktivitesinde inhibisyona neden olmaz. Buna karşılık histidinin kimyasal modifikasyonu enzimi inhibe eder. Bu nedenle histidinin siyanojenle modifikasyonda rol aldığı düşünülmektedir.

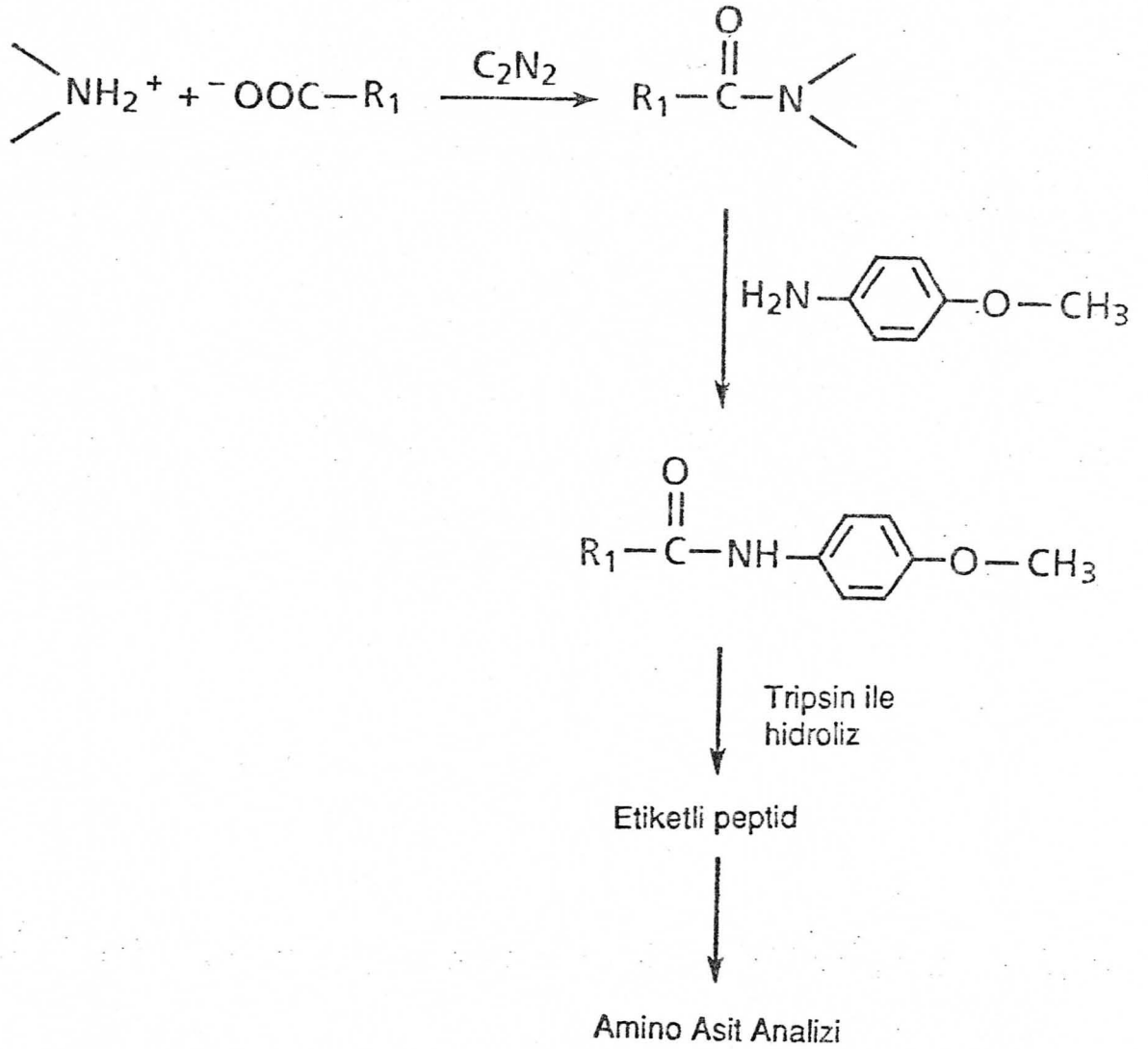
Siyanojenle modifiye edilmiş enzimin pH 10'da bir müddet tutulmasıyla aktivitenin geri gelmesi oluşan bağın nukleofillere karşı dayanıksız olduğunu göstermektedir. Bu özellikten yararlanılarak kovalent bağın oluşmasında rol alan amino asitler tayin edilmeye çalışılmıştır. Kirley (113), siyanojen modifikasyonunda rol alan en az bir glutamin olduğunu göstermiştir. Ghenbot (117), işaretli glisin etilester (^{14}C -GEE) kullanarak bu modifikasyonu aydınlatmaya çalışmıştır. Sözü edilen çalışmada enzim, siyanojenle modifiye edildikten sonra ^{14}C -GEE ile muamele edilmiş ve reaktifin fazlası daha sonra ultrafiltrasyon ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra enzim, tripsin ile hidroliz edilmiş ve sıvı komatografisinden toplanan fraksiyonların radyoaktivitesi sayılarak bağlanmanın olduğu peptidler ayrılmış ve amino asit analizleri yapılmıştır. Buna göre üç peptidin ^{14}C -GEE bağlanması gösterdiği, bunlardan ikisinin aktif merkeze ait aminoasitleri içerdiği bildirilmiştir. Ancak, oluşan amid bağının bir karboksil ile bir imadazol grubu arasında olabileceği gibi bir karboksil ile bir guanidino grubu arasında da olabileceği savunulmaktadır.

Enzimde siyanojenin oluşturduğu kovalent değişiklik(ler) in incelenebilmesi için GEE'e benzer bir nukleofil arandı. Kullanılacak madde iyi bir nukleofil, buna karşılık zayıf baz olmalıydı. Zira, kuvvetli bazik karakter taşıyan bir nukleofil reaksiyon karışımının pH'sını 10'un üzerine çıkaracak ve siyanojen modifikasyonunun yüksek pH'daki dayanıksızlığı nedeniyle bağ açılması, kullanılan nukleofil nedeni ile değil, hidroksit iyonları yüzünden olacaktır. Nukleofil olarak N-metilhidroksiamin istenilen özellikleri taşımakla beraber ^{14}C -etiketli N-metilhidroksiaminin sentezinde karşılaşılan zorluklar nedeniyle kullanılmadı. Metilamin'in nukleofil olarak kullanılabileceği düşünüldü. Ancak metilamin kuvvetli bazik özellik göstermesi nedeniyle

reaksiyon susuz ortamda metilenkürür çözgeninde gerçekleştirildi. Siyanojenle muamele edilen BCA II bölüm 2.7.4'te anlatıldığı şekilde metilamin ile muamele edildikten sonra enzim pH 10 ortamına getirilse bile aktivite tamamen geri gelmediğinden bağlanmanın gerçekleştiği kabul edildi. Daha sonra ¹⁴C-etiketli metilamin ile deneyler tekrar edilerek radyoaktivite izlenmeye çalışıldı ise de nonspesifik bağlanmanın fazla oluşu nedeniyle anlamlı bir sonuç elde edilemedi.

Uygun bir nukleofil bulunması çabaları akla p-anisidinin kullanılabilirliğini getirdi. p-Anisidin, sulu çözeltisinin pH'ı 7,84 olması nedeniyle istenen zayıf bazik karakteri taşımaktadır. 300 nm'de kuvvetli absorbansa neden olması sebebiyle bağlanmanın proteinin absorbans yapmadığı bu dalga boyunda kolayca izlenebileceği düşünüldü. Düşünülen bağlanma modeli şekil 3.2'de görülmektedir. Bölüm 2.7.5 'de anlatıldığı şekilde p-anisidin ile muamele edilen modifiye BCA II'nin UV-VIS spektrumunda görülen 320 nm'deki absorbans, kontrol enzimin spektrumunda görülmeyince (şekil 2.27) bağlanmanın gerçekleştiği varsayıldı. Gerçekten, daha sonra tripsin ile sindirilen modifiye BCA II nin kromatogramının kontrole göre farklılığı oldukça çarpıcıdır (şekil 2.28). 320 nm'de dedeksiyonu yapılan kromatogramlardan kontrol enzime ait olanında hemen hemen hiç absorbans yapan tür gözlenmezken modifiye enzime ait kromatogramda pekçok pik gözlenmektedir. Enzime bağlandığı varsayılan p-anisidin sayısı molekülün diğer birimlerinin yanında oldukça az olduğu için bu piklerin dedeksiyonu için yüksek hassasiyette çalışıldı. Bu kromatogramdaki en büyük üç pik ayrı fraksiyonlar halinde toplanarak mümkün olduğunca temizlendi ve amino asit analizi uygulandı. Amino asit analizleri piklerin yeterince saf olmadığını gösterdi. Defalarca uygulanan saflaştırma işlemlerine rağmen bu analizlerden anlamlı bir sonuç alınamadı. Ancak bu üç pikin, Ghenbot (117) tarafından izole edilen ve nukleofilik bağlanmaya yatkınlık gösteren üç peptide ait olabileceği üzerinde duruldu.

Bazı inhibitörlerin BCA II enzimini siyanojenle modifikasyona karşı koruyucu etkisi araştırıldı. Asetazolamid inhibitörünün enzime Zn üzerinden



Şekil 3.2. p-Anisidin'in CBCA II'ye öngörülen bağlanma modeli

bağlanarak inhibisyona neden olduğu bilinmektedir. Salamid inhibitörünün ise bir disulfonamid olması nedeniyle Zn'ya bağlanmanın yanında diğer sulfonamid grubu ile His 64'e bağlandığı, hatta diğer amino grubu ile de His 118 ile ilişkide olduğu X-ışını çalışmaları ile belirtilmiştir (82). His 64'ün aktif merkezde yer alması ve katalitik mekanizmada görev yapması nedeniyle protein yapısında önemli bir yeri vardır. Bu amino asidin karbondioksiti hidrasyon mekanizması sırasındaki görevi ise tartışılmaktadır. Zira His 64'ün site-directed mutagenesis ile başka amino asitlerle yer değiştirmesi CO₂ aktivitesini biraz etkilemekte fakat enzim hidrasyon aktivitesini yine de büyük bir hızla sürdürebilmektedir.

Siyanojenle modifikasyon sonrasında oluşan kovalent bağlardan bir tanesinin bir bileşenin His 64 olabileceği, bu durumun enzimin esteraz aktivitesini inhibe edeceği fakat hidroliz aktivitesini etkilemeyeceği düşünülerek bu durumun aydınlığa kavuşturulabilmesi için enzim asetazolamid ve salamid ile ayrı ayrı etkileştirildikten sonra siyanojen modifikasyonuna tabi tutuldu. Şekil 2.29'da asetazolamid varlığında siyanojen ile modifiye edilen BCA II nin p-NPA ve HNTSA hidroliz aktiviteleri görülmektedir. Görüldüğü gibi asetazolamidin varlığı enzimi siyanojen modifikasyonuna karşı korumaktadır. Bu aslında bu deneyin planlanmasından beklenen sonuçtur. Zira asetazolamid enzime Zn üzerinden bağlanmakta; siyanojen modifikasyonunda rol alan gruplar serbest durumda bulunmaktadır. Şekil 2.30'da ise salamid varlığında siyanojen ile muamele edilen BCA II'nin p-NPA ve HNTSA hidroliz aktiviteleri görülmektedir. Salamid, enzimi siyanojen modifikasyonuna karşı korumaktadır. Aktivitenin kontrol BCA II'ninkine göre biraz inhibe edilmiş olması siyanojenin enzimde birden çok kovalent bağın oluşmasına neden olduğunu düşündürmüştür. Öngörüldüğü gibi; His 64'ün salamidle korunması sonucu bu aminoasit üzerinden modifikasyon gerçekleşmemekte, ancak hala serbest halde bulunan başka gruplar üzerinden modifikasyon kısmen gerçekleşmektedir. Bu da enzimde bir miktar inhibisyon gözlenmesine neden olmaktadır.

Bu çalışmadan çıkarılan sonuçlar ve ilerideki çalışmalar için öneriler şöyle özetlenebilir:

1. BCA II'nin siyanojenle modifikasyonu enzimin hidrataz aktivitesini etkilemezken, esteraz aktivitesini inhibe etmektedir. Bu nedenle enzimin hidrataz ve esteraz aktivitelerinden farklı bölgeler sorumludur.
2. Siyanojen modifikasyonunun muamele süresi ile olan ilişkisi proteinde modifikasyona farklı cevap veren iki (veya daha fazla) modifikasyon bölgesi olduğunu düşündürmektedir.
3. Siyanojenle modifiye edilmiş BCA II'nin p-anisidin ile etiketlenmesi özgüllük göstermektedir. Bu nükleofilin bağlandığı aminoasitlerin belirlenmesi siyanojen modifikasyonunun aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.
4. Salamid'in enzimi siyanojen modifikasyonuna karşı korunması, His 64'ün modifikasyonda rol oynadığı sonucunu getirmektedir. His 64'ün aktif merkezdeki konumu insan karbonik anhidraz II enzimi için X-ışını analizleri ile belirlenmiştir. Ancak böyle bir çalışma sığır karbonik anhidraz II için yapılmamıştır. Genellikle, kimyasal modifikasyon çalışmalarında BCA II, X-ışını yapı analizleri için ise HCA II ile çalışılmıştır. BCA II'nin de X-ışınları ile yapısının aydınlatılması birbirine tuz köprüsü (salt-bridge) oluşturacak kadar yakın olan aminoasitlerin belirlenmesinde yardımcı olacaktır. Ayrıca, BCA II'nin moleküler yapısı bilgisayar simülasyonu ile incelenerek en kararlı durumda herbir aminoasit biriminin çevresine göre durumu araştırılabilir. Böyle bir çalışma bu çalışmanın yapıldığı laboratuvarında başlatılmıştır. Uzun vadeli bir çalışma olarak site-directed mutagenesis ile His 64'ü değiştirilmiş BCA II siyanojenle modifikasyona uğratarak aktivitesindeki değişimler incelenebilir.

EK-1.İNHİBİSYONUN HESAPLANMASI

Bu çalışmanın bütün bölümlerinde açıklanan inhibisyon değerleri BAĞIL İNHİBİSYON cinsinden hesaplandı.

Bunun için kontrol ve siyanojenle muamele edilmiş enzimin katalizlediği reaksiyon çözeltilerinin absorbans değerleri ürünün özelliğine göre absorbans artması veya azalması şeklinde ölçüldükten sonra her reaksiyon için zamana göre oluşan ürün grafiği çizildi. Bu grafiğin doğrusal olan kısmının eğimi v ilk hızı verir.

Kontrol ve siyanojenle muamele edilmiş enzimlere ait ilk hız değerleri v_0 ve v_i olarak ölçüldüğünde inhibisyon sonunda geriye kalan aktivite v_i/v_0 olarak hesaplanır.

Bu değer 100 ile çarpılıp 100 den çıkarıldığında elde edilen değer % inhibisyon değeridir

KAYNAKLAR

1. Meldrum, N.U.Roughton, F.J.W., *J.Physiol.*, 75.3P (1932)
2. Keilen, D., Mann, T., *Biochem. J.*, 34, 1163 (1940)
3. Nyman, P.O., *Biochem. Biophys. Acta.*, 52,1 (1961)
4. Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A.S., Gibbons, B.H., Edsall, J.T., *J.Biol.Chem.*, 239, 1065 (1964)
5. Rickli, E.E., Edsall, J.T., *J.Biol Chem.*, 237, PC258 (1962)
6. Khalifah., R.G., *J.Biol.Chem.*, 246, 2561 (1971)
7. McKinley, D.N. Whitney, P.L., *Biochim.Biopyhys Acta*, 445, 780 (1976)
8. Wistrand, P.J., *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429, 195 (1984)
9. Pocker, Y., Sarkannen, S., *Adv.Enzymol.*, 47, 149-270 (1978)
10. Graham.D., Reed, M.L., Patterson, B.D.Hockeley, D.G., Dwyer, L.R., *Ann.N.Y.Acad. Sci.*, 429, 222 (1984)
11. Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., Goodman, M., In: "Isozyme", A.R.Liss(Ed.), Vol.7, p79, New York (1983)
12. Kernohan, J.C., *Biochim.Biophys. Acta*, 96, 304 (1965)
13. Sciaky, M., Limozin, N., Filippi-foveau, D., Gulian, J.M., Dalmasso, C., Laurent, G., *Crit. Rew.*, (Series D), 279, 1217 (1974)
14. Filippi-Foveau, D., Sciaky, M., Laurent, G., *Crit.Rew.*, (Series D), 278, 959 (1973)
15. Anderson, B., Nyman, P.O., Strid, L., *Biochem, Biophys. Res.Comm.*, 48, 67a (1972)
16. Henderson, L.E., Henrickson, D.Y., Nyman, P.O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 52, 1388 (1973)
17. Kuang-Tzu, D.L., Deutsch, H.P., *J.Biol.Chem.*, 248, 1985 (1973)
18. Filippi-Foveau, D., Sciaky, M., Laurent, G., *Biochimie*, 278, 959 (1974)
19. Lindskog, S., *Biochim. Biophys. Acta.*, 39, 218 (1960)
20. Kannan, K.K., Nostrand, B., Fridborg, K., Lougren, S., Ohlson, A., Petef, M., *Proc., Natl.Acad.Sci., USA*, 72, 51 (1975)
21. Kannan, K.K., Liljas, a., Waara, I., Bergsten, P.- C., Lougren, S., Strand berg, B., Bengtsson, U., Carlbom, U., Fridborg, K., Jarup, L., Petef, M., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 36, 221 (1971)
22. Liljas, A., Kannan, K.K., Bergsten, P.-C., Waara, I., Fridborg.K., Strandberg, B., Carlbom, U., Jarup., L., Lougren, S., Petef, M., *Nature New. Biol.*, 23, 131 (1972)
23. Steiner, H.,Jonsson, B.-H., Lindskog, S., *Eur. J. Biochem.*, 59, 253 (1975)
24. Henrigues, O.M., *Biochem., J.*, 200, 1 (1928)
25. Edsall, J.T., Wyman, J., In "Biophysical Chemistry", Ch.10, Acad.Press., New York (1958)
26. Coleman, J.E., In: "Progress in Bio-organic Chemistry", E.T.Kaiser, F.J. Kezdy, (Eds), Vol.1, p., 159 (1971)
27. Herbert, J.D., Coulson, R.A., *Comp.Biochem. Physiol.*, 24B, 46B (1972)
28. Herbert, J.D., *Comp.Biochem.Physiol.*, 46B, 229 (1973)
29. Coulson, R.A., Hernandez, T., In "Comperative Biochemistry of Nitrogen Metabolism", J.W. Campbell, (Ed.) Vol.2, p. 639. Academic Press, London (1970)

30. Coulson, R.A., Hernandez, T., In "Chemical Zoology", M.Florkin and B.T.Scheer, (Eds) Vol IX, p.217, Academic Press, New York (1974)
31. Wood, H.G., Barden, R.E., Rev.Biochem., 46, 385 (1977)
32. Herbert, J.D., Coulson, R.A., Hernandez, T., Comp.Biochem. Physiol., 75A (No 2),185 (1983)
33. Coulson, R.A., Hernandez, T., Alligator Metabolism: Studies on Chemical Reactions in Vivo, Pergamon Press, Oxford (1983)
34. Herbert, J.D., Coulson, R.A., Ann.N.Y.Acad. Sci., USA, 429, 525 (1984)
35. Maren, T.H., Ellison, A.C., Mol.Pharmacol., 3, 503 (1967)
36. Effros, R.M., Chang, R.S.Y., Silverman, H., Science, 199, 427 (1978)
37. Kloche, R.A., J.Applied Physiol., 48, 927 (1980)
38. Crandall, E.D., O'Brasky, J.E., J. Clin. Invest., 62, 618 (1978)
39. Nioka, S., Henry, R., Fester, R.E., Fed.Proc., 42, 1265 (1983)
40. Enns, T., Science, 155, 44 (1967)
41. Longmuir, I.S., Forster, R.E., Woo, C.Y., Nature, 209, 393 (1966)
42. Ward, A.J., Robb, W.L., Science, 156, 1481 (1967)
43. Adamson, T.M., Waximan, B.P., In "Lung Liquids" Ciba Found. Symp., 38, 221 (1976)
44. Pucas, I., Ann.N.Y.Acad.Sci., 429, 587 (1984)
45. Valean, S., Vlaicu, R., Jonescu, I., Ann.N.Y.Acad. Sci., 429, 597 (1984)
46. Becker, B., Am.J.Ophthalmol., 337, 13 (1954)
47. Mareen, T.H., Invest.Ophthalmol., 15, 356 (1976)
48. Kernohan, J.C., Biochim.Biophys.Acta., 81, 346, (1964)
49. Khalifah, R.G., Edsal, J.T., Proc.Natl. Acad. Sci., USA, 69, 172 (1972)
50. Ward, R.L., Biochemistry, 8, 1879 (1969)
51. Magid, E., Biochim.Biophys.Acta., 151, 236 (1968)
52. Lindskog, S., Henderson, L.E., Kannan, K.K., Lijas, A., Nyman, P.O., Strandberg, B., In: "The Enzymes.", P.O.Boyer, (Ed) 3rd Ed. Vol.5, p.587, Academic Press, New York, (1971)
53. Lindskog, S., Struct.Binding (Berlin), 8, 153 (1970)
54. Eigen, M., Hamnes, G.G., Adv. Enzymol., 25, 1 (1963)
55. Alberty, R.A., Brookhaven Symp.Biol., No (15), 18 (1962)
56. Lindskog, S., Coleman, J.E., Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 70,2505 (1973)
57. Khalifah, R.G., Proc.Natl.Cad.Sci., USA, 70 (1986)
58. Prince, R.H., Wooley, P.R., Bio-organic Chemistry, 2, 337, (1973)
59. Jonsson, B.H., Steiner, H., Lindskog, S., FEBS Lett., 64, 310 (1976)
60. Silverman, D.N., Tu, C.K., J.Am.Chem.Soc., 97, 2263 (1975)
61. Rowlett, R.S., Silverman, D.N., J.Am.Chem.Soc., 104, 6737 (1962)
62. Liang, J.-Y., Lipscomb, W.N., Biochemistry, 26, 5293 (1987)
63. Liang, J.-Y., Lipscomb, W.N., Biochemistry, 27, 8676 (1988)
64. Liang, J.-Y., Lipscomb, W.N., Int.J.of Ouantum Chemistry, Vol XXXVI, 299 (1989)
65. Pocker, Y., Bjorkuist, D.W., Lindskog, Biochemistry, 16, 5998 (1977)
66. Simonson, I, Jonson, B.H., Lindskog, S., Eur. J.Biochem., 93, 409 (1979)
67. Lindskog, S., J.Mol.Catal., 23, 357 (1984)
68. Rowlet, R.S., J.Protein Chem., 3, 369 (1985)
69. Kannan, K.K., In "Biophysics and Phsiology of Carbondioxide", C.Bauer, G.Gros, and H.Bartels.(Eds), p.184. Spring.Verlag, Berlin (1980)

70. Campbell, I.D., Lindskog, S., White, A.I., *J.Mol. Biol*, 98, 597 (1975)
71. Silverman, D.N., Lindskog, S., *Acc. Chem.Res.* 21, 30 (1988)
72. Eriksson, E.A., Jones, T.A., Liljas., In "Zinc Enzymes", I.Bertini, C.Luchinant, W.Maret, M.Zeppazuer, (Eds), p.317, Birkhauser, Boston (1986)
73. Tu, C.K., Wynns, G.L., Silverman, D.N., *J.Biol.Chem.*, 256, 9446 (1981)
74. Forsman, C., Behravan, G., Jonsson, B.-H., Liang, Z.-W, Lindskog, S., Rem,X., Standstrom, J., Wallgren, K., *FEBS Lett.*, 229, 360 (1988)
75. Meldrum, N.U., Roughton, F.J.W., *J.Physiol. (London)*, 80, 113 (1933)
76. Roughton, F.J.W., Booth, V.H., *BJ* 40, 309 (1946)
77. Pocker, Y., Stone, J.T., *Biochemistry*, 7, 2936 (1968)
78. Maren, T.H., *Physiol. Rev.*, 47, 595 (1967)
79. Lindskog, S.NASA (Nati.Aeron.Space Admin.), *Spec.Publ. NASA SP-188*, 157 (1969)
80. Lindskog, S., *J.Biol.Chem.*, 238, 945 (1963)
81. Coleman, J.E., *Nature*, 214, 193 (1967)
82. Bergsten, P.C., Waara, I., Lövgren, S., Liljas, A., Kannan, K.K., Bengtsson, U., in "Oxygen Affinity of Hemoglobin and Red Cell Acid-Base Status. Alfred Benzon Symposium IV". Munksgaard, Copenhagen, and Academic Press, New York (1971)
83. Pocker, Y., Meany, J.E., 6 th International Congress of Biochemistry, Voly. IV, Abstrat 132, New York, N.Y., p327 (1964)
84. Pocker, Y., Meany, J.E., *J.Amer.Chem.Soc.*, 87, 1809 (1965)
85. Pocker, Y., Meany, J.E., *Biochemistry*, 4, 2535 (1965)
86. Pocker, Y., Meany, J.E., *Biochemistry*, 6, 239 (1967)
87. Pocker, Y., Meany, J.E., *J.Amer.Chem.Soc.*, 89, 631 (1967)
88. Pocker, Y., Dickerson, D.G., *Biochemistry*, 7, 1995 (1968)
89. Pocker, Y., Meany, J.E., *J.Phys.Chem.*, 74, 1486 (1970)
90. Pocker, Y., Meany, J.E., Dickerson, D.G., Stone, J.T., *Science*, 150, 382 (1965)
91. Pocker, Y., Stone, J.T., *J.Amer.Chem.Soc.*, 87, 5497 (1965)
92. Pocker, Y. Stone, J.T., *Biochemistry*, 6, 668 (1967)
93. Pocker, Y., Stone, J.T., *Biochemistry*, 7, 2936 (1968)
94. Pocker, Y., Stone, J.T., *Biochemistry*, 7, 3021 (1968)
95. Pocker, Y., Stone, J.T., *Biochemistry*, 7, 4139 (1968)
96. Pocker, Y., Storm, D.R., *Biochemistry*, 7, 1202 (1968)
97. Tahsian, R.E., Douglas, D.P., Yu, Y.L., *Biochim.Biophys. Res.Commun.*, 14, 256 (1964)
98. Armstrong, J.McD., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. Edsall, J.T., *J.Biol.Chem.*, 241, 5137 (1966)
99. Duff, T.A., Coleman, J.E., *Biochemistry*, 5, 2009 (1966)
100. Thorslund, A., Lindskog, S., *Eur. J. Biochem.*, 3, 119 (1967)
101. Verpoorte J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., *J.Biol.Chem.*, 242, 4221 (1967)
102. Kaiser, E.T., Lo, K.-W, *J.Amer.Chem.Soc.*, 91, 4912 (1969)
103. Pocker, Y., Watamori, N., *Biochemistry*, 10, 4843 (1971)
104. Pocker, Y., Guilbert, L.J., *Biochemistry*, 11, 180 (1972)
105. Brotherton, T.R., Lynn, J.W. *Chem. Revs.*, 59m, 841 (1959)
106. Lohrman, R., Orgel, L.E., *Science*, 161, 64 (1968)
107. Halmann, M., Schmidt, H.L., *J.Chem.Soc., C*, 1191 (1970)

108. Degani, C., Halmann, M., *Eur.Biophys. Cong. Proc. Ist.*, 4, 493 (1971)
109. Schwartz, A.W., Van der Ween, M., Bisseling, T., Chittenden, G.J.F., *Biosystems*, 5, 119, (1973)
110. Sanchez, R.A.Jr., Ferris, J.P., Orgel, L.E., *J. Mol. Biol.*, 38, 121 (1968).
111. Day, R.A., Mothersole, S., Madis, M.E., *Proc.Am.Chem.Soc., Mass-spectrom.*, 34, 36 (1986)
112. Kirley, J.W., Day, R.A., Kreishman, G.P., *FEBS Lett.*, 193, 145 (1985)
113. Kirley, J.W., *Doktora Tezi, University of Cincinnati*, (1985)
114. Tharp, R.M., *Doktora Tezi, University of Cincinnati*, (1987)
115. Gu, H., *Yüksek Lisans Tezi, University of Cincinnati*, (1987)
116. Day, R.A., Kirley, J., Tharp, R., Ficker, D., Strange, C., Ghenbot, G., In "Hugli, *Techingues in Protein Chemistry*", (Ed), T.E. Hugli. p.517, Academic Press Inc., San Diego (1989)
117. Ghenbot, G., *Doktora Tezi, University of Cincinnati* (1989)
118. Rothe, M., Rott, H., Mazaneh, J., In "Peptides, *Proceedings of the 14th European Peptide Symposium*", (Ed), A. Loffet. p.309, University of Brussels, Brussels (1976)
119. Kirley, J.W., Day, R.A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 126, 457 (1985)
120. Guilbert, L.J., *Doktora Tezi, University of Washington* (1971)
121. Perrin, D.D., *Aust. J. Chem.*, 26, 572 (1963)
122. Houmard, J., Drapeau, G.R., *Poc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 3506 (1972)
123. Drapeau, G.R., *Meth.Enzymol.*, 45, 469 (1976)
124. Drapeau, G.R., *Meth.Enzymol.*, 47, 189 (1977)
125. Pocker, Y., Beug, M.W., *Biochemistry*, 11, 698 (1972)
126. Pocker, Y., Jansic, N., *J.Biol.Chem.*, 263, 6169 (1988)
127. Dixon, M., Webb. E.C., in "Enzymes", *Acad.Press. New York*, p.340 (1979)