



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARBONİK ANHİDRAZ II'NİN
HOMOSİSTEİN VE METİLGLİOKSAL İLE
MODİFİKASYONUNUN ENZİM AKTİVİTESİ
VE ANTİJENİK ÖZELLİKLERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Neslihan SAĞLAM

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2024



BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

27.08.2024
Neslihan SAĞLAM
(İmza)



İthaf

Bu doktora tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.

Neslihan SAĞLAM



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tez çalışmam süresince her aşamada göstermiş olduğu hoşgörü, inanç ve desteğinden dolayı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER'e,

Doktora eğitimimde büyük emekleri olan Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyeleri Sayın emekli Prof. Dr. E. Edip KEHA ve Prof. Dr. Orhan DEĞER ile Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül V. KURAL, Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE, Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN ve Maçka Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ŞENTÜRK'e

Çalışmalarım sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, destek ve katkıları ile her zaman yanımda olan Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı Arş. Gör. Dr. Elif ŞAHİN, Arş. Gör. Dr. Sevil KÖR, Öğr. Gör. Dr. Nihal TÜRKMEN ALEMDAR'a ve tüm doktora ile yüksek lisans öğrenci arkadaşlarıma,

Çalışmalarım sırasında kendi imkan ve bilgilerini benden esirgemeyen, destek ve katkıları ile her zaman yanımda olan Biyofizik Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İsmail ABİDİN ile Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ersan KALAY, Doç. Dr. Tuba DİNÇER, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ ve Arş. Gör. Dr. İdris ER, Arş. Gör. Fikret YANAR, doktora öğrencisi Ümit UZUN, yüksek lisans öğrencisi Eda GÜNEŞ DEMİR, yüksek lisans öğrencisi Soner KARABULUT, Eczacılık Fakültesi, Doğal ve Bitkisel Ürünler Kozmetik Ürünler Anabilim dalı Arş. Gör. Gözde BOZDAL, Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve KTÜ Cerrahi Araştırmalar Merkezi personellerine,

Tüm aşamalarda varlıklarını hissettiğim daima yanımda olan sevgili aileme en içten dileklerle teşekkür ederim.

Neslihan SAĞLAM

Bu tez çalışması “Karbonik Anhidraz II'nin Homosistein ve Metilglioksal ile Modifikasyonun Enzim Aktivitesi ve Antijenik Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi” başlıklı, TDK-2021-9410 kodlu proje kapsamında KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP06) tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vii

TABLolar DİZİNİ

x

ŞEKİLLER DİZİNİ

xi

RESİMLER DİZİNİ

xii

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xiii

ÖZET

xv

ABSTRACT

xvi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Karbonik Anhidraz (CA)

3

2.2. Protein Posttranslasyonel Modifikasyonları

7

2.3. CA ve Posttranslasyonel Modifikasyonların İlişkisi

9

2.4. Glikasyon

10

2.5. Homosisteinilasyon

13

2.6. Metilglioksala Karşı Oluşan Antikorlar

16

2.7. İnsanlarda Homosisteinlenmiş Proteinlere Karşı Oluşan Otoantikorlar

17

2.8. Western blot

19

3. GEREÇ ve YÖNTEM

21

3.1. Gereç

21

3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

21

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ölçüm Kitleri

22

3.2. Yöntem

24

3.2.1. Karbonik Anhidraz II Enziminin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması

24

3.2.1.1. Afinite Kolon Jelinin Hazırlanması

24

3.2.1.2. Hemolizatın Elde Edilmesi

27



3.2.1.3. Saflaştırma Kolonun Hazırlanması ve Hemolizatin Kolona Uygulanması	27
3.2.1.4. Karbonik Anhidraz I Elüsyonu	28
3.2.1.5. Karbonik Anhidraz II Elüsyonu	29
3.2.2. Eluatlarda Protein Tayini	29
3.2.3. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Tayini	30
3.2.4. SDS-PAGE	32
3.2.4.1. SDS- PAGE Jellerinin Hazırlanması	33
3.3. Saflaştırılan hCAII Enziminin <i>in vitro</i> Modifikasyonları	34
3.3.1. hCAII Enziminin Metilglioksal ile Modifikasyonunun Doğrulanması	34
3.3.2. hCAII Enziminin Homosistein-tiyolakton ile Modifikasyonu	35
3.3.2.1. Western Blot Yöntemi	35
3.3.2.2. Ellman Yöntemi	35
3.3.2.3. Ellman Reaktifi Kullanılarak Serbest Sülfhidril (-SH) Grup Belirlenmesi	36
3.4. Diyaliz	36
3.4.1. Diyaliz Torbalarının Aktifleştirilmesi ve Diyaliz İşlemi	37
3.4.2. Saflaştırılan hCAII Enziminin Posttranslasyonel Modifikasyonları Sonrası Diyaliz İşlemi	37
3.5. Western Blot	38
3.5.1. Membranın Bloklanması ve Protein Bantlarının Görüntülenmesi	39
3.5.2. Metilglioksal ve Homosistein-tiyolakton ile Modifikasyonuna Bağlı Karbonik Anhidraz Esteraz Aktiviteleri	39
3.5.3. Metilglioksal ve Homosistein-tiyolakton Modifikasyonuna Bağlı Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi	41
3.6. Metilglioksal ve Homosistein-tiyolakton Modifikasyonuna Bağlı CAII'nin Antijenik Özelliklerinin Belirlenmesi	42
3.6.1. Fareler ve İmmünizasyon	42
3.6.2. Farelerde Karbonik Anhidraz Antikor Titrelerinin Belirlenmesi	43
3.6.3. Antikor Titreleri için ELISA Yöntemi	44
4. İstatistiksel Yöntemler	45
4. BULGULAR	47
4.1. Karbonik Anhidraz II'nin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması	47
4.2. İnsan Karbonik Anhidraz II'nin (hCAII) Saflığının Kontrolü	47
4.3. Karbonik Anhidrazın Modifikasyonu	48



4.3.1. hCAII'nin MGO ile Modifikasyonu	48
4.3.2. hCAII'nin HTL ile Modifikasyonu (Western blot yöntemi için)	49
4.3.3. HTL ile hCAII Enziminin Modifikasyonun Doğrulanması için Yapılan Modifikasyon İşlemi (Ellman Yöntemi için): Ellman Reaktifi Kullanılarak Serbest Sülfhidril (-SH) Grup Tahmini	49
4.4. Karbonik Anhidraz Esteraz ve Hidrataz Aktiviteleri	50
4.4.1. MGO ile Modifiye hCAII'nin Esteraz Aktivitesi	50
4.4.2. MGO ile Modifiye hCAII'nin Hidrataz Aktivitesi	51
4.4.3. HTL ile Modifiye hCAII'nin Esteraz Aktivitesi	51
4.4.4. HTL ile Modifiye hCAII'nin Hidrataz Aktivitesi	52
4.5. Farelerde saf hCAII ve Modifiye hCAII Formlarının İmmünizasyon Sonuçları	52
4.5.1. Farelerde saf hCAII, HTL ve MGO ile Modifiye hCAII'nin Antikor Titreleri	52
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
6. KAYNAKLAR	63
EKLER	69
EK 1.Etik Kurul Onay Belgesi	70
ÖZGEÇMİŞ	71



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	İnsan CA izoenzimlerinin kinetik ve yapısal özellikleri, normal doku dağılımları ve fonksiyonları	4
Tablo 2.	Tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemeler ile üretici firmaları	21
Tablo 3.	Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar	22
Tablo 4.	Wilbur-Anderson metoduna göre yapılan hCAII enzim aktivitesi için reaksiyon karışımı	30
Tablo 5.	%5-12'lik (2x1.5mm) SDS poliakrilamid jelinin hazırlanışı	33
Tablo 6.	hCAII esteraz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı	41
Tablo 7.	HTL ile modifiye edilen hCAII enziminin doza bağlı serbest sülfhidril içeriği	50



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	hCAII'nin moleküler yapısı ve amino asit dizisi	6
Şekil 2.	Proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlarının yapısı: O-glikozilasyon, metilasyon, oksidasyon, ubiquitinasyon ve fosforilasyon	8
Şekil 3.	(A) Farklı CA izoenzimlerindeki modifiye edilmiş amino asitlerin sayısını ve (B) her bir CA izoenziminde ve tüm CA ailesinde mevcut olan modifikasyonların türü ve sayıları	9
Şekil 4.	Protein glikasyonunun genel mekanizması	11
Şekil 5.	Reaktif karbonil türleri ve AGE oluşumu	12
Şekil 6.	MGO'nun Lys (A) ve Arg (B) rezidüleri üzerinden proteinlere katılmasıyla oluşan kararlı maddeler ((N-ε-(carboxyethyl)lysine (CEL), metilglioksal hidroimidazolon (MG-H) 1 ve izomerleri MG-H2 ile MG-H3 ve MG-H3 hidroliziyle oluşan N 7-karboksietil arjinin (CEA)	13
Şekil 7.	Homosisteinin metabolizması	14
Şekil 8.	S-homosisteinlenmiş proteinler ve N-homosisteinlenmiş proteinlerin yapısı	15
Şekil 9.	Normal hücresel işleyişte ve bağışıklık yanıtında kimyasal modifikasyonların rolü	18
Şekil 10.	Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite matriksinin sentezi	26
Şekil 11.	Standart protein konsantrasyonu	40
Şekil 12.	Elüentlerin protein konsantrasyonları ve hidrataz aktiviteleri	47
Şekil 13.	MGO ile modifiye hCAII enziminin % esteraz aktivitesi ölçümü	50
Şekil 14.	MGO ile modifiye hCAII enziminin % hidrataz aktivitesi ölçümü	51
Şekil 15.	HTL ile modifiye hCAII enziminin % esteraz aktivitesi ölçümü	51
Şekil 16.	HTL ile modifiye hCAII enziminin % hidrataz aktivitesi ölçümü	52
Şekil 17.	MGO ile modifiye hCAII antikor titreleri	53
Şekil 18.	HTL ile modifiye hCAII antikor titreleri	54



RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Western blotlama prosedürü	20
Resim 2.	İmmünizasyonu yapılan balb-c fare görüntüsü	43
Resim 3.	ELISA yönteminde modiye olan ve olmayan hCAII antikorlarının etkisi	48
Resim 4.	hCAII enziminin MGO ile modifikasyonuna ait western blot görüntüsü	48
Resim 5.	hCAII enziminin MGO ile modifikasyonuna ait western blot görüntüsü	49
Resim 6.	ELISA yönteminde modiye olan ve olmayan hCAII antikorlarının etkisi	53



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

APS	Amonyum Persülfat
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri
CA	Karbonik Anhidraz
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay
hCAII	İnsan Karbonik Anhidraz II
HCY	Homosistein
HTL	Homosistein-tiyolakton
GO	Glioksal
MGO	Metilglioksal
Ma	Molekül Ağırlığı
PTM	Protein Posttranslasyonel Modifikasyon
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	N,N,N,N-Tetrametil etilen diamin



Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ζ	Zeta
η	Eta
θ	Teta
μ	Mikro

Formüller

CO_2	Karbondiyoksit
H_2O	Su
HCO_3^-	Bikarbonat iyonu



ÖZET

Karbonik Anhidraz II'nin Homosistein ve Metilglioksal ile Modifikasyonunun Enzim Aktivitesi ve Antijenik Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

Karbonik anhidrazlar (CA'lar), karbondioksitin hidrasyonunu geri dönüşümlü olarak katalizleyen metalloenzimlerdir. CA enzim ailesinin posttranslasyonel modifikasyonlarına (PTM'larına) dair çalışmalar genellikle veritabanlarına dayanarak değerlendirilmiştir. PTM'ler ile CA'ların fonksiyonları arasında açık bir korelasyon olduğu ifade edilse de birçok modifikasyon olayı için yeterince deneysel çalışmalar yapılmamıştır. Bu çalışmada, geniş bir doku dağılımına sahip insan karbonik anhidraz II (hCAII) izoenziminin homosistein (HCY) ve metilglioksal (MGO) ile *in vitro* modifikasyonlarının enzimin aktivitesi ve antijenik özellikleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, çalışmada kullandığımız saf hCAII izoenzimi, insan eritrositlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Elde edilen saf hCAII izoenzimi, HCY ve MGO ile *in vitro* olarak modifiye edildi. Modifikasyonların varlığı western blot ile teyit edildi. Modifiye edilen hCAII izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri ölçüldü. Modifiye olan hCAII izoenzimlerinin antijenik özelliklerini belirlemek için Balb-c fareler bu enzimlerle immünize edildi ve fare serumlarındaki antikor titreleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Enzim aktiviteleri ölçüldüğünde, hCAII enziminin HCY ve MGO ile modifikasyonlarında, N-homosisteinilasyona bağlı olarak enzim aktivitesinde dozla ilişkili olarak inhibisyona neden olurken, glikasyona bağlı etkisinin ise düşük modifikasyon dozunda önemli ölçüde aktivasyona sebep olurken yüksek modifikasyon dozunda ise inhibisyona neden oldu. MGO ile modifikasyonun Balb-c farelerde yüksek antijenik cevap oluşturduğu, HCY'nin antijeniteyi değiştirmediği gözlemlendi. Sonuç olarak, MGO ile modifikasyonun hCAII enziminin hem aktivite hem de antijenik özelliklerini etkilediği, HCY ile modifikasyonun ise enzimin aktivitesinde önemli etkisi olduğu gözlenirken, antijenik olarak etkisi belirlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Antijenite, Glikasyon, Homosistein, Homosisteinilasyon, Homosistein-tiyolakton, Karbonik Anhidraz II, Metilglioksal, Posttranslasyonel Modifikasyon



ABSTRACT

Investigation of the Effect of Modification of Carbonic Anhydrase II with Homocysteine and Methylglyoxal on Enzyme Activity and Antigenic Properties

Carbonic anhydrases (CAs) are metalloenzymes that reversibly catalyse the hydration of carbon dioxide. Studies on posttranslational modifications (PTMs) of the CA enzyme family have been evaluated mainly based on databases. Although there is a clear correlation between PTMs and the function of CAs, many modification events have not been adequately studied experimentally. In this study, we aimed to investigate the effects of in vitro modifications of human carbonic anhydrase II (hCAII) isoenzyme with homocysteine (HCY) and methylglyoxal (MGO) on the activity and antigenic properties of the enzyme. For this purpose, pure hCAII isoenzyme was purified from human erythrocytes by affinity chromatography. The obtained pure hCAII isoenzyme was modified in vitro with HCY and MGO. The presence of modifications was confirmed by Western blotting. Hydratase and esterase activities of the modified hCAII isoenzymes were measured. To determine the antigenic properties of the modified hCAII isoenzymes, Balb-c mice were immunised with these enzymes and antibody titres in mouse sera were measured by ELISA. When the enzyme activities were measured, modifications of hCAII enzyme with HCY and MGO caused dose-related inhibition of the enzyme activity due to N-homocysteinylation, while the glycation-dependent effect caused significant activation at low modification dose and inhibition at high modification dose. It was observed that modification with MGO induced a high antigenic response in Balb-c mice, while HCY did not alter antigenicity. In conclusion, modification with MGO affected both the activity and antigenic properties of hCAII enzyme, while modification with HCY had a significant effect on the activity of the enzyme, but no antigenic effect was determined.

Key words: Antigenicity, Carbonic Anhydrase II, Glycation, Homocysteine, Homocysteinylation, Homocysteine-thiolactone, Methylglyoxal, Posttranslational Modification



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Karbonik anhidrazlar tüm canlılarda toplam sekiz ailesi olmakla birlikte, memelilerde sadece α -CA ailesi tarafından kodlanan ve tek bir polipeptitten oluşan metalloenzimlerdir. Günümüze kadar çeşitli doku ve organlarda 16 izoenzimi belirlenmiştir (1). Bu enziminin temel rolü, bikarbonat ve proton iyonları oluşturmak için karbondioksitin hidrasyonunu geri dönüşümlü olarak katalizlemesidir. Bu özelliği sebebiyle CA'lar pH regülasyonu, elektrolit ve sıvı sekresyonu, biyosentetik reaksiyonlar, kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu gibi birçok fizyolojik veya patolojik süreçte rol alırlar (2). İnsan eritrositlerinde bol miktarda bulunan CAII izoenzimi (hCAII) yüksek katalitik aktiviteye sahip olan ve biyokimyasal, fonksiyonel ve yapısal yönlerinden iyi bilinen bir enzimdir (1). Son zamanlarda çeşitli otoimmün hastalıklarda CAII'ye karşı otoantikörler belirlenmiş ve bunun nedenlerinden birinin de oksidatif stres kaynaklı modifikasyonlar olabileceği ortaya konulmuştur (3).

Proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları, sentezlenen proteinlerin geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak kovalent bağ ile modifiye edilebildiği kimyasal veya enzimatik süreçlerdir. Bu PTM'ler protein fonksiyonunu, stabilitesini ve hücre altı lokalizasyonunu ve ayrıca protein-protein etkileşimlerini değiştirir. Ayrıca PTM'lerin neden olduğu yapısal değişimler proteinlerin yeni bir antijen olarak tanınıp immünolojik süreçlerin başlamasına neden olur. Aslında PTM'ler normal fizyolojinin sürdürülmesi için gereklidirler, ancak aşırı üretildiklerinde nörolojik hastalıklar ve diyabet gibi patolojik durumlara yol açabilirler (4). Hiperglisemi, T2D'nin patofizyolojisinde ve ilgili komplikasyonlarında rol oynayan AGE'lerin oluşumunu teşvik eder. AGE'ler, indirgeyici şekerler ile proteinlerin serbest amino grubu arasındaki bir dizi enzimatik olmayan reaksiyon yoluyla oluşan bir grup karmaşık PTM'dir. Önemli bir AGE öncü molekülü olan metilglioksal, insan plazmasında (50-150 nM) ve dokularda (1-4 μ M) son derece düşük fizyolojik konsantrasyona sahip en reaktif dikarbonildir. Biyolojik sistemler, metilglioksal konsantrasyonunun normal değerinin üzerine çıktığında, oksidatif stres, protein bozulması, AGE'lerin üretimi ve anormal hücre metabolizmaya sebep olan karbonil strese maruz kalırlar (4). Bununla ilişkili olarak diyabetli kişilerdeki glikasyona bağlı CA aktivitelerinde fark belirlenmiştir (5).

Homosistein, metiyonin metabolizmasından üretilen, sülfür içeren, protein olmayan bir ara amino asittir. Sağlıklı bireylerde normal homosistein seviyeleri 5-10 μ M arasında



değişmektedir. Homosistein toksisitesinin önerilen mekanizmalarından biri, oldukça aktif metaboliti olan homosistein tiyolakton (HTL) tarafından oluşturulan proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonudur. HTL tercihen enzimatik olmayan bir mekanizmayla protein lizin kalıntılarının ϵ -amino grubuyla amid bağları oluşturur; bu süreç "protein N-homosisteinilasyonu" olarak adlandırılır. HTL'nin proteinlere dahil edilmesi, protein yapısındaki değişiklikler nedeniyle protein işlevlerinin kaybına neden olur ve oksidasyon yoluyla daha fazla hasara duyarlı hale gelir. Ayrıca, N-homosisteinilasyonun protein agregasyonunu veya amiloid oluşumunu indüklediği de bilinir. Dolayısıyla bu süreç insanda nörodejeneratif hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (6). Yapılan çalışmalarda, karbonik anhidraz enziminin de HTL ile modifikasyonuna bağlı olarak inhibe olduğu ve enzimin agregatlarının varlığı tespit edilmiş olsa da, bu konuda yapılan çalışmalar çok sınırlı kalmıştır (7). Karbonik anhidrazların başlıca rolünün ortamın asit-baz dengesinin düzenlenmesi ve homeostaz dahil olmak üzere çeşitli süreçleri katalize etmesi dolayısıyla bu enzimin posttranslasyonel modifikasyonlarının da bir o kadar önemli etkileri olması beklenmektedir. Ayrıca hCAII'nin *in vitro* HCY ve MGO ile oluşturulan modifikasyonlarının antijenik özelliklerini inceleyen bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

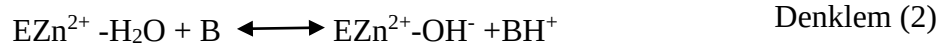
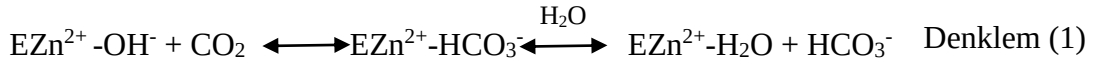
Bu çalışmada, insan eritrositlerinden elde edilecek saf hCAII enziminin, HCY ve MGO ile *in vitro* modifikasyonlarının enzimin aktivitesi ve antijenik özellikleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karbonik Anhidraz (CA)

Karbonik anhidrazlar (CAs, EC 4.2.1.1), çinko içeren, karbondioksiti bikarbonat ve hidrojen iyonlarına geri dönüşümlü olarak katalize eden metalloenzimlerdir (8). CA ile katalize edilen reaksiyon, denklem (1) ve denklem (2) ile açıklanan iki aşamalı bir mekanizmayı takip eder.



İlk adımda, Zn^{2+} bağlı hidroksit, CO_2 'ye nükleofilik bir atak yaparak HCO_3^- oluşumuna neden olur, bu daha sonra bir su molekülü ile değiştirilir ve enziminin katalitik olarak aktif olmayan $\text{EZn}^{2+} \text{-H}_2\text{O}$ formu oluşur (Denklem (1)). Hız sınırlayıcı olan ikinci adımda (Denklem (2)), çinko bağlı hidroksit, çinko koordineli su molekülünden çözücü ortama (B) bir proton transferi reaksiyonu yoluyla yeniden oluşturulur. İzoenzimlerin çoğunda, aktif bölge boşluğunun ortasına yerleşen bir histidin kalıntısı, bir proton mekiği görevi yaparak bu aşamaya yardımcı olur (5).

Karbonik anhidraz ailesinin üyelerinin pH regülasyonu, karbondioksitin ve iyonların taşınması, idrarın asitleştirilmesi, beyin omurilik sıvısının salgılanması, göz içi sıvısının üretimi, kemik rezorpsiyonu, yağ asidi metabolizması, testis sıvısı üretimi ve tümör oluşumu gibi birçok fizyolojik ve patolojik olayda rolü vardır (1,9).

Karbonik anhidrazlar ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde bulunur ve bunlar sekiz farklı gen ailesi, α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η - ve θ -CA'lar tarafından kodlanır. Memelilerde sadece α -CA ailesi bulunur (10). İnsan CA izoenzimi yaklaşık 29 kDa moleküler ağırlığa sahip 295 amino asit içeren tek zincirli bir proteindir (8,9). İnsanda bulunan CA izoenzimlerinin, kinetik ve yapısal özellikleri, normal hücre/doku/organ dağılımları ve fizyolojik görevleri Tablo 1'de verilmiştir.



Tablo 1. İnsan CA izoenzimlerinin kinetik ve yapısal özellikleri, normal doku dağılımları ve fonksiyonları (Zamanova S'den, 11)

CA izoenzimi (hücresel lokalizasyon)	Ana yapısal özellikler	Kinetik özellikler k_{cat} (s^{-1})	Normal organ/doku konumu	Fizyolojik fonksiyon
CA I (Sitozol)	Katalitik alan	2×10^5	Kırmızı kan hücreleri, nötrofiller, kornea epiteli, lens, gözün siliyer cisim epiteli, ter bezleri, yağ dokusu, kalın bağırsak epitelinin miyoepitelyal hücreleri, adrenal bezlerin zona glomerulosa'sı	CO_2/HCO_3^- havuzlarının dengelenmesinde görev alır, kandaki ve diğer vücut sıvılarındaki pH'yı korur, CO_2 'nin dokulardan akciğerlere taşınmasına katkı sağlar.
CA II (Sitozol)	Katalitik alan	1.4×10^6	Beynin koroid pleksusunun oligodendrositleri ve epitelyumu, siliyer cisim, lens, gözlerin retinasının Muller hücreleri, tükürük bezlerinin asiner hücreleri, akciğerin tip II epitel hücreleri, karaciğerin perivenöz hepatositleri, proksimal tübül, distal tübül ve böbreklerin kortikal toplama kanallarının interkale hücreleri, endotel hücreleri, eritrositler, trombositler, nötrofiller, mide paryetal hücreleri, duodenum, bağırsak ve kolonun epitel hücreleri, pankreas kanal hücreleri, uterus endometrial hücreleri, seminal vezikül ve duktusun epitel hücreleri deferens, spermatozoa, adrenal bezlerin zona glomerulosa hücreleri, kemik osteoklastları	Kandaki çözünmüş CO_2/HCO_3^- havuzlarının dengelenmesine katkıda bulunur ve kanda ve hücrelerin sitoplazmasında pH homeostazisini korur.
CA III (Sitozol)	Katalitik alan	1×10^4	İskelet kasları, yağ hücreleri, rahim, prostat, akciğerler, böbrekler, kolon ve testis, kırmızı kan hücreleri	Kas hücrelerinin sitoplazmasındaki çözünmüş CO_2/HCO_3^- havuzlarını dengeler ve pH homeostazisini korur, doğal kaynaklardan kaynaklanan veya alkol ve çeşitli ilaçların tüketimiyle tetiklenen oksidatif strese karşı direnç kazandırır.
CA IV (Dış zara bağlı)	Bir fosfatidil inositol glikan (GPI) ile membrana bağlı katalitik alan	1.1×10^6	Belirli kılcal yatakların apikal plazma membranı (pulmoner mikrodamar sistemi, kortikal kılcal damarlar, gözün koryokapillerleri, iskelet ve kalp kası mikrokapillerleri), kolon GI epitel hücrelerinin ve nefronun belirli bölümlerinin apikal plazma zarı, insan üreme sisteminin spesifik epitel hücreleri	Cl^- iyonlarının konsantrasyonunun sitozoldekinden çok daha yüksek olduğu hücre dışı boşluktaki CO_2/HCO_3^- havuzlarının dengelenmesinde rol oynar.
CA VA (Mitokondri)	Katalitik alan	2.9×10^5	Karaciğer	Glukoneogenez, ürejeniz, lipogenezde yer alır,
CA VB (Mitokondri)	Katalitik alan	9.5×10^5	İskelet ve kalp kasları, böbrekler, pankreas, gastrointestinal sistem, beyin ve omurilik	glukoneogenez ve lipogenez yollarındaki HCO_3^{-4} piruvat karboksilaza, ürejeniz yolundaki karbamoilfosfat sentetazına, dallı zincirli amino asit katabolizması içindeki propiyonil-CoA karboksilazına ve 3-metilkrotonil-CoA karboksilazı sağlar.
CA VI (Tükürük ve sütte salgılanır)	Katalitik alan	3.4×10^5	Tükürük ve meme bezleri tarafından salgılanır	Tükürükte, yutulan yiyeceklerden ve ayrıca yiyeceklerin ağız boşluğunda yaşayan bakteriler tarafından ayrışmasından kaynaklanan asidi nötralize eder, böylece üst sindirim kanalını asitlikten korur.

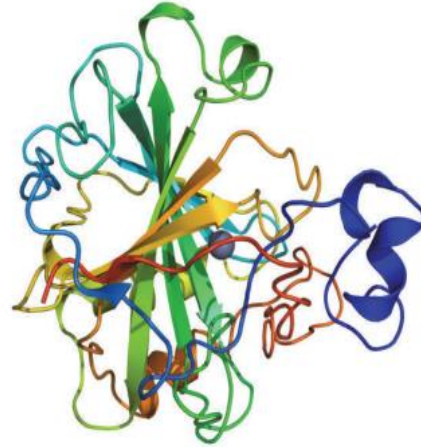


Tablo 1. (Devam)

CA izoenzimi (hücresel lokalisasyon)	Ana yapısal özellikler	Kinetik özellikler k_{cat} (s^{-1})	Normal organ/doku konumu	Fizyolojik fonksiyon
CA VII (Sitozol)	Katalitik alan	9.5×10^5	Esas olarak MSS'de, ayrıca karaciğer, iskelet kasları, mide, duodenum ve kolonda da görülür.	CNS hücrelerinin sitoplazmasında ve diğer dokularda çözünmüş CO_2/HCO_3^- havuzlarını dengeler ve pH homeostazisini korur.
CA VIII (Sitozol)	Katalitik alan (işlevsiz)	N/A	Beyincikteki Purkinje hücreleri, sinir hücre gövdeleri ve bazı astrositler, karaciğer, akciğerler, kalp, bağırsak, timus, böbrekler	İnositol trifosfatın (ITP) endoplazmatik retikulum üzerindeki reseptörü ITPR1'e bağlanmasını etkiler, böylece hücreler içindeki kalsiyum sinyali modüle eder.
CA IX (Dış zara bağlı)	Proteoglikan, katalitik alan, transmembran alan ve sitoplazmik alandan oluşan dimer	3.8×10^5	Mide epitel, safra kanalı, safra kesesi kanalı, pankreas kanalı, ince bağırsağın hızla çoğalan normal hücreleri ve CNS'de (düşük ekspresyon)	Hücre dışı boşluktaki CO_2/HCO_3^- havuzlarının dengelenmesinde yer alır, hipoksik tümörlerde aşırı eksprese edilen, hipoksik koşullar altında hücrenin hayatta kalmasında önemli bir rol oynar.
CA X (Sitozol)	Katalitik alan (işlevsiz)	N/A	Beyindeki miyelin kılıfı	Normal beyin gelişiminde miyelin kılıfı organizasyonunda önemli rol oynar.
CA XI (Sitozol)		N/A	CNS: koroid pleksus ve pia araknoid alanlar, sinir gövdesi, nöritler ve astrositler içinde, ancak oligodendroglia içinde değil, Omurilik, GI yolu (mide, ince bağırsak, kolon), pankreas, karaciğer, böbrekler, iskelet kasları, yumurtalıklar, lenf düğümleri, adrenal bez, tiroid, tükürük bezleri	Bilinmiyor
CA XII (Dış zara bağlı)	Katalitik alan	4.2×10^5	Kolon, rektum, yemek borusu, pankreas, böbrekler, prostat, beyin, endometriyum, yumurtalıklar, testis, derideki ter bezleri, meme epitel ve gözün pigmentli siliyer epitel hücreleri	Hücre dışı boşluktaki CO_2/HCO_3^- havuzlarının dengelenmesinde rol oynar, bazı tümörlerde ekspresyonu artırır.
CA XIII (Sitozol)	Katalitik alan	1.5×10^5	Kolon, ince bağırsak, testis, rahim ağzı, endometrial bezler ve timus	Çözünmüş CO_2/HCO_3^- havuzlarının dengelenmesine katkıda bulunur ve farklı hücrelerin sitoplazmasında pH homeostazisinin korunmasına yardımcı olur, servikal ve endometrial mukustaki HCO_3^- iyon konsantrasyonunu ve pH homeostazisini düzenler, böylece spermilerin hareketliliğini korur ve normal döllenme sürecini sağlar.
CA XIV (Dış zara bağlı)	Katalitik alandan oluşan monomer, transmembran alan, sitoplazmik alan	3.1×10^5	Böbrekte, beyinde, retinada ve kalpte yüksek düzeyde eksprese edilir, ayrıca iskelet kası, karaciğer ve akciğerlerde de bol miktarda ekspresyon sağlanır	Hücre dışı boşluktaki CO_2/HCO_3^- havuzlarının dengelenmesinde rol oynar, bikarbonat taşıyıcılarla etkileşime girer, kronik hipoksiye yanıt olarak kaslarda ve diğer dokularda asit-baz dengesinde, kalbin hiperaktivitesinde ve retinada pH regülasyonunda rol oynar.



Karbonik anhidraz II (CAII), yüksek katalitik aktiviteye sahip sitoplazmik bir enzimdir. İnsan vücudundaki en hızlı çalışan enzimlerden biridir (turnover sayısı 10^6 s^{-1}). Bu enzimle yapılan *in vitro* çalışmaların çoğunda kullanılan CAII izoenzimi eritrositlerden saflaştırılmıştır. (9). hCAII' nin moleküler yapısı ve amino asit dizisi Şekil 1'de gösterilmiştir.



10	20	30	40	50
MSHHWGYGKH	NGPEHWHKDF	PIAKGERQSP	VDIDTHTAKY	DPSLKPLSVS
60	70	80	90	100
YDQATSLRIL	NNGHAFNVEF	DDSQDKAVLK	GGPLDGTYRL	IQFHFHWGSL
110	120	130	140	150
DGQGSEHTVD	KKKYAAELHL	VHWNTKYGDF	GKAVQQPDGL	AVLGIFLKVG
160	170	180	190	200
SAKPGLQKVV	DVLDSIKTKG	KSADFTNFD	RGLLPESLDY	WTYPGSLTTP
210	220	230	240	250
PLLECVTWIV	LKEPISVSSE	QVLKFRKLN	NGEGEPEELM	VDNWRPAQPL
260				
KNRQIKASFK				

Şekil 1. hCAII'nin moleküler yapısı ve amino asit dizisi (Jakubowski'den, 9)

Karbonik anhidrazların merkezine konumlanan çinko His94, His96 ve His119 rezidüleri ile bir su/hidroksit arasında tetrahedral yapıyı oluştur (Şekil 1). Bu izoenzimin aktif bölgesinin yer aldığı boşluk/cep yaklaşık 15 Å çapında ve merkeze doğru uzanan bir koni şeklindedir. Bu boşluk iki farklı özelliğe sahip alana bölünmüştür. Enzimin merkezine yakın bölgede bulunan çinkonun bir tarafında, hidrofobik amino asitler (yani Val121, Val143, Leu198, Thr199-CH₃, Val207 ve Trp-209) bulunurken çinkonun diğer tarafında, merkezden daha uzak mesafede, hidrofilik amino asitler (yani Tyr7, Asn62, His64, Asn67, Thr199 ve Thr200) konumlanır. Bu konuma sahip zıt yüklü aminoasit rezidülerin olması



enzimin substratının veya ürününün yönlenmesine neden olarak reaksiyonun hızını etkilemektedir (12).

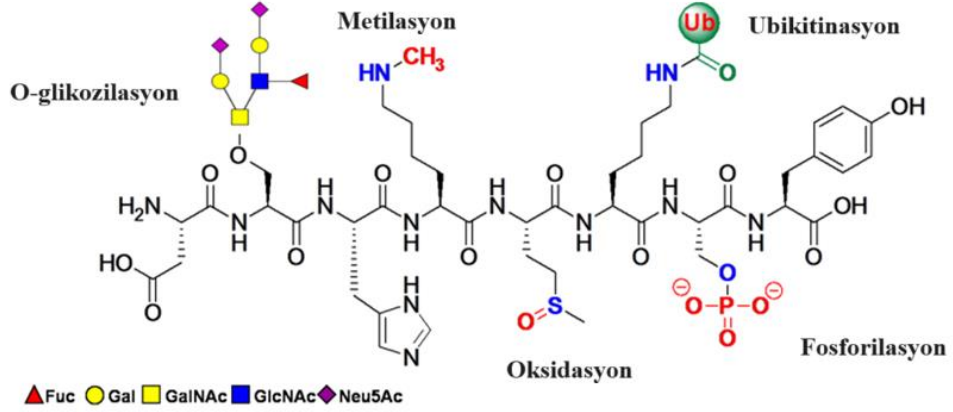
Sülfonamidler CA'ların kuvvetli ve seçici inhibitörleridir (hidroklorotiyazid, indapamid, klortalidon ve furosemid gibi diüretikler dahil 20'den fazla FDA onaylı ilaç). CA'ların hidrataz aktivitelerini inhibe ettikleri gibi, esteraz ve fosfataz aktivitelerini de inhibe ederler (13). Çok sayıda bileşiğin karbonik anhidraz aktivitesini değiştirdiği gösterilmiştir. Bunlar fizyolojik bileşikler, halihazırda klinik uygulamada kullanılan ilaçlar ve laboratuvarlarda *ex vivo* olarak test edilen diğer kimyasallardır. Ayrıca son dönemlerde CA aktivatörleri ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır. Özellikle Alzheimer hastalarında düşük CA aktivitelerinin artırılması için çeşitli aktivatörler araştırılmaktadır (14). İnsan vücudunda fizyolojik olarak mevcut olan potansiyel CAII aktivatörleri arasında biyojenik aminler (histamin, katekolaminler ve serotonin) ve amino asitler (fenilalanin ve histidin) yer alır. CA'ların aktivasyonu ve inhibisyonu ile ilgili *in vitro* ortamda birçok madde ile çalışmalar yapılmaktadır (9). Dolayısıyla hCA'ların biyokimyasal, fonksiyonel ve yapısal yönleri hakkında sahip olunan detaylı bilgiler onu biyomedikal uygulamalarda inhibitörlerin ve aktivatörlerin tasarımında iyi bilinen bir hedef haline gelmiştir. Ancak CA'lar üzerinde meydana gelen translasyon sonrası modifikasyonlar (PTM'ler) ve bunların fonksiyonel etkileri şimdiye kadar yeterince araştırılmamıştır (5).

2.2. Protein Posttranslasyonel Modifikasyonları

Protein modifikasyonu, proteinlerin biosentezinden sonra kimyasal modifikasyonunu ifade eder ve buna posttranslasyonel modifikasyon denir (15). Diğer bir ifade ile sentezlenmiş proteinlerdeki amino asitlerin yan zincirlerinin kovalent bir modifikasyonudur. PTM'ler fizyolojik ve patolojik koşullar altında protein katlanmasını, aktivitesini, stabilitesini, lokalizasyonunu, sinyal iletimini ve çeşitli ligantlara bağlanmasını düzenleyerek proteinlerin fonksiyonel çeşitliliğini genişletebilir (16). Dolayısıyla PTM'ler, protein özelliklerinde ve işlevlerinde değişikliklere neden olur. Yapılan analizlere göre, PTM'lerin insan dokularında ve vücut sıvılarında bulunan proteinlerin %60-90 oranında bulunduğu tahmin edilmektedir. Aynı proteinde (hatta aynı amino asitte) farklı PTM'ler meydana gelebilir ve aynı proteindeki farklı kalıntıların modifikasyonları, sonuçta makromoleküler fizikokimyasal özellikler üzerinde çeşitli etkileri belirleyebilir (17). PTM, metilasyon, asetilasyon, glikozilasyon ve fosforilasyon gibi fonksiyonel grupların eklenmesinin yanı sıra ubiquitinasyon ve SUMOilasyon gibi küçük peptitlerin veya proteinlerin kovalent bir bağlanmasını da içerir, ayrıca sitrülasyon (arjininin sitrulline



dönüşümü) gibi amino asitlerdeki kimyasal değişiklikler de PTM olarak kabul edilir (Şekil 2). Protein modifikasyonu hücresel süreçlerde önemli bir rol oynar. Örneğin otofajinin düzenlenmesinde ubikitinasyon, fosforilasyon ve asetilasyon gibi PTM'ler bulunmaktadır (15).



Şekil 2. Proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlarının yapısı: O-glikozilasyon, metilasyon, oksidasyon, ubikitinasyon ve fosforilasyon (Wang'dan, 15)

Posttranslasyonel modifikasyonların immün hücre aktivasyonu, sinyal regülasyonu, immün yanıt ve tümörün metabolik programlanmasıyla da yakından ilişkisi vardır (16). Otoantikor oluşumunda da önemli oldukları gösterilmiştir (3).

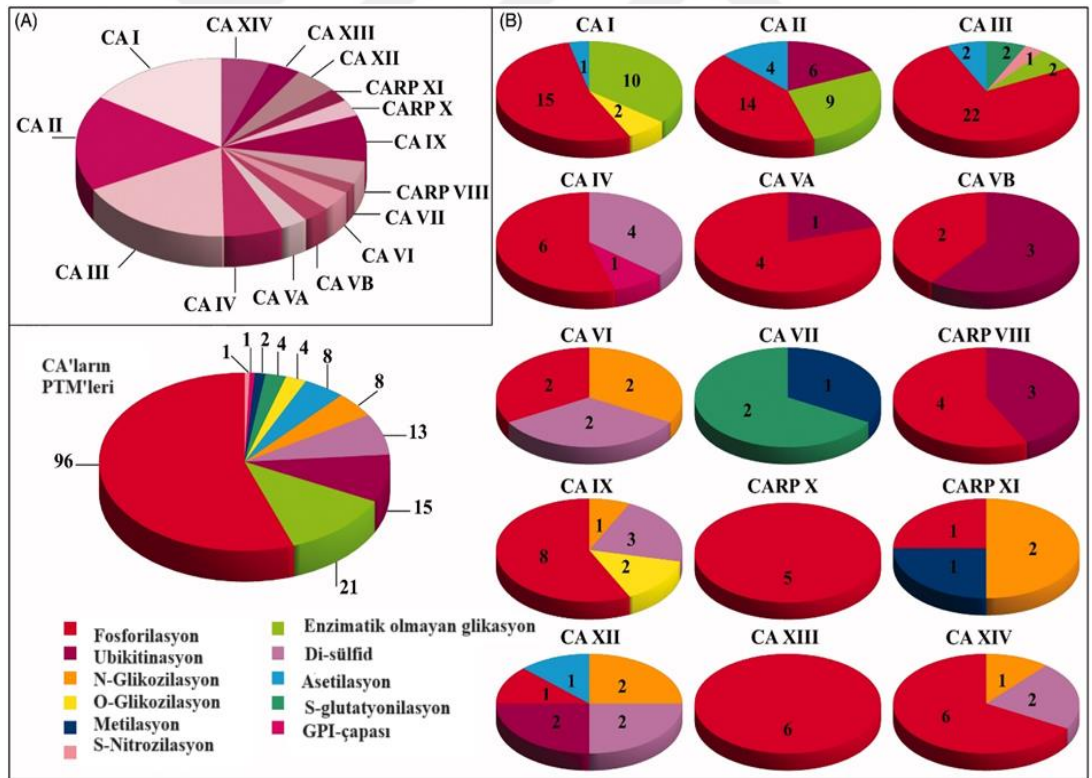
Bazı PTM'ler iyi karakterize edilmiş olsa da (örn. Ser/Thr fosforilasyonu), birçoğu henüz yeterince araştırılmamıştır. PTM'lerin sağlık ve hastalıktaki rolleri büyük ölçüde bilinmemektedir (örn. His metilasyonu). Birçok PTM, enzim katalizli reaksiyonlar yoluyla sıkı bir şekilde düzenlenirken (örn. Ser/Thr fosforilasyonu), enzimatik olmayan yollarla üretilen PTM'lerin, hücre sinyalleşmesinde önemli roller oynayabileceğine dair artan kanıtlar vardır. Bunun en önemli örneği, glikolitik ve TCA yolu enzimlerinde bol olarak bulunan ve metabolik akış ile homeostazinin devamlılığını kontrol eden Lys asetilasyonudur. Enzimatik olmayan PTM'lerin, yalnızca hücre toksisitesinin belirteçleri olarak bilinmesine rağmen, hücre sinyalleşmesi ve protein fonksiyonu için hayati bileşenlerdir. Bunun başlıca örneği, başlangıçta oksidatif stres ve protein hasarının bir göstergesi olarak kullanılan Cys oksidasyonudur. Cys oksidasyonu, protein katlanmasından, strese karşı transkripsiyonel tepkilere kadar çok sayıda biyolojik süreç için gereklidir.



Bununla birlikte, bu PTM'lerin hormetik veya adaptif eşiğin üzerinde birikmesi toksik tepkilerin oluşturulmasında kritik belirleyici olarak kabul edilmektedir (18).

2.3. CA ve Posttranslasyonel Modifikasyonların İlişkisi

İnsan CA'larında meydana gelen PTM'leri inceleyen çalışmalar genellikle özel veritabanlarına (örneğin, PHospHoSitePlus, qPHos ve dbPAF) dayanan analizler ile yapılmıştır (19-21). Yapılan değerlendirmelere göre CA enzim ailesinde modifikasyonlar yaygın olarak görülmektedir ve bazı durumlarda belirli bir PTM ile CA işlevi arasında açık bir korelasyon vurgulanmıştır, ancak birçok modifikasyon olayı için deneysel çalışmalar yapılmamıştır. CA enzimlerinin henüz yapısal olarak karakterize edilmemiş CA VA, CA VB, CARP X ve CARP XI hariç her bir CA izoenzime karşılık gelen üç boyutlu yapısıyla ilişkili olabilecek *in silico* PTM'ler belirlenmiştir (5). Farklı CA izoenzimlerinin modifiye olan amino asitlerin sayısını ve her bir CA izoenziminde ve tüm CA ailesinde mevcut olan modifikasyonların doğasını ve sayısını bildiren pasta grafik Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. (A) Farklı CA izoenzimlerindeki modifiye edilmiş amino asitlerin sayısını ve (B) her bir CA izoenziminde ve tüm CA ailesinde mevcut olan modifikasyonların türü ve sayıları (Di Fiore'den, 5)



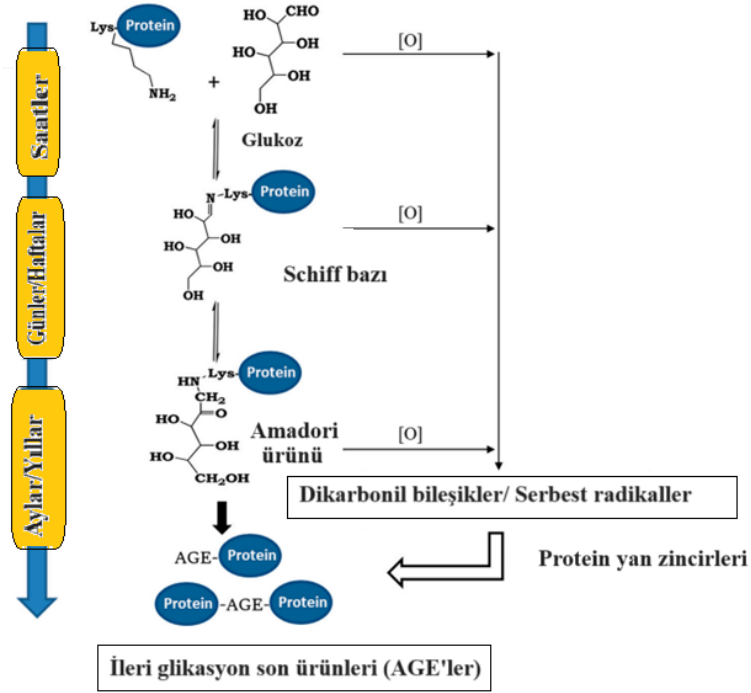
Mevcut 30 adet protein veritabanı paralel olarak araştırıldığında ve ilgili çalışmalarda hCA izoenzimlerinde bulunan modifikasyona katılan amino asitleri belirlemek amacıyla, 60'tan fazla PTM hakkında bilgi edinilmiştir. CA merkezli analizlerde, insan izoenzimlerinde fosforile edilmiş, asetile edilmiş, ubikuitinile edilmiş, metillenmiş, N-glikozile edilmiş, O-glikozile edilmiş, S-glutatyonile edilmiş, S-nitrozile edilmiş, disülfid bağlı, enzimatik olmayan şekilde glikasyona uğrayan ve GPI ile modifiye edilmiş amino asitlerin oluşumunu belirli dizi konumlarında ortaya çıkarmaktadır. Sonuçlar Şekil 3'te özetlenmiştir. Genel olarak CA I, CA II, CA III, CA IV, CA VA, CA VB, CA VI, CA VII, CARP VIII, CA IX, CARP X, CARP XI, CA XII, CA XIII ve CA XIV için sırasıyla 26, 29, 29, 11, 5, 5, 6, 3, 7, 14, 5, 4, 8, 6 ve 9 modifiye edilmiş rezidü tanımlanmıştır (Şekil 3(A)). Az sayıda vakada, fosforilasyon/O-glikozilasyon (aynı S kalıntısında) veya asetilasyon/ubikuitinilasyon/glikasyonun (aynı K kalıntısında) birlikte meydana geldiği gözlenmiştir. Toplanan veriler, proteomik çalışmalarda açıklanan hücre dizilerinden ve biyolojik dokulardan/vücut sıvılarından gelen tüm bilgileri özetlemektedir. Her CA'da ve tüm insan ailesinde bulunan farklı PTM tiplerinin dağılımı Şekil 3(B)'de gösterilmiştir. İzoenzimlerin her birinde en sık görülen modifikasyonları vurgulamanın yanı sıra, bu sonuçlar, protein ailesindeki PTM temsili şunu izlediğini göstermiştir: fosforilasyon, enzimatik olmayan glikasyon, ubikuitinilasyon, disülfid oluşumu, N-bağlı glikozilasyon ve asetilasyon, S-glutatyonilasyon, O-glikozilasyon ve diğerleri (5).

2.4. Glikasyon

Enzimatik olmayan protein glikasyonu, lizin ve arjinin kalıntılarının yanı sıra N-terminal amino asitleri etkileyen, genellikle indirgeyici şekerlerin veya reaktif karbonil türlerinin (RCS) serbest karbonil grubunun proteinlerin amino grubu ile reaksiyona uğramasıyla başlatılan geri döndürülemez bir PTM'dir (5, 22).

İndirgeyici şekerler ve RCS, proteinlerin N-terminalindeki serbest amino ($-NH_2$) grupları, lizinin yan zincirindeki ϵ -amino grupları, arjininin guanido grubu ve histidin rezidüsünün imidazol grubuna kendiliğinden bir nükleofilik ekleme reaksiyonuyla bağlanır. Bu reaksiyon hızla geri dönüşümlü bir Schiff bazı oluşturur ve bu birkaç hafta içinde yeniden düzenlenerek ketoamin veya amadori ürünü oluşur. Amadori ürünü, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) oluşumuna yol açan dehidrasyon, hidroliz ve yeniden düzenlemeleri içeren geri dönüşü olmayan bir dizi reaksiyona maruz kalır (23, 24). Protein glikasyonunun genel mekanizması Şekil 4'te gösterilmiştir.





Şekil 4. Protein glikasyonunun genel mekanizması (Sirangelo'dan, 24)

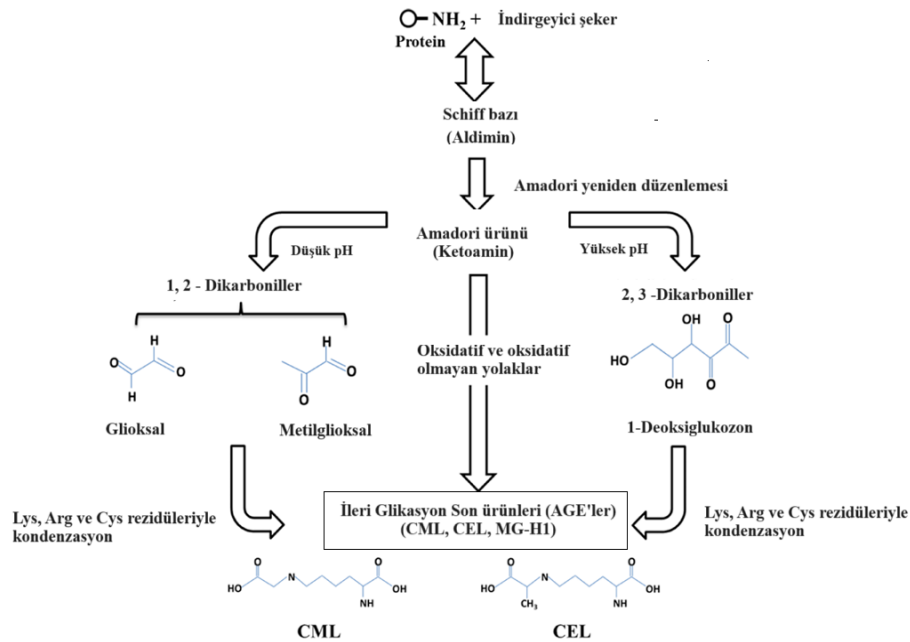
Reaktif karbonil türlerinin, insan sisteminde glioksal (GO), metilglioksal (MGO) ve 3-deoksigliukozon (3-DG) olarak bulunan bir veya daha fazla karbonil içeren aldehit ve/veya keton fonksiyonel grubuna sahip elektrofilik α -oksoaldehitlerdir. RCS arasında MGO, insan plazmasında (50-150 nM) ve dokularda (1-4 μ M) son derece düşük fizyolojik konsantrasyona sahip en reaktif dikarbonildir (25). Bu konsantrasyon normal değerinin üzerine çıktığında, biyolojik sistemler, oksidatif stres, protein bozulması, AGE'lerin üretimi ve anormal hücre metabolizmaya sebep olan “karbonil strese ” maruz kalırlar (23).

İnsanda, AGE oluşum süreci genellikle diyabet gibi hiperglisemik bir durumla ilişkili patofizyolojik koşullar altında gerçekleşir, ancak aynı zamanda nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar ve yaşlanma sürecinde de bu durum gözlemlenmiştir. Yaygın olarak enzimatik olmayan glikasyon, bir proteinin üç boyutlu yapısını ve fonksiyonel özelliklerini değiştirebilir. Enzimatik olmayan glikasyon, CA izoenzimlerinde sıklıkla görülen bir modifikasyondur, özellikle modifiye olmuş CA izoenzimleri biyolojik sıvılarda bol miktarda bulunur. Bunlar içerisinde CA I, CA II ve CA III'te sırasıyla 10, 9 ve 2 gliko amino asit tanımlanmıştır. CA I ve CA II' de aynı korunmuş K kalıntıları glikasyon meydana gelir. Şekil 3'te farklı CA izoenzimlerindeki modifiye edilmiş amino asitlerin



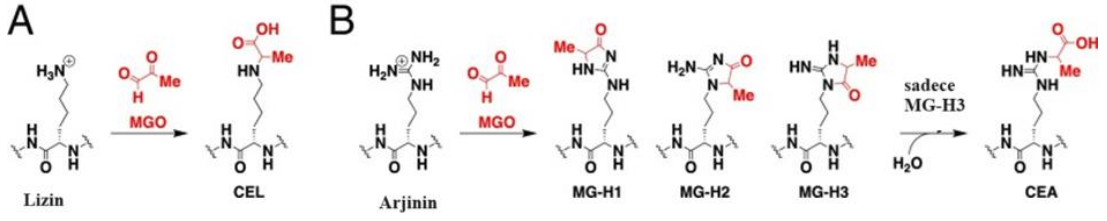
sayısı ile her bir CA izoenziminde ve tüm CA ailesinde mevcut olan modifikasyonların türü ve sayıları verilmiştir (5).

Metilglioksal, arjinin kalıntıları ile kolayca reaksiyona girerek majör ve minör arjinin eklentileri olan AGE'leri oluşturur. MG-H1 [Nδ-(5-hidro-5-metil-4-imidazolon-2-il)-ornitin] bir hidroimidazolondur ve yapısal izomerleri MG-H2 [2-amino-5-(2-amino-5-hidro-5-metil-4-imidazolon-1-il)-pentanoik asit] ve MG-H3 [2-amino-5-(2-amino-4-hidro-4-metil-5-imidazolon-1-il)-pentanoik asit] önemli bir arjinin eklentisidir. Minör arjinin eklentileri arasında Nω-karboksietilarjinin (CEA) ve argpirimidin bulunur. Ayrıca, MGO, Nε-karboksietil-lisin (CEL) oluşturmak için lizin kalıntıları ile reaksiyona girer. MG ve lizinin reaksiyonundan metilglioksal lizin dimer (MOLD) adı verilen bis(lizil) çapraz bağı da oluşur. Lizine kıyasla, arjinin kalıntıları AGE'lerin %90'ından fazlasını oluşturur. Dokularda, plazmada ve matriste MG ile indüklenen AGE'lerin *in vivo* ortalama konsantrasyonu, MG-H1 > CEL > MOLD sırasındadır. Xue ve ark. (26) AGE oluşumunun pozitif yük kaybıyla sonuçlandığını ve bunun sonucu olarak tüm elektrostatik etkileşimlerin ve protein moleküllerinde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olan arjinin kalıntılarının yakınındaki ligand bağlama kapasitesini etkileyebileceğini öne sürmüşlerdir. Reaktif karbonil türleri ve AGE oluşumuna ait grafik Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. Reaktif karbonil türleri ve AGE oluşumu (Sharma'dan, 27)





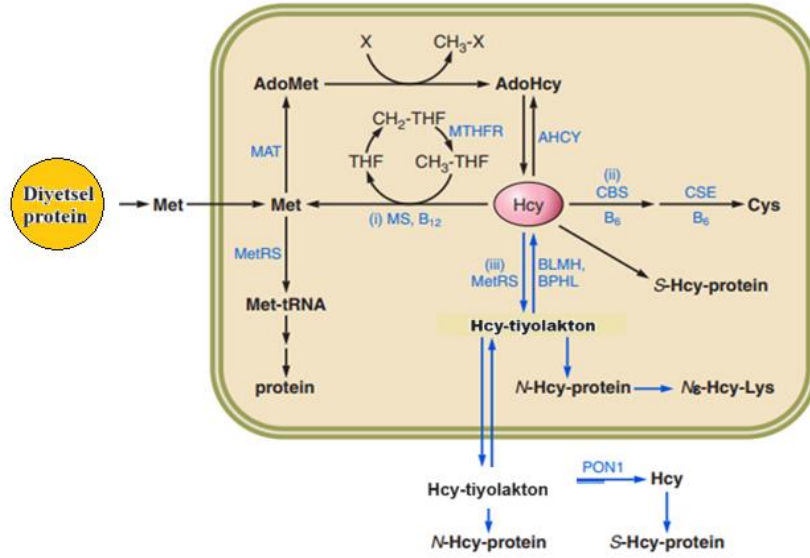
Şekil 6. MGO'nun Lys (A) ve Arg (B) rezidüleri üzerinden proteinlere katılmasıyla oluşan kararlı maddeler ((N-ε-(carboxyethyl)lysine (CEL), metilglioksal hidroimidazolone (MG-H) 1 ve izomerleri MG-H2 ile MG-H3, ve MG-H3 hidroliziyle oluşan N 7-karboksietil arjinin (CEA)) (Galligan'dan, 28)

Diyabetik hastaların eritrositlerinden saflaştırılan glike CA I'in, normal bireylerden alınan modifiye olmayan enziminkinin yaklaşık %40'ı kadar spesifik bir enzimatik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Aynı şekilde CA II ile ilgili çalışmalarda, yoğun glikasyonun önemli bir konformasyonel değişikliğe ve azalmış bir enzimatik aktiviteye neden olduğu gösterilmiştir. Bu bahsedilen araştırmalar, protein glikasyonuna bağlı olarak insan eritrositlerindeki genel CA aktivitesindeki değişikliklerin, diyabette değişen metabolizmanın ilk adımları arasında değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla modifikasyonun diyabet durumunun CA'lar üzerindeki fonksiyonel etkisini ortaya koymaktadır. AGE oluşumunun patofizyolojik (örn. yaşlanmanın yanı sıra nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar) ve fizyolojik özellikleri göz önüne alındığında glikasyona uğrayan CA'ların fonksiyonları ve kinetikleri hakkında daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır (5).

2.5. Homosisteinilasyon

Homosistein, protein yapısına katılmayan, kükürt içeren doğal bir amino asittir. HCY, remetilasyon yoluyla metiyonine veya transsülfürasyon yoluyla sisteine metabolize edilir. Aminoasıl-tRNA sentetazlar HCY'yi aktif formu olan tiyoester Hcy-tiyolaktone (HTL) dönüştürür (29). Proteinleri S-tiyolasyon yoluyla değiştiren HCY'nin aksine, HTL lizil kalıntıların yan zincirinin ε-amino grupları ile izopeptit bağı oluşturarak HCY'ye kıyasla proteinlerle daha fazla reaksiyona girer. Bu reaksiyon protein yapı ve işlevlerinde değişikliklere neden olur (30). Homosisteinin metabolizması Şekil 7'de gösterilmiştir.





Şekil 7. Homosisteinin metabolizması (Jakubowski'den, 31)

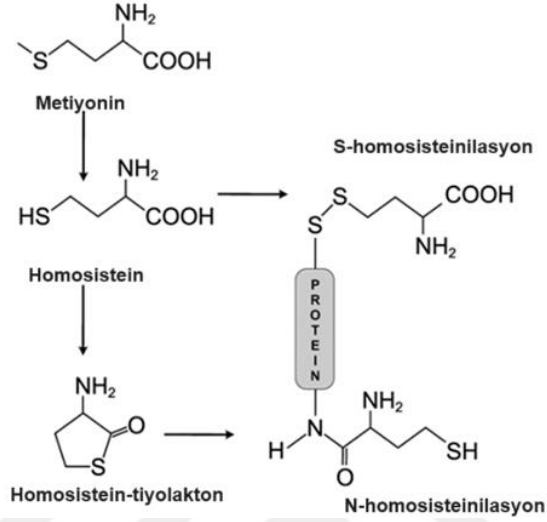
Modifiye olan lizil kalıntıları, protein oksidatif hasarına ve spontan disülfid oluşumu yoluyla agregasyona yol açabilen serbest indirgenmiş bir tiyol grubu içerir, ancak hasarın boyutu spesifik ve modifiye edilmiş protein(ler)e bağlıdır. HTL ile bazik pH'da yapılan inkübasyonlar, HTL'nin aynı zamanda daha küçük peptidlerin C-terminal karboksilik asit grubu ile de ekleştğini göstermiştir. Ancak bu reaksiyonun *in vivo* gerçekleşip gerçekleşmediği bilinmemektedir. Proteinlerin N-homosisteinilasyonunun, otoantijeniteyi ve hiperhomosisteineminin potansiyel olarak diğer patofizyolojik sonuçlarını başlattığı ileri sürülmüştür (30).

Hiperhomosisteinemi (HHCY) genetik ve/veya beslenme yetersizliklerinden kaynaklanır. Hiperhomosisteinemi hafif (16-30 μM), orta (31-100 μM) ve şiddetli (>100 μM) olarak sınıflandırılır. Yüksek Hcy düzeyleri aynı zamanda ateroskleroz, tromboz dahil olmak üzere gebelik bozuklukları, kardiyovasküler hastalıkların ve demans, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi nörodejeneratif patolojilerin görülme sıklığının artmasıyla da ilişkilidir. Plazma HCYdüzeyi zihinsel bozukluklarda sağlığın erken ve hassas bir belirteçidir (32).

Homosistein, karışık homosistein disülfidleri ve s-homosisteinlenmiş proteinler de dahil olmak üzere çeşitli şekillerde de ortaya çıkabilir. Fizyolojik koşullar altında plazmada homosisteinin serbest indirgenmiş formu (-SH), toplam Hcy'nin (tHcy) %1'inden daha azını oluşturur. Toplam HCY'nin yaklaşık %10-20'si farklı oksitlenmiş formlarda, yani Hcy-Cys ve homosistein (Hcy dimeri) olarak plazmada bulunur. Ayrıca, plazmadaki tHcy'nin



çoğunluğunu %80-90 okside formları (S-homosisteinlenmiş proteinler ve N-homosisteinlenmiş proteinler) oluşturmaktadır. (32). S-homosisteinlenmiş proteinler ve N-homosisteinlenmiş proteinlerin yapısı Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8. S-homosisteinlenmiş proteinler ve N-homosisteinlenmiş proteinlerin yapısı (Skovierova’dan, 29)

S-homosisteinilasyon, HCY'nin serbest tiyol grubu aracılığıyla bir protein molekülündeki Cys kalıntısından türetilen başka bir serbest tiyol grubuna bağlanması ve disülfid bağı oluşturmaktadır. Bu değişikliklerin proteinlerin tiyol bağımlı redoks durumu üzerinde güçlü bir etkisi vardır. N-homosisteinilasyon, ATP varlığında metionil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.10) tarafından Homosisteinden sentezlenen HTL'nin lizil rezidüsüne karşı yüksek reaktivitesinin bir sonucudur. N-homosisteinilasyon, HTL'nin proteindeki bir lizin kalıntısının ε-amino grubu ile amino grubu tarafından etkileşime girdiğinde ve modifiye edilmiş proteinin yapısını ve işlevini değiştirdiğinde veya bozduğunda meydana gelir. *In vivo* olarak HTL, albümin, hemoglobin, immünoglobulinler, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), transferrin, alfa-1 antitripsin ve fibrinojeni hedefler ve yapısal-fonksiyonel değişikliklere sebep olur. Ayrıca HTL, sıçanların hipokampus, korteks ve beyin hücrelerinde Na⁺/K⁺-ATPaz (EC 3.6.3.9) inhibitörü gibi davranır. Nöronal hücreler üzerinde zararlı etki ile membran potansiyelini değiştirir. Yaygın olarak, N-homosisteinilasyon, yeni serbest tiyol gruplarının oluşması yoluyla proteinlerin işlevini etkiler ve serbest amino gruplarının inaktivasyonu yoluyla da proteinlerin genel redoks



potansiyelini etkiler ve ardından artan oksidatif stres ile sonuçlanır. N-homosisteinilasyonun patolojik sonuçları, büyük olasılıkla endoplazmik retikulum stresi, katlanmamış protein tepkisinin aktivasyonu, artmış protein bozulması, enzimatik inaktivasyon ve hatta amiloid oluşumu yoluyla sitotoksosite ile sonuçlanabilir. Ayrıca, N-homosisteinilasyon ile modifiye edilen proteinlerin neoantijenler gibi davranarak aterogenez, aterotromboz ve inne etiyolojisinin anahtar bileşeni olan inflamatuvar yanıtın aktivasyonunu tetikleyebildiği kanıtlanmıştır. Oluşan bu neoantijenler otoimmün yanıtı indükler ve bazı insan patolojilerinde (yani, serebrovasküler hastalık, böbrek yetmezliği) otoantikor konsantrasyonu normal bireylere kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Vasküler endotel hücrelerinin lümen yüzündeki N-homosisteinile proteinler, spesifik antikorlar tarafından tanınır ve bu neoantijen-otoantikor etkileşimi, tekrarlayan vasküler endotel hasarından sorumlu olan dolaşımdaki makrofajların aktivasyonuna yol açar. Ayrıca HTL, arter duvarında kollajen ve elastinin doğru çapraz bağlanmasından sorumlu olan lizil oksidazın (Lox; EC 1.4.3.13) doğrudan inhibisyonu yoluyla vasküler endotelin kendini yenileme yeteneğini bozar. Bu olayın damar sertliği oluşumu üzerinde güçlü etkileri vardır (29).

2.6. Metilglioksala Karşı Oluşan Antikorlar

Hiperglisemik koşullar altında, MGO oluşum hızı detoksifikasyon hızını aşarak plazmadaki MGO seviyelerinin yükselmesine ve glutatyon seviyelerinin azalmasına, dolayısıyla oksidatif strese neden olur. Hiperglisemi ve artan oksidatif koşullar nedeniyle proteinlerin daha fazla gliko-oksidasyonuna ve ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumuna neden olur. Bu durum proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarındaki değişikliklere neden olur ve insan vücudundaki immünolojik sistem tarafından tanınmasına da yol açabilir. Örneğin, insan serum albümini (HSA), 59 lizin ve 24 arjinin kalıntısı ile gliko-oksidasyon eğilimli kalıntılara sahip olan büyük ve birçok domaini olan bir proteindir. İnsan serum albümininin glukoz kaynaklı glikasyonu hakkında çok şey bilinmektedir ancak HSA'nın MGO tarafından enzimatik olmayan glikasyonu üzerinde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda insan serum albümininde metilglioksal aracılı konformasyonel değişiklikler olduğu ve MGO ile modifiye edilen HSA'nın immünojenitesinin arttığı gösterilmiştir (33).

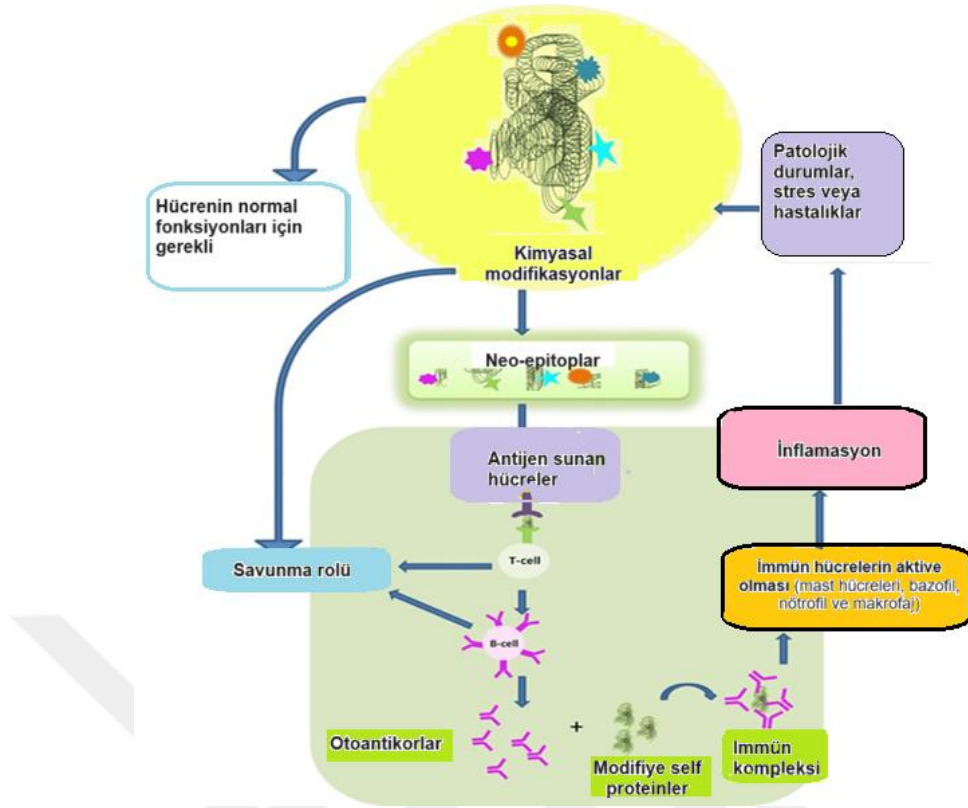


2.7. İnsanlarda Homosisteinlenmiş Proteinlere Karşı Oluşan Otoantikorlar

Homosistein-tiyolaktan birikimi, HCY'nin proteinlerin lizil kalıntılarının ϵ -amino grubuna bağlanarak proteinleri modifiye etme kabiliyeti nedeniyle zararlı olmaktadır. Bu tür N ϵ -Hcy -Lys-proteinler fonksiyonlarını kaybeder ve oksidatif hasara karşı daha duyarlı olurlar. N-bağlı protein HCY'nin insan plazma seviyeleri, plazma tHCY seviyeleri ile doğrudan ilişkilidir. Şimdiye kadar incelenen insan kan proteinlerinin (hemoglobin, serum albümin, γ -globulinler, LDL, HDL, transferrin, antitripsin ve fibrinojen dahil olmak üzere), küçük miktarlarda N-bağlı HCY içerdiği bulunmuştur. Bu HCY ile modifiye protein havuzu insan kanındaki tHCY havuzundan daha büyüktür (34).

İmmün sistemin aktivasyonuna neden olabilen birçok antijen (modifiye arter duvarı proteinleri ve oksitlenmiş veya glike edilmiş LDL gibi) tanımlanmıştır. N ϵ homosisteinlenmiş proteinlerin insan bağışıklık sistemi tarafından neoantijen olarak tanınıp tanınmadığı ile ilgili sınırlı sayıda çalışılma bulunmaktadır (34). Yapılan bazı çalışmalarda N ϵ -Hcy-Lys-proteinlerine karşı otoantikorların insan plazmasında oluştuğuna dair kanıtlar vardır (35-36). Bu çalışmalarda insanlarda oluşan otoantikorlar ile plazma tHCY ve inme arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Ayrıca plazma tHCY'nin serum anti-N ϵ -Hcy-Lys-protein otoantikoru ile ilişkilerinin tesadüfi olmadığına ve aşağıdaki mekanizma ile açıklanabileceği ifade edilmiştir. Homosistein seviyelerindeki yükselme, HTL miktarında da yükselmeye yol açar, bu da HCY'nin proteinlere dahil edilmesine aracılık eder ve böylece neoantijenlerin (N ϵ -Hcy-Lys-protein) oluşumuna yol açar. Neoantijen N ϵ -Hcy-Lys-protein seviyelerinin yükselmesi immün sistemi uyarak otoantior oluşumunu tetikleyebilir (33).





Şekil 9. Normal hücresel işleyişte ve bağışıklık yanıtında kimyasal modifikasyonların rolü (Bhat'dan, 38)

Bazı kimyasal modifikasyonlar normal hücresel işleyiş için gerekliyken, bazıları bağışıklık sisteminin otoantikor üretmesini tetikleyen neoepitop oluşumuna yol açar. Bu otoantikorlar antijenle etkileşime girerek diğer bağışıklık hücrelerini aktive eden bağışıklık kompleksleri oluşturur, bu da inflamasyon ve oksidatif strese yol açar. Bu da hastalık patolojisini artırır ve çeşitli kimyasal modifikasyonlara yol açar. Bu süreç, sisteme daha fazla zarar veren bir kısır döngü olarak devam eder.

Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında inme olan erkek hastalarda daha yüksek seviyelerde anti-Nε-Hcy-Lys-protein otoantikorlarının bulunması daha yüksek HCY düzeylerini yansıtmaktadır. Diğer otoantikorlar gibi, anti-Nε-Hcy-Lys-protein antikorları da faydalı veya zararlı olabilir. Örneğin, anti-Nε-Hcy-Lys-protein otoantikorları, Nε-Hcy-Lys-proteinlerini dolaşımdan temizleyerek faydalı sağlayabilir. Aksine, endotel hücrelerinde Nε-Hcy-Lys-proteinleri mevcutsa, bu vasküler damar yüzeyinde antijen-antikor komplekslerinin oluşumuna yol açarak zararlı olabilir. Anti-Nε-Hcy-Lys-protein otoantikorlarıyla kaplı endotel hücreleri, Fc reseptörü aracılığıyla makrofaj tarafından alınır ve bu da vasküler yüzeyde hasara neden olur. Hasarı başlatan Nε-Hcy-Lys neoantijeni



sürekli olarak mevcutsa, hasarlı damar duvarını onarmak için tekrarlanan girişimler aterosklerotik bir plak oluşumuna yol açabilir (33).

Burada açıklanan insan otoantikorları, Nε-Hcy-Lys epitopunun kendisini tanımlarının yanı sıra protein üzerindeki Nε-Hcy-Lys eklentilerini de tanıyabilir. Birçok kan proteininin N-homosisteinilasyonu gösterilmiştir (31,34). Diğer organlardaki proteinlerin de N-homosisteinilasyona uğraması muhtemeldir. Bu nedenle, Nε-Hcy-Lys neoepitopuna karşı gelişen otoantikorlar, birçok dokuda Nε-Hcy-Lys-proteinleri ile reaksiyona girebilir ve muhtemelen hiperhomosisteineminin birçok organ üzerindeki zararlı etkilerini açıklayabilir. Ancak, insan kan proteinlerinin belirli miktarda homosistein içerdiği bulunmuş olsa da, bu bir otoimmün yanıt oluşumu için gerekli ancak yeterli bir koşul değildir. Bu nedenle tüm otoimmün hastalıklarda olduğu gibi genetik yatkınlık ve diğer faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır (34).

2.8. Western Blot

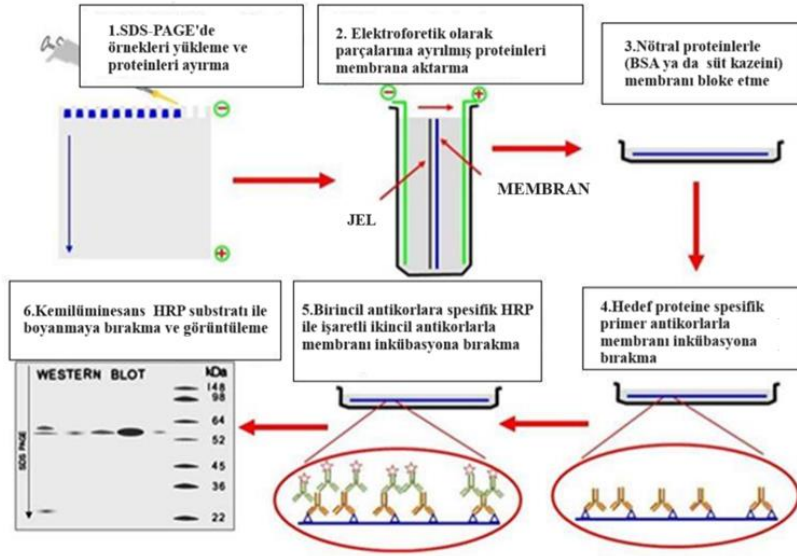
İmmünoablottama olarak da bilinen western blotlama, günümüzde dünyanın dört bir yanındaki moleküler biyoloji ve proteomik bilim laboratuvarlarında en yaygın kullanılan tekniklerden biridir. Hücrelerden veya dokulardan elde edilen protein karışımlarından hedef proteinleri tespit etmek ve miktarı hakkında yarı nicel bilgi elde etmek için kullanılan analitik bir yöntemdir. Western blotlama ayrıca, hem sağlıklı hem de hastalık durumlarında fizyolojik değişiklikler nedeniyle hücrede modifiye edilmiş posttranslasyonel olarak modifiye edilmiş proteinlerdeki spesifik amino asitlerin tanımlanmasına izin verir (39).

Bazı araştırmacılar western blotları eleştirmiş ve daha önce varsayıldığı kadar güvenilir olmayabileceğini öne sürmüş olsa da, proteinleri tanımlamak ve göreceli protein seviyelerini doğru bir şekilde ölçmek için kullanılabilecek etkili ve güçlü bir teknik olmaya devam etmektedir. Western blotlamanın güvenilirmez olduğuna dair iddiaların temelini kötü karakterize edilmiş antikorlar oluşturmaktadır. Ancak onaylanmış antikorların kullanılması, uygun doğrusal ve kantitatif dinamik aralığın belirlenmesi, western blotlamanın başarılı, tekrarlanabilir ve yarı kantitatif veya kantitatif bir uygulamasının elde edilmesini mümkün kılar (39).

Western blotlama, üç temel adımdan oluşmaktadır. İlk olarak, jel elektroforezi ile proteinler farklı boyutlara sahip olma prensibine dayanılarak ayrılır. Jel boyunca bir elektrik yükü iletildiğinde büyük proteinler jel üzerinde daha az hareket eder. Proteinler negatif yüklü olduğundan (sodyum dodesil sülfat (SDS) bağlanması nedeniyle) protein pozitif elektroda



doğru hareket eder. Proteinler daha sonra proteinleri kolayca bağlayan katı bir faza (membrana) aktarılır. Yine, proteinleri jelden membrana aktarmak için bir elektrik yükü kullanılır. Proteinler membrana aktarıldıktan sonra membran bloke edilir. Son aşamada proteinleri görünür hale getirmek için uygun floresan veya kemilüminesan birincil ve ikincil antikorları kullanarak hedef proteini işaretleme ile proteinlerin immünodeteksiyonu gerçekleştirilir (39). Western blotlama tekniğine ait prosedür Resim 1’de özetlenmiştir.



Resim 1. Western blotlama prosedürü (Aslım HP'den, 40)



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, alet ve malzemeler ile üretici firmaları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemeler ile üretici firmaları

Kullanılan cihazlar, laboratuvar alet ve malzemeler	Üretici firmaları
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Derin Dondurucular	Altus (-20 °C), Termo Electron Corporation (-80 °C)
Diyaliz Torbaları	Serva Servapor Dialysis, 44145 Sigma, D9277
Karbondioksit Tüpü	Erkuloğlu Sınai Tıbbi Gazlar San. ve Tic.Ltd.Şti.
Kromatografi Kolonu	Sigma
Liyofilizatör	Telstar, Cryodos
Etüv (37 °C)	Heraeus, B12
Elektroforez Sistemi	Biorad, Mini Protean 3 Cell,525BR
Elektroforez Görüntüleme Sistemi	Biorad, ChemiDoc MP
Filtre Kâğıdı	Sigma Diagnostics,074H6255
Hasss Terazı	Mettler Toledo, AB204-S
İnkübatör	Heraeus, Shel Lab Shaking Incubator
Manyetik Karıştırıcı	Ikamag, RH
Mikropleyt Okuyucu	Molecular Devices, VersaMax
Mikropleyt Yıkayıcı	Biotek, ELx50
Nitroselüloz membran (0.45 µm)	Bio-Rad (1620115)
Otomatik Pipet	Eppendorf, 0.5-10 µL
Otomatik Pipet	Socorex,10-100 µL
Otomatik Pipet	Eppendorf, 20-200 µL
Otomatik Pipet	Socorex, 100-1000 µL
Otomatik Pipet	Eppendorf, 1-5 mL
Peristaltik pompa	Pharmacia LKB-Pump P-1
pH metre	Hanna Instruments, HI 2211



Tablo 2. (Devam)

Kullanılan cihazlar, laboratuvar alet ve malzemeler	Üretici firmaları
pH metre probu	Hanna Instruments, HI 1131
Polikarbonat santifüj tüpü	50 mL kapasiteli, Beckman, 357002
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge, 5810
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter, Allegra 64R
Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1601
Whatmann Kâğıdı 3 mm	Ge-Healthcares (3030-861)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ölçüm Kitleri

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve üretici firmaları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar

Kullanılan Kimyasal Madde	Üretici Firma
Rabbit Anti-Homocysteine (HCy)	US Biological Life Sciences (151837)
Anti-Methylglyoxal antibody	Abcam [9F11] (ab243074)
Acrylamide/Bis Solution 29:1 (40 % w/v)	Serva (SE1068001)
Amonyum Persülfat (APS) ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Serva (13375.05)
Asetik Asit (CH ₃ COOH)	Sigma (27225)
Aseton (CH ₃ COCH ₃)	Merck (1.00014)
Bromfenol Mavisı	Merck (1.08122.005)
Complete Freund Adjuvant	Sigma (F5881-6X)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma (27816)
Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (1.06580)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (D0632)
Etanol (C ₂ H ₆ O)	Sigma (34870)
Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	Sigma (101493215)
Enhanced Chemiluminescence (ECL) Substrate	Biorad (1705060)
Gliserol	Sigma (49770)
Glisin	Selva (23390.04)
HRP takılı goat anti-mouse IgG,Fc	Abcam (ab97265)
HRP takılı goat anti-rabbit IgG,Fc	Abcam (ab97200)



Tablo 3. (Devam)

Kullanılan Kimyasal Madde	Üretici Firma
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck (1.00317)
%40'luk Metilglioksal (CH_3COCHO)	Sigma (M0252)
Metanol (CH_3OH)	Merck (65541), Sigma (34860)
Incomplete Freund Adjuvant	Sigma (F5506-10X)
İzopropanol	Labkim (P.0428.01.21)
Kloroform	Merck (1.02431)
L-Tirozin	Sigma (T3754)
L-Homosistein Tiyoalakton hidroklorür $\geq 98\%$ (TLC)	Sigma (H6503)
N,N,N N-Tetra Metil Etilen Diamin (TEMED)	Serva (35925.01)
Orto-fenilen diamin	Sigma (P9029)
Pierce™ BCA Protein Test Kiti	Thermo Scientific (23225)
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Merck (Art 4871)
Potasyum Klorür (KCl)	Merck (1.04936)
Precision Plus Protein™ Western CTM Blotting Standards	Bio-Rad (1610374)
Sefaroz -4B	Sigma (4B200)
Sitrik Asit Monohidrat ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck (1.00244)
Siyanojen Bromür (CNBr)	Sigma (C91492)
Sodyum Azid (NaN_3)	Merck (K36388)
Sodyum Asetat Trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Merck (1.06265)
Sülfürik Asit (H_2SO_4)	Sigma (258105)
Sülfanilamid ($\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$)	Sigma (S-9251)
Trisodyum Sitrat Dihidrat ($\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck(1.06432)
Tris(hidroksimetil)aminometan, ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)	Sigma (T1503)
Tris-Barbital- Sodyum Barbital	Helena Laboratories (5805)
Tween-20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)	Merck (8.22184)
Yağsız Süt Tozu	Bağdat Baharat (2495)



3.2. Yöntem

3.2.1. Karbonik Anhidraz II Enziminin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması

Karbonik anhidraz II izoenziminin insan eritrositlerinden saflaştırılması için Sefaroz 4B'ye kenetlenmiş sülfanilamid yöntemine dayalı afinite kromatografisi uygulandı. Kolondan alınan eluatlardaki enzim, elüsyon ortamından kaynaklı tuz bileşenlerinden uzaklaştırılması amacıyla diyaliz edildi. Ardından elde edilen çözeltiye liyofilizasyon yöntemi ile saf enzimin derişik hali elde edildi (3).

3.2.1.1. Afinite Kolon Jelinin Hazırlanması

Kolon matriksi Sefaroz-4B, CNBr ile aktive edildikten sonra kullanıldı. Ardından L-tirozin bu kolon dolgu materyaline kovalent olarak bağlandı. Karbonik anhidraz enzimini kolonda tutmak için de CA'nın inhibitörü olan sülfanilamid L-tirozine takıldı (3). Hazırlanan jel kolona yüklendi.

A.Sefaroz-4B'nin Aktivasyonu ve L-Tirozinin Eklenmesi

Kullanılan Çözeltiler:

4 M NaOH: 8 g NaOH tartıldı ve son hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

NaHCO₃ (0.1 M, pH 10): 2.1 g NaHCO₃ tartıldı ve yaklaşık 200 mL saf su ile çözülerek, 4 M'lık NaOH çözeltisi kullanılarak pH 10'a ayarlandı ve son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

L-Tirozin (2 mg/mL): 80 mg L-tirozin tartıldı ve 40 mL 0.1 M NaHCO₃ (pH 10) çözeltisi içerisinde çözüldü.

1 M NaOH: 10 g NaOH tartıldı ve 200 mL saf suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

NaHCO₃ (0.2 M, pH 8.8): 1.68 g NaHCO₃ tartıldı ve 80 mL saf suda çözüldükten sonra 1 M NaOH çözeltisi ile pH 8.8'e ayarlandı son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Sefaroz-4B kolon matriksini aktifleştirmek için, 20 mL ticari olarak satın alınan jel üzerine eşit hacimde soğuk saf su eklendi ve hafifçe karıştırıldı. Ardından 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek yıkandı ve sulu kısım uzaklaştırıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Son aşamada 20 mL jel üzerine 20 mL soğuk saf su eklendi ve 250 mL'lik behere aktarıldı. Sonraki işlemlerin çeker ocak kabini içerisinde, manyetik karıştırıcı üzerine olmasına dikkat



edildi. Hazırlanan jelin olduğu beher, buz banyosu ortamında içerisine pH probu bırakılarak sürekli düşük hızda karıştırıldı. Bu aşamada jelin pH değeri 7 civarındadır. Daha sonra jelin üzerine oldukça toksik olan 4 g'lık CNBr'ün tartımı çeker ocakta yapılarak ilave edildi. CNBr ilavesinden sonra ortamın pH değeri 10.4'e ulaştı. Hemen ardından 4 M'lık NaOH çözeltisi pH 11'de sabitleninceye kadar ilave edildi. Bu işlem yaklaşık 15 dk sürdü. Gerçekleşen reaksiyon ekzotermik olduğundan çözelti ortamının soğuk kalması için saf su ile hazırlanan küçük buz parçaları da bu süreçte bol miktarda reaksiyon ortamına eklendi. Yukarıda bahsedilen jelin aktif halde kalması için ilave edilen CNBr'nin jeldeki hidroksil grupları ile oluşturduğu –OCN yapısı düşük kararlılıkta olduğundan L-tirozinin ilave edilmesi işleminin 90 saniye gibi oldukça kısa bir süre içerisinde gerçekleştirilmesi gerekir. Aksi halde süre uzadığında aktifleşen gruplar tekrar –OH gruplarına dönüşebilir ve tirozin katılması bu durumda gerçekleşmez. Bu sebeple, CNBr ile aktive olan Sefaroz-4B (pH 11'e ayarlanmış), hızlıca filtre kağıdı konulmuş bühner hunisinden su trombu kullanılarak süzüldü ve 250 ml soğuk 0.1 M NaHCO₃ (pH 10) çözeltisi ile yıkandıktan sonra ve temiz bir behere alındı. Bu jelin üzerine aynı tampon ile hazırlanan 40 ml hacimde çözünmüş 80 mg'lık L-tirozin çözeltisi eklendi. L-tirozinlerin tamamen takılması için süspansiyon öncelikle 2 saat boyunca 4°C'de bir manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve sonra 4°C'de 16 saat bekletildi. Bu süre sonunda süspansiyon yaklaşık 1.5 litre soğuk saf su ile yıkandı. Yıkama suyu absorbands vermeyinceye kadar (280 nm'de en az 0.02 absorbands değerini görünceye kadar) yıkanarak reaksiyona girmeyen L-tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Son olarak yıkama işlemi 100 mL NaHCO₃ tamponu (0.2 M, pH 8.8) ile tekrarlandı. Yıkanan L-tirozin bağlanmış jelin kuru kalmamasına dikkat edilerek temiz bir behere alındı ve üzerine aynı tampondan 40 mL ilave edildi.

B. Sülfanilamid Grubunun Bağlanması

Kullanılan Çözeltiler

1 M HCl: 830 µL %37'lik HCl (d: 1.19 g/mL) alındı ve 8 mL saf suda çözülüp hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

Sülfanilamid (2.5 mg/mL): 25 mg sülfanilamid tartıldı ve 10 mL 1M'lık HCl içinde çözelti hazırlandı.

NaNO₂ (15 mg/mL): 75 mg NaNO₂ tartıldı ve 5mL saf suda çözüldü.

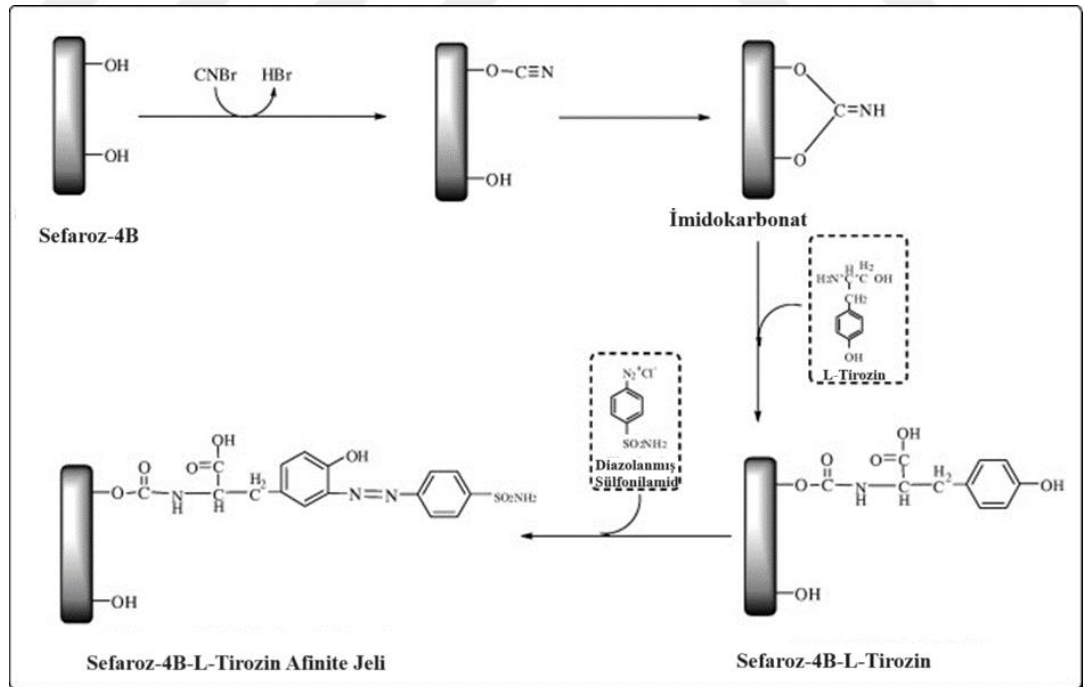
1 M H₂SO₄: 2.72 mL %98'lik H₂SO₄ (d:1.84 g/mL) alındı ve 40 mL saf suda çözülüp hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.



Tris-SO₄ (0.05 M, pH 7.4): 3.03 g Tris tartıldı ve 450 mL saf suda çözülüp, 1 M H₂SO₄ ile pH 7.4'e ayarlanıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Öncelikle diazolanmış sülfonamid hazırlandı ve karbonik anhidraz enzimini spesifik olarak bağlayan bir parça oluşturmak için L-tirozin ile birleştirildi. Bu işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir: 2.5 mg/mL'lık sülfanilamid (inhibitör çözeltisi), 10 mL'lik 1 M HCl içinde çözüldü ve buz banyosu içinde 0°C'de bekletildi. Buz içerisindeki bu çözeltinin üzerine 15 mg/mL'lık 5 mL hacimdeki NaNO₂'den damla damla eklendi. Yaklaşık 10 dakikalık bir reaksiyon süresinden sonra, keskin bir koku oluşumu ile diazolandığı anlaşılan sülfonamid çözeltisinin tamamı 40 mL Sefaroz-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. Elde edilen çözeltinin pH değeri 1 M NaOH ile 9.5'e ayarlandı, jelin rengi pH 8'den sonra kırmızıya döndü ve oda sıcaklığında 3 saat boyunca yavaşça karıştırıldı. Daha sonra bühner hunisinden süzülen jel, 1 L soğuk saf su ve ardından 200 mL soğuk 0.05 M Tris-SO₄ (pH 7.4) tamponu ile yıkandı, tüm yıkamalarda olduğu gibi jel taneciklerinin tamamen kurumamasına özen gösterildi ve aynı tamponda saklandı. Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite matriksinin sentezlenmesi Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite matriksinin sentezi (Atasever'den, 41)



3.2.1.2. Hemolizatin Elde Edilmesi

Kullanılan Çözeltiler

İzotonik Tuz Çözeltisi (%0.9'luk NaCl): 9 g NaOH tartıldı ve 900 mL saf suda çözüldükten sonra hacmi 1 L'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Karbonik anhidraz enzimini saflaştırmak için kullanılacak kanlar kan bankasından eritrosit süspansiyonu paketleri halinde temin edildi (son kullanım tarihi yeni geçmiş). Alınan kan örneği 50 mL'lik polikarbonat falkon tüplerin yarısına kadar koyuldu ve eşit hacimde izotonik tuz çözeltisi ilave edilerek tüpler alt üst edilerek karıştırıldı. Ardından 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve üst kısmı şeffaf renk oluncaya kadar birkaç kez yıkandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra eritrosit paketleri elde edildi. Oluşan eritrosit paketlerinin üzerine 1.5 katı hacimde soğuk saf su ilave edilerek hemoliz olmaları sağlandı. Eritrositlerin tamamen hemoliz olması için elde edilen hemolizat 4°C'de 30 dk boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Hemolizattaki hücre zarlarını ayırmak amacıyla örnekler 4°C'de 20000 rpm'de 40 dk santrifüj edildi. Hemolizatin santrifüjünden sonra süpernatant kısmı behere alındı, alt kısımda yoğun kıvamdaki hücre membranlarının alınmamasına dikkat edildi. Son olarak hemolizat manyetik karıştırıcı üzerine alınarak pH 8.7'ye katı Tris ilave edilerek ayarlandı. En geç iki gün içinde kullanılacaksa 4°C'de, daha uzun süre bekletilecekse uygulanana kadar -20°C'de saklandı.

3.2.1.3. Saflaştırma Kolonun Hazırlanması ve Hemolizatin Kolona Uygulanması

Kullanılan Çözeltiler

Dengeleme Tamponu (25 mM Tris-0.1 M Na₂SO₄ pH 8.7): 3.03 g Tris ve 14.2 g Na₂SO₄ tartıldı, 900 mL saf suda çözüldü, 1M H₂SO₄ ile pH 8.7'ye ayarlandı ve hacim saf su ile 1L'ye tamamlandı.

Yıkama Tamponu (25 mM Tris-22 mM Na₂SO₄ pH 8.7): 3.03 g Tris ve 3.12 g Na₂SO₄ tartıldı, 900 mL saf suda çözüldü, 1M H₂SO₄ ile pH 8.7'ye ayarlandı ve son hacim saf su ile 1L'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Hazırlanan afinite jelinin üst kısmındaki 0.05 M Tris-SO₄ (pH 7.4) sıvı, jelden kayıp olmamasına ve jelin kuru kalmamasına dikkat edilerek pastör pipetiyle uzaklaştırıldı, oda sıcaklığına getirilen jelin üzerine aynı sıcaklıktaki dengeleme tamponu ilave edildi. Kolon içerisine de dengeleme tamponu dolduruldu ve kapağı kapatıldı. Peristaltik pompa



kullanılarak kılcal boruların tamponla doldurulması sağlandı ve kolondaki sıvı seviyesi kapağın 1-2 cm aşağısında olacak şekilde ayarlandı. Peristaltik pompanın sıvı akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde, cihazın üzerinde yer alan gösterge 1X ve 7-8 arası olarak ayarlandı. Bu esnada kolonun üst kapağına yerleşik kılcal borunun ucu manyetik karıştırıcı üzerinde devamlı düşük devirde karıştırılan jel süspansiyonu içerisine yerleştirildi ve jelin yavaşça kolona yüklenmesi sağlandı. Jelin kolona yerleştirilmesi tamamlanıncaya kadar jelde kuruma olmamasına ve bütünlüğünün bozulmamasına önem gösterildi. Jelin kolona aktarımı tamamlandıktan sonra jel içerisinden aynı akış hızı ile 24 saat dengeleme tamponu geçirilerek jel dengelenmeye bırakıldı. Bu hız tüm çalışma boyunca sabit tutuldu.

Hazırlanan 20 mL'lik afinite jeli için her bir çalışmada kullanılacak 50 mL eritrosit hemolizatına yaklaşık 50 mL dengeleme tamponu ilave edilerek seyreltildi ve oda sıcaklığına getirilen hemolizat ile hazır haldeki afinite kolonu sistemine kılcal borunun ucu devamlı karıştırılan manyetik karıştırıcı üzerindeki hemolizat içerisine daldırılarak yüklendi. Eritrosit hemolizatının tamamı kolondan geçirildiğinde CA I ve II izoenzimleri kolona bağlandı, bağlı olmayan proteinleri uzaklaştırılması için kolon 25 mM Tris-22 mM Na₂SO₄ (pH 8.7) yıkama tamponu ile yıkandı. Absorbansın 280 nm'de 0.02'den küçük olması tüm çalışma boyunca yıkama ve bir diğer tampona geçmek için teyit noktası olarak kabul edildi.

İnsan CAII enzimini saflaştırmadan önce hCAI enzimini jelden almak gerektiğinden, sırasıyla önce hCAI ardından hCAII izoenzimleri kolondan alındı. İnsan CAI ve hCAII izoenzimlerinin elüsyonu saflaştırma prosedürleri sırasında 280 nm'de izlendi.

3.2.1.4. Karbonik Anhidraz I Elüsyonu

Kullanılan Çözeltiler

CAI Elüsyon Tamponu (50 mM Na₂HPO₄-1 M NaCl pH 6.3): 7.1 g Na₂HPO₄ ve 58.5 g NaCl tartıldı ve 900 mL saf suda çözüldü, çözeltinin pH değeri 1 M HCl ile 6.3'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Yıkama tamamlandığında afinite kolonundan ilk olarak CAI izoenziminin elüsyonu için 50 mM Na₂HPO₄-1 M NaCl pH 6.3 tamponu kullanıldı. Akış hızının değiştirilmeden aynı kaldığı 20 mL/saat sisteminde eluatlar her 15 dk'da 5'er mL halinde ayrı tüplere toplandı. Eluatların 280 nm'deki absorbansları ölçülerek CAI izoenziminin kolondan tamamen toplandığı anlaşıldı. Eluatlar 4 °C'de saklandı.



3.2.1.5. Karbonik Anhidraz II Elüsyonu

Kullanılan Çözeltiler

CAII Elüsyon Tamponu (0.1 M CH₃COONa-0.5 M NaClO₄ pH 5.6): 9.19 g NaClO₄ ve 2.04 g CH₃COONa.3H₂O tartıldı, 125 mL saf su ile çözüldü, çözeltinin pH değeri 1M HCl ile 5.6'ya ayarlandı ve hacmi saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

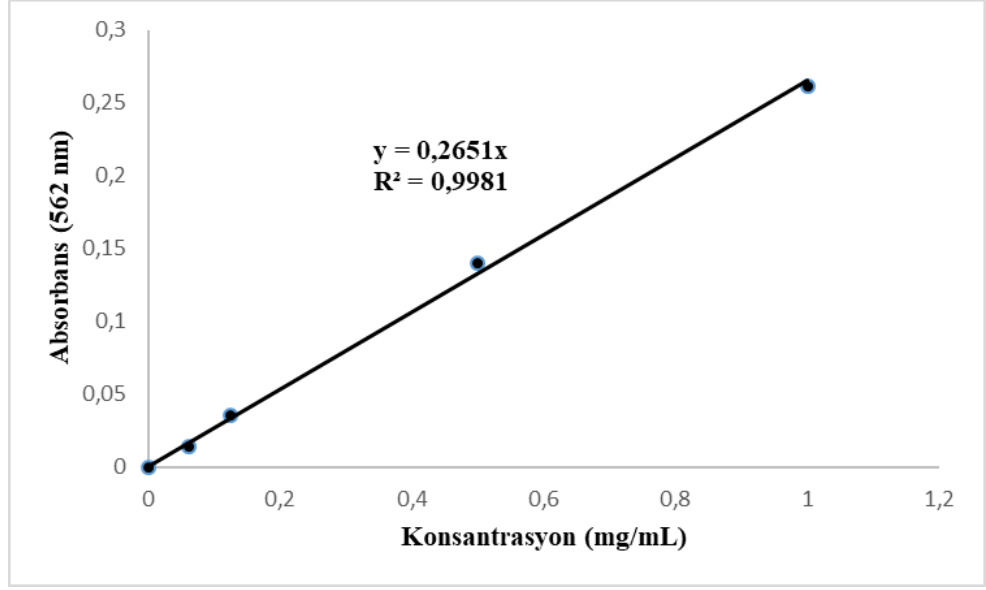
Kolondan elüsyonu tamamlananan CAI izoenziminin (elüent absorbandsının 280 nm'de okunan değerinin 0.02'nin altına düşmesinin) ardından kolona CAII elüsyon tamponu (0.1 M CH₃COONa-0.5 M NaClO₄ pH 5.6) akış hızı değiştirilmeden verildi. Eluatlar 5'er mL'lik hacimlerde deney tüplerine alındı. Bu işlem elüent absorbands değerinin 280 nm'de 0.02'nin altına düşmesine kadar devam edildi. Eluatlar 4 °C'de saklandı.

Elüsyon işleminin ardından kolona tekrar dengeleme tamponu uygulandı ve afinite jeli bir sonraki kullanıma kadar %0.02'lik sodyum azid içeren dengeleme tamponu içerisinde 4 °C'de saklandı. Enzim verimine bağlı olarak afinite kolon jeli bir kez sentezlendiğinde ortalama beş defa kullanıldı. Tüm bu işlemler saflaştırılmak istenen enzim miktarı elde edilinceye kadar tekrar edildi.

3.2.2. Eluatlarda Protein Tayini

Eluatların 280 nm'de ölçülen absorbandsları ile protein miktarı belirlendi. Ayrıca eluatlardaki enzim miktarının ve aktivitesinin hesaplanmasında kullanmak üzere protein miktarı bisinkoninik asit (BCA) protein ölçüm kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Novagen, Merck Millipore Almanya, katalog numarası: 71285-3). Çalışmada standart olarak 2 mg/mL'lik sığır serum albümininin seri dilüsyonları kullanıldı. Standart protein konsantrasyonuna ait grafik Şekil 11'de verilmiştir.





Şekil 11. Standart protein konsantrasyonu

3.2.3. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Tayini

Kolondan 5 mL hacimlerde toplanan eluatlarda hCAII enzimi için hidrataz aktivite ölçümleri modifiye edilmiş olan Wilbur-Anderson metoduna göre yapıldı (42). Bu yöntem CO₂'in hidrasyonu sonucunda oluşan H⁺ iyonu etkisiyle pH değişiminin 8.2'den 6.5'e düşüşünün takip edilmesi ve geçen sürenin kaydedilmesi prensibine dayanmaktadır. Wilbur-Anderson metoduna göre yapılan hCAII enzim aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımında kullanılan reaktifler ve hacimleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Wilbur-Anderson metoduna göre yapılan hCAII enzim aktivitesi için reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör Değeri için Kullanılan Hacim (µL)	Enzim Elüsyonu için Kullanılan Hacim (µL)
Veronal tampon	1600	1600
Su	300	300
Enzim	-	100
Elüsyon Tamponu	100	-
Doygun CO ₂	2200	2200
Toplam	4200	4200



Kullanılan Çözeltiler

Veronal tampon çözeltisi (0.025 M):

Tekli paketler halindeki 18 g'lık Tris-barbital-sodyum barbital'in tamamı 800 mL saf suda çözülüp pH 8.15'e ayarlandı ve hacim saf su ile 1L'ye tamamlandı. Aktivite ölçümünden önce 1:1 oranda saf su ile seyreltildikten sonra kullanıldı. Oda sıcaklığında ayarlanan pH değeri 8.15 iken, 0°C'de pH: 8.7 değerine ulaştı.

Doygun CO₂ Çözeltisi: 250 mL saf su, buz banyosu içerisinde bir erlen içerisinde konuldu ve ağzı parafilmle kapatıldı, küçük bir boşluk açılarak 45 dk boyunca CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesi 0°C'de pH düşüşünün takibine dayanan potansiyometrik metodla ölçüldü. Ölçümlerde kullanılan pH elektrodunun tüpün ağzına denk gelen kısmının çevresi parafilmle iyice sarılıp reaksiyon tüpünün içine gaz kaçağı olmayacak şekilde yerleştirilmesi sağlandı. Ayrıca bu pH elektrodu ve ısı probu tüm ölçümler boyunca veronal tampon içeren temiz tüpler içerisinde buz banyosunda muhafaza edildi. Diğer çözeltiler (veronal tampon, su ve doymuş CO₂ çözeltisi) ve eluatlar da buz banyosunda tutuldu. Deney tüpleri hemen ölçüm öncesinde buz banyosu içerisine konulup gerekli pipetlemeler Tablo 4'teki gibi yapıldı. Reaksiyon doymuş CO₂ çözeltisi ilavesiyle başlatıldı. pH'nın 8.2'den 6.5'a düşüşü kronometre ile takip edildi.

Aktivite ölçümlerinde seyreltmeler yapılırken, enzimsiz ölçülen sürenin 120-140 saniye arasında olmasına ve enzimli ölçümlerde ise bu sürenin yarıya indiği veya en az 60 saniye olmasına dikkat edildi. Tüm ölçümler en az üç tekrarlandı ve geçen sürelerin ortalaması kullanıldı. CO₂ hidrataz aktivitesi enzim ünitesi olarak Eşitlik 1'deki gibi hesaplandı.

$$EU = (t_0 - t_c) / t_c$$

(Eşitlik 1)

EU: enzim ünitesi, t₀:enzimsiz ölçülen süre, t_c: enzim varlığında ölçülen süre



3.2.4. SDS-PAGE (Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi)

Afinite kromatografisi ile elde edilen hCAII izoenziminin saflığını göstermek için Laemmli tarafından geliştirilen SDS-PAGE metodu modifiye edilerek kullanıldı (43).

Kullanılan Çözeltiler

Ayrırma Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 8.8): 18.17 g Tris tartılarak 80 mL saf suda çözüldü, pH'ı %37'lik HCl ile 8.8'e ayarlandı, toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Yükleme Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 6.8): 18.17 g Tris tartılarak 80 mL saf suda çözüldü, pH'ı %37'lik HCl ile 6.8'e ayarlandı, toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

% 10 (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat: 2 g SDS 20 mL saf suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE Tank Tamponu (10 X): 30.3 g Tris ve 144 g glisin 1 L saf suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı. Çalışma çözeltisinin 1X olması için 100 mL SDS-PAGE Tank Tamponu (10 X), 890 mL saf su ve 10 mL %10'luk (w/v) SDS ilave edilerek hazırlandı.

% 10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS): 100 mg APS 1 mL saf suda çözüldü ve 4 °C'de bir hafta içinde kullanılmalıdır. Daha uzun süreler için -20°C'de saklanmalıdır.

SDS PAGE Numune Yükleme Tamponu (5X): 5 mL yükleme tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 6.8), 5 mL gliserol, 1 g SDS, 1 mg bromfenol mavisi 10 mL'lik karışım içerisinde çözüldü ve 1'er mL'lik hacimlerde ependorflara alındı ve -20°C'de saklandı. Kullanmadan önce 77.1 mg DTT'den ilave edilerek iyice karıştırılarak kullanıldı ve tekrar -20°C'de saklandı.

Sabitlenme Çözeltisi: %50 izopropanol, % 10 TCA ve % 40 saf su ile hazırlandı (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılır).

Renklendirme Çözeltisi: 0.66 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 120 mL metanol, 24 mL asetik asit ve 120 mL saf su ilave edilerek hazırlandı.

Renksizleştirme Çözeltisi: %7.5 asetik asit, %5 metanol ve %87.5 saf su ile hazırlandı.



3.2.4.1. SDS- PAGE Jellerinin Hazırlanması

Çalışılan hCAII izoenziminin molekül ağırlığına en uygun jel olan %5'lik yükleme jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanıldı.

Tablo 5. % 5-12'lik (2x1.5mm) SDS poliakrilamid jelinin hazırlanışı

Kimyasallar	% 5 lik Yükleme Jeli (mL)	% 12'lik Ayırma Jeli (mL)
Saf su	4.62	6.51
%40 akrilamid karışımı	0.94	4.5
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	-	3.75
1.5 M Tris-HCl pH 6.8	2.34	-
%10 SDS	0.075	0.15
%10 APS	0.075	0.15
TEMED	0.0075	0.015
Toplam	8.055	15.075

Jeli hazırlamadan önce kullanılacak camlar önce saf su ile ardından %70'lik etil alkol ile üç kez silinerek temizlendi. Uzun ve kısa cam birleştirildi ve jel hazırlama standına yerleştirildi. Jellerin rahat karıştırılması için 50 mL'lik falkon tüp kullanıldı. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı ve camların üst kısmına yaklaşık 1 cm mesafe kalıncaya kadar yüklendi. Üzerine 1 mL izopropil alkol ilave edildi, jelin düzgün olması ve açık kısmının kurumadan donması için yaklaşık 40 dk beklendi. (İstenirse yükleme jeli hemen hazırlanabilir, ancak karışımdaki APS ve TEMED hemen yükleme öncesi ilave edilmeli, ardından hafifçe karıştırılmalı ve hemen camlar arasına aktarılmalıdır.) Ayırma jeli donduktan sonra üzerindeki izopropil alkol uzaklaştırıldı ve saf su ile 2-3 kez yıkandı, kalan su damlacıkları kağıt peçeteye çektilirdi. Hazırlanan yükleme jeli, ikinci bir jel olarak ilave edildi, hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi ve kuyucuk tarakları da yerleştirildikten sonra yine yaklaşık 40 dk bekletildi. Donan jel hazırlama standından alındı, camların dışı saf su ile yıkandı, eğer hemen kullanılacaksa kuyucukları oluşturan tarak çıkarıldı ve saf su ile tüm kuyucukların içi de yıkandı. Eğer jel daha sonra kullanılacaksa camlar arasındaki kuyucuk tarağı çıkarılmadan camın etrafı yıkandı, streç film üzerine kağıt peçete



yerleştirilerek ıslatıldı ve merkezine cam içindeki jel koyularak tamamen ıslak kalması sağlanarak paketlenildi. Hazırlanan jel 4°C’de saklandığında bir hafta içinde kullanılmalıdır.

Camlar arasında hazır olan jel taraklarından uzaklaştırılıp saf su ile yıkatıldı ve tanktaki haznesinde karşısında dengeleyicisi ile birlikte yerleştirildi. Tank tamponunun jelin kuyucuklarının üzerinde olmasına dikkat edildi. Jel yürütme tamponu içinde örnekleri yüklemeye hazır halde bekletildi. Eluatların protein tayini yapıldı ve proteinlerin üzerine uygun miktarda yükleme tamponu eklendi 1:4 (yükleme tamponu (5x): numune) oranında bir karışım elde edildi. Denatürasyon için örnekler (eluatlar) 95°C’de 5 dakika kaynatıldı. 12000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Hemen ardından kuyucuklara yaklaşık 2 µg örnek, 20 µL hacim içinde ve 1 µL markır üzerine 19 µL yükleme boyası yüklendi. Örnekler 80 Voltta 10 dk, ardından 110 Voltta yaklaşık 60-90 dk saat yürütüldü. Yürüme, yükleme boyası ve markırın yürüme hızı kontrol edilerek tamamlandı. Yürütme işleminden sonra jel tanktan alındı, saf su ile yıkandı. İki cam arasına spatula sokularak jel kısa cam üzerinde kalacak şekilde camlar birbirinden ayrıldı. Jelin yükleme jeli kısmı spatula ile kesilip atıldı. Jel temiz bir kaba alındı. Üzerini geçecek şekilde sabitleştirme çözeltisi ilave edildi ve 20-30 dk çalkalayıcıda bekletilerek proteinlerin jelde sabitlenmesi sağlandı. Daha sonra sabitleme çözeltisi uzaklaştırıldı ve renklendirme çözeltisi ilave edilip 20-30 dk çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Ardından renklendirme çözeltisi uzaklaştırılıp renksizleştirme çözeltisine alındı. Jelin zemin renginin şeffaf hale gelip protein bantları belirginleşinceye kadar çözelti değiştirildi, 1 gece aynı çözelti içinde 4°C’de bekletildikten sonra jel saf su içine alınıp görüntülendi. Sonuçlar Resim 2’de verilmiştir.

3.3. Saflaştırılan hCAII Enziminin *in vitro* Modifikasyonları

3.3.1. hCAII Enziminin Metilglioksal ile Modifikasyonunun Doğrulanması

Kullanılan Çözeltiler

Ticari olarak satın alınan %40’luk metilglioksalın (Ma: 72.06 g/mol, d:1.17 g/mL) konsantrasyonunun 6490 mM olduğu hesaplandı. Modifikasyonlar için 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) kullanılarak gerekli dilüsyonlar yapıldı.

50 mM Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7.4): 5.450 g Na₂HPO₄.2H₂O ve 3.023 g NaH₂PO₄.2H₂O tartıldı, 900 mL saf suda çözüldü ve 1 M HCl ile pH 7.4’e ayarlandı, hacmi saf su ile 1 L’ye tamamlandı.



Derişik haldeki CA II enzimi kullanılarak her modifikasyon ortamında son protein konsantrasyonu eşit (1 mg/mL) CAII enzimi içeren, farklı konsantrasyonlardaki (0, 1, 2.5 ve 5 mM) MGO ile 50 mM'lık sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde ependorfların kapağı kapatılarak, 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

3.3.2. hCAII Enziminin Homosistein-tiyolakton ile Modifikasyonu

3.3.2.1. Western Blot Yöntemi

Kullanılan Çözeltiler

1 M HTL çözeltisinin hazırlanışı: Liyofilize halde satın alınan 100 mg'lık saf HTL (Ma: 153.63 g/mol) konsantrasyonu 1M olacak şekilde ultra saf su ilave edilerek çözüldü ve -20 °C'de saklandı.

Derişik haldeki hCAII enzimi son protein konsantrasyonu eşit 1 mg/mL hCAII enzimi içeren farklı konsantrasyonlardaki (0, 0.5, 1, 5, 25 ve 50 mM) HTL ile 50 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.4 ve 0.2 mM EDTA içerisinde, ependorfların kapağı kapatılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

3.3.2.2. Ellman Yöntemi

Son protein miktarı 1 mg/mL olacak şekilde hCAII proteini, farklı konsantrasyonlardaki (0, 1, 5 ve 25 mM) HTL olacak şekilde ayrı ependorf kapaklı tüplerinde 50 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.4 ve 0.2 mM EDTA'lı çözelti içinde, 24 saat 37°C'de modifikasyona bırakıldı. Modifiye edilen enzimler, amicon ultra-0.5 santrifüj filtreli (Merck Millipore, ABD) tüp içerisine aktarıldı ve tampon değişimi ve konsantrasyon işlemi uygulandı. Bu işlem aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

1. Amicon ultra-0.5 santrifüj filtresine (proteinin moleküler ağırlığına bağlı olarak 10 kDa) 100 µL modifiye protein ve 350 µL, 50 mM fosfat tamponu pH 7.4, 0.2 mM EDTA ve DTT (HTL ile aynı konsantrasyonda) eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
2. 15 dk boyunca 14.000 × g'de 25°C'de santrifüj edildi. Filtre üzerindeki protein en az üç kez 50 mM fosfat tamponu pH 7.4 ve 0.2 mM EDTA ile yıkandı (her yıkama için 450 µl ilave edildi). Her filtrasyondan sonra, içinden geçen fraksiyonu atıldı ve filtredeki proteine yeni bir tampon çözelti eklendi.
3. Konsantre ultrafiltrat numuneyi filtreden tüpe aktarmak için 1000xg'de 2 dk santrifüj edildi.



Elde edilen örnekler daha sonra sonraki analizler için kullanıldı.

3.3.2.3. Ellman Reaktifi Kullanılarak Serbest Sülfhidril (-SH) Grup Belirlenmesi

Toplam serbest sülfhidril içeriği, bazı küçük değişikliklerle Ellman tarafından tanımlanan yöntem ile gerçekleştirildi (41). HTL ile modifiye olan CAII'deki tiyol gruplarının seviyeleri DTNB kullanılarak test edildi. Absorbanslar, 1 cm'lik yol uzunluğunda bir küvet kullanılarak 415 nm'de ölçüldü. Oluşan 5'-nitrotiyobenzoat miktarı, $13.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ molar absorbtivite katsayısı (ϵ) kullanılarak hesaplanmıştır.

Son protein konsantrasyonu BCA kiti kullanılarak belirlendi.

Deneyin yapılışı

1. Bir ELISA pleyt kuyucuğuna 90 μL su ve 10 μL modifiye edilen protein eklendi (kullanılan protein miktarının ölçüm yöntemin doğrusal aralıkta olması için optimize edilmesi gerekir).
2. Üzerine 8 mg/mL konsantrasyonda 10 μL Ellman reaktifi (0.1 M fosfat tamponu, pH 8) eklendi.
3. Plaka karanlıkta oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
4. 415 nm'de absorbansı ölçüldü.

3.4. Diyaliz

Afinite kromatografisi ile toplanan ve hidrataz aktiviteleri ölçülen aktif enzim solüsyonları tampon bileşenlerinin ve modifikasyonlar sonunda enzime bağlanmadan kalan serbest HTL ve MGO'nun ortamdan uzaklaştırılması için yapıldı (3, 45).

Kullanılan Çözeltiler

Diyaliz Membranı için Aktifleştirme Tamponu (NaHCO_3 (100 mM) / EDTA(10 mM) pH 7.4): 8.4 g NaHCO_3 ve 2.92 g EDTA 900 mL saf suda çözüldü, pH 7.4'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

PBS (10 mM): 1.08 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 8.02 g NaCl ve 0.18 g KCl 900 mL saf suda çözüldü, pH 7.4'e ayarlanıp hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

EDTA (10 mM)/ PBS (10 mM): 2.92 g EDTA 10 mM PBS içerisinde çözülüp hacmi 1L'ye tamamlandı.

Kloroform (% 0.1 v/v): 1 mL kloroform 1 L saf suda çözüldü.



3.4.1. Diyaliz Torbalarının Aktifleştirilmesi ve Diyaliz İşlemi

Kullanılacak iki farklı diyaliz membranı uygun boyutlarda kesildi. İlk olarak afinite kromatografisi ile kolondan saflaştırılan hCAII enzimlerinin diyalizinde kullanmak için geniş çaplı (Servapor) membran rulosundan yaklaşık 25 cm boyutlarında kesildi. İkinci olarak, enzimlerin modifikasyonları sonrası diyaliz yapmak için dar çaplı (Sigma Aldrich D9277) membran rulosundan 10 cm boyutlarında kesildi ve 1 L'lik beher içerisine konuldu, 60°C'de ısıtılmış aktifleştirme tamponu ilave edildi ve etüv içerisinde aynı sıcaklıkta 2 saat boyunca ara ara bagetle karıştırıldı. Ardından tampon çözelti döküldü ve diyaliz membranları üzerine 60 °C'deki saf su ilave edildi ve yine 1 saat karıştırıldı, yıkama çözeltisi berraklaşınca kadar saf su ile yıkama işlemi tekrar edildi. Yavaşça soğutulan membranlar % 0.1 kloroform içeren saklama çözeltisinde daha sonra kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edildi. Diyaliz membranları kullanılmadan önce alt ucundan düğüm atıldı, üst ucu ise diyaliz mandalları ile sabitlendikten sonra kullanıldı. Örneklerin diyaliz işlemi tamamlandıktan sonra birkaç kez saf su ile iyice yıkatılan membranlar temiz saklama tamponunda saklandı ve sonraki çalışmalarda kullanıldı.

Saflaştırılan aktif enzim solüsyonlarının diyaliz aşaması 4°C'de ve her 4 saatte bir diyaliz tamponu değiştirilerek 24 saatte gerçekleştirildi. İlk olarak 10 mM EDTA-10 mM PBS tamponu içerisinde 8 saat tutuldu. Ardından 10 mM'lik PBS tamponu ile 8 saat ve son olarak saf su ile 8 saat süren diyaliz işlemi tamamlandı. Diyaliz işlemi biten saf enzim solüsyonları birleştirildi ve liyofilize edildi ve -80°C'de saklandı (45).

3.4.2. Saflaştırılan hCAII Enziminin Posttranslasyonel Modifikasyonları Sonrası Diyaliz İşlemi

Modifiye olan hCAII enzimi modifiye edildiği ortamdaki tampona karşı diyaliz edildi. Her doz ve madde için farklı konsanrasyonlarda modifiye edilen örnekler ayrı ortamlarda diyaliz edildi. MGO ile modifiye olan enzim 50 mM sodyum-fosfat tamponu pH 7.4'e karşı diyaliz edildi. HTL ile modifikasyona uğrayan enzim 50 mM sodyum-fosfat tamponu pH 7.4 ve 0.2 mM EDTA içeren tampona karşı diyaliz edildi. Diyaliz tamponları örnek hacimlerinin 20 katı olacak şekilde, her 6 saatte bir değiştirildi ve 24 saatte tamamlandı. Diyaliz işlemi biten numuneler -80°C'de işlem yapılana kadar saklandı (3).



3.5. Western Blot

CA II izoenzimi insan eritrositlerinden afinite kromatografisi ile saflaştirıldıktan sonra modifikasyonları teyit etmek için western blot işlemi uygulandı.

Kullanılan Çözeltiler:

Transfer Tamponu (1X): 100 mL SDS-PAGE Tank Tamponu (10X), 100 mL metanol ve 800 mL saf su ilave edildi. Bu karışım taze hazırlandı ve buzdolabında saklandı.

TBS (10X): 24.05 g Tris ve 88 g NaCl tartıldı ve saf su içinde çözülerek toplam hacim saf su ile 900 mL'ye tamamlandı ve 12 M HCl ile pH 7.6'ya ayarlanarak son hacim 1 L'ye tamamlandı.

TBST (1X): 20 mL 10X TBS, 180 mL saf su ve 500 µL Tween-20 ilave edilerek hazırlandı.

Bloklama Çözeltisi : 5 g yağsız süt tozları tartıldı ve 100 mL 1X'lik TBST içerisinde çözüldü, günlük taze hazırlandı ve 4°C'de saklandı.

Primer Antikor: Rabbit anti-homosistein primer antikoru %5'lik bloklama tamponu ile 3000 kat seyreltilerek hazırlandı. Mouse anti-metilglioksal primer antikoru %3'lük bloklama tamponu ile 4000 kat seyreltilerek hazırlandı.

Sekonder Antikor: HRP takılı goat anti-mouse IgG,Fc ve HRP takılı goat anti-rabbit IgG,Fc antikorları primer antikorlarının hazırlandığı bloklama tamponları ile 8000 kat seyreltilerek kullanıldı.

Deneyin Yapılışı:

SDS-PAGE işlemi yukarıda açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Ancak jelin membrana transfer edilme aşamasına geçilmeden önce yürütme tamponundan alınanan jel kısa camda olacak şekilde temiz bir kap içerisine konuldu. Jelin üzerini geçecek kadar transfer tamponu ilave edildi, yaklaşık 10 dk dengeye gelmesi için beklendi, transfer için kullanılacak nitroselüloz membran da aynı şekilde bekletildi. Jelin membrana aktarılması için, transfer kasetinin siyah yüzeyinden (negatif elektrot) başlayarak en altta transfer tamponuyla ıslatılmış sünger, whatman kağıdı ve elimize alınan cam üzerindeki jelin üzerine kuru olarak yerleştirilen ikinci whatman kağıdı (yüzeyi birinci ıslatılan whatman kağıdına denk gelecek şekilde) yerleştirildi. Üstte kalan jelin üzerine ise bir köşesinden işaretlenmiş ve jel boyutlarında kesilmiş membran yüzüstü gelecek şekilde yerleştirildi. Membranın üzerine ıslatılan iki whatman kağıdı daha sıralandı ve üzerine hafif bir basınç uygulayarak (bir deney



tüpünü yuvarlayarak) katmanlar arasında hava boşluğu kalmamasına dikkat edildi. Son olarak ısıtılan ikinci sünger de yerleştirildikten sonra kaset dikkatli şekilde kapatıldı. Transfer sandviçi hazırlandı. Tank içerisine elektrot kutuplarına dikkat edilerek siyah kaset siyah yüzeye gelecek şekilde yerleştirildi. Isınmayı önlemek için tank içine buz aküsü yerleştirildi. Tamponun sürekli karıştırılması için manyetik bar tank içine bırakıldı. Ayrıca tank buz banyosu içine yerleştirildi ve manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Örneklerin membrana transfer edilmesi için 100 Volta 1 saat yürütüldü.

3.5.1. Membranın Bloklanması ve Protein Bantlarının Görüntülenmesi

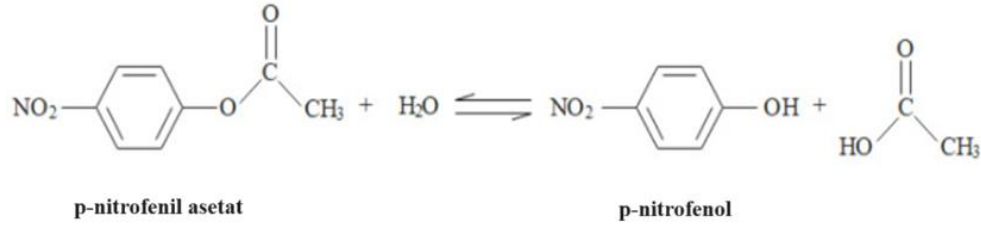
Blotlama işlemi tamamlandıktan sonra membran, temiz bir kap içerisine aktarıldı ve üzerini kapatacak hacimde yaklaşık 10 mL %5'lik yağsız süt tozu ile hazırlanan bloklama çözeltisi ilave edildi, oda sıcaklığında 1 saat düşük devirde çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bloklanan membran, üretici firmanın tavsiye ettiği gibi primer antikorlar (anti-metilglioksal (1:4000 oranında) ve anti-homosistein (1:3000) oranında % 3'lük bloklama çözeltisi ile seyreltilen) oda sıcaklığında 2 saat düşük devirde çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Ardından primer antikor çözeltileri daha sonra kullanılmak üzere geri toplandı ve -20°C'de saklandı. Her 5 dk'da bir TBST (1X) ile 30 dk boyunca yüksek devirde çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında iyice yıkandı. Daha sonra sekonder antikor (rabbit anti-mouse Ig G antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:8000) ve goat-anti rabbit Ig G antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:8000) oranında %3'lük süt tozu kullanılarak seyreltilerek hazırlandı, 1 saat düşük devirde çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikor çözeltisi inkübasyon sonrası uzaklaştırıldı ve tekrar aynı şekilde yıkama yapıldı. Membran temiz bir kap içerisine alındı ve görüntülemek için 0.4 mL ECL karışımı membranın tüm yüzeyine gezdirilerek 3 dk boyunca muamele edildi. Cam bir plaka üzerine aktarılan membranın üzeri şeffaf plastik bir membranla kapatıldı. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek kemilünesans görüntüleme yapıldı. Sonuçlar, Resim 3 ve Resim 4'te verilmiştir.

3.5.2. Metilglioksal ve Homosistein-tiyolakton ile Modifikasyonuna Bağlı Karbonik Anhidraz Esteraz Aktiviteleri

Metilglioksal ve HTL'nin hCAII enziminin esteraz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için Verpoorte ve ark. (46) geliştirdiği yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemin esası CA enziminin substratı olan p-nitrofenil asetatı hidroliz etmesiyle oluşan p-nitrofenol ve



asetat iyonlarının renk farkının 348 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Oluşan p-nitrofenolün absorbans farkı 3 dk boyunca ölçülerek hesaplandı.



Şekil 11. p-nitrofenil asetatın hidrolizi

Kullanılan çözeltiler

3 mM p-nitrofenil asetat: 27 mg p-nitrofenil asetat, 1 mL asetonda çözdükten sonra manyetik karıştırıcı üzerinde hızla karıştırılan 49 mL su içerisine yavaşça damlatıldı ve iyice çözünmesi için yaklaşık bir saat oda sıcaklığında koyu renkli bir şişe içerisinde karıştırıldı.

0.05 M Tris-SO₄ tamponu pH (7.4) : 0.605 g Tris tartılarak yaklaşık 80 mL saf suda çözüldü. 1 M’lik H₂SO₄ çözeltisi kullanılarak pH 7.4’e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 100 mL’ye tamamlandı.

Deneyin yapılışı:

Esteraz aktivitesi ölçümü için, tüm hCAII enzimleri protein miktarı eşit olacak şekilde seyreltildikten sonra kuartz küvete, 1000 µL 0.05 M Tris-SO₄ (pH 7.4) tamponu, 200 µL saf su ve 300 µL enzim çözeltisi konuldu. Son olarak 1500 µL günlük hazırlanmış p-nitrofenil asetat ilave edildi.



Tablo 6. hCAII esteraz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı

Reaktifler	Hacim (µL)	Konsantrasyon
Enzim	300	0.01556 mg/mL
Su	200	
Tampon	1000	50 mM
Substrat (p-nitrofenil asetat)	1500	3 mM
Toplam	3000	-

Her örnek için, reaksiyon karışımı elde edilmesinin 15. saniyesinde ve 3 dk sonrasında 348 nm’de iki kez absorbans okuması yapıldı. $\Delta A/\Delta t$ değeri hesaplanarak total esteraz aktivitesi U/L birimi ile ifade edildi.

Numunelerdeki esteraz aktiviteleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (47, 48).

$$b = \Delta A/\Delta t \quad \text{(Eşitlik 2)}$$

b: katalitik aktivite (U/L)

t: süre (saniye)

A: absorbans

Buna göre CA aktivitesi; $b = \Delta A/\Delta t$ üzerinden hesaplanmıştır.

3.5.3. Metilglioksal ve Homosistein-tiyolakton Modifikasyonuna Bağlı Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi

Metilglioksal ve homosistein-tiyolaktonun karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin ölçümü bölüm 3.2.3’teki Karbonik anhidraz enziminin Wilbur-Anderson metoduna göre yapıldı.



3.6. Metilglioksal ve Homosistein-tiyolakton Modifikasyonuna Bağlı CAII'nin Antijenik Özelliklerinin Belirlenmesi

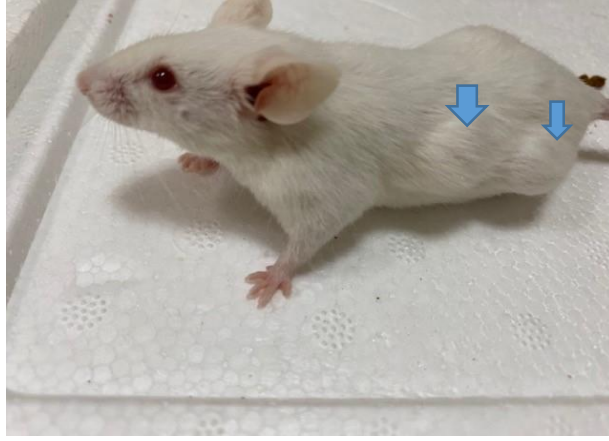
3.6.1. Fareler ve İmmünizasyon

Fareler ile yaptığımız çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen Balb-c türü 10-12 haftalık her grupta 7 dişi ve 3 erkek toplam 40 adet fare kullanıldı. Bu fareler KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık deneysel çalışma ortamı sağlanarak ve *ad libitum* olarak beslenerek barındırıldı. Yapılan deneylerin tümü Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2021/24 protokol no'lu etik kurulu (Bkz. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onay Belgesi) başvurusunun onayı ile yapıldı. Gruplar enjeksiyon yapılacak maddelere (antijene) göre ayrıldı.

1. Kontrol (immünojen verilmeyen) fosfat tamponu çözücü grubu
2. hCAII kontrol grubu
3. MGO ile modifiye edilen hCAII grubu
4. HTL ile modifiye edilen hCAII grubu

İmmünizasyon işlemi için buz banyosu içerisine alınan immünojen madde (enzim veya çözücü) ile eşit hacimlerde alınan Freund adjuvant iki ayrı enjektöre alındı ve arasına çift başlı iğne yerleştirilerek beyaz renkli homojen bir emülsiyon haline gelinceye kadar yaklaşık 2-3 dk'da hazırlandı. Emülsiyonun suya damlatıldığında dağılmadan kalması halinde işlem başarılı kabul edildi. Toplamda yapılacak üç enjeksiyonun ilkinde her fare için 100 µL antijen ve 100 µL Freund complete adjuvan karıştırıldı ve 200 µL'lik enjeksiyonla 0.1 mg antijen sırt kısmından subkutan olarak yapıldı. İkinci ve üçüncü enjeksiyonlar iki hafta ara ile yapıldı. Ancak bu emülsiyonlar için 100 µL antijen ve 100 µL incomplete Freund adjuvant kullanıldı. Farelere enjeksiyon yapıldıktan sonra bezelye tanesine benzer dağılmayan şişkinlik gözlemlendi (Resim 2, mavi oklar). Bu şişlik çalışma sonuna kadar sabit kaldı. Son enjeksiyondan iki hafta sonra fareler dekapite edilerek kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek serumları elde edildi, -80 °C'de saklandı ve antikor seviyelerini belirlemek için kullanıldı.





Resim 2. İmmünizasyonu yapılan balb-c fare görüntüsü

3.6.2. Farelerde Karbonik Anhidraz Antikor Titrelerinin Belirlenmesi

Alver ve ark. (49) tarafından çalışılan enzim bağlı immünosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak çalışma gruplarındaki farelerin serumlarında MGO ve HTL ile modifiye edilen hCAII ve modifiye edilmemiş hCAII'ye karşı gelişmiş otoantikor titrelerinin belirlenmesinde kullanıldı. Her numune için ölçümler üç kez tekrarlandı.

Kullanılan Çözeltiler

1 M NaOH: 10 g NaOH saf suda çözülerek 250 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH değerlerinin ayarlanmasında kullanıldı.

1 M HCl: 830 μ L %37'lik HCl (d: 1.19 g/mL) alındı ve 8 mL saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH değerlerinin ayarlanmasında kullanıldı.

Kaplama Tamponu (pH 9.6) :

A çözeltisi: 2.12 g Na_2CO_3 (0.2 M) tartıldı ve 100 mL saf su içerisinde çözüldü.

B çözeltisi: 1.68 g NaHCO_3 (0.2 M) tartıldı ve 100 mL saf su içerisinde çözüldü.

8 mL A çözeltisi ve 17 mL B çözeltisi karıştırıldı, üzerine bir miktar saf su ilave edildikten sonra pH 9.6'ya ayarlandı ve karışımın son hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Birinci Yıkama Tamponu (10 mM PBS çözeltisi): 0.8 g NaCl (0.14 M), 0.02 g KCl (2.7 mM), 0.02 g KH_2PO_4 (1.5 mM) ve 0.115 g Na_2HPO_4 (8.1 mM) tartıldı ve bir miktar saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 7.4'e ayarlandı. Hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.



İkinci Yıkama Tamponu (Tween 20-PBS çözeltisi): 0.8 g NaCl (0.14 M), 0.02 g KCl (2.7 mM), 0.02 g KH₂PO₄ (1.5 mM) ve 0.115 g Na₂HPO₄ (8.1 mM) tartıldı ve bir miktar saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 7.4'e ayarlandı. 50 µL tween-20 eklendi. Hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Bloklama Tamponu (%3 süt tozu ihtiva eden birinci yıkama tamponu PBS çözeltisi): 3 g yağsız süt tozu 100 mL 10 mM PBS'de çözülerek hazırlandı.

2 M H₂SO₄: 2.72 mL % 98'lik H₂SO₄ (d:1.84 g/mL) alındı ve 20 mL saf suda çözülüp hacmi saf su ile 25 mL'ye tamamlandı. Reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

Sitrat-fosfat tamponu (pH 4.8) : 2.101 g C₆H₈O₇.H₂O (0.1 M) ve 3.12 g NaH₂PO₄.2H₂O (0.2 M) tartıldı ve 80 mL saf suda çözüldü. 4 M NaOH ile pH 4.8'e ayarlandı ve hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Substrat çözeltisi hazırlamak için kullanıldı.

Substrat çözeltisi: Hazırlanan sitrat-fosfat tamponundan 25 mL alındı ve içerisine 10 mg orto-fenilen diamin ilave edildi ve çözüldü. Pleyte ilave etmeden hemen önce %30'luk H₂O₂'den 10 µL ilave edilerek substrat çözeltisi elde edildi. Karanlıkta saklandı.

Seyreltme tamponu (%1 yağsız süt tozu ihtiva eden birinci yıkama tamponu PBS çözeltisi): 1 g yağsız süt tozu 100 mL PBS'de çözülerek hazırlandı. Serum örneklerinin seyreltilmesinde kullanıldı.

3.6.3. Antikor Titreleleri için ELISA Yöntemi

Deneyin Yapılışı

1. ELISA pleytindeki kuyucuklar kaplama tamponu (pH 9.6) ile seyreltilen ve konsantrasyonu 5 µg/mL olan modifiye edilen ve edilmeyen hCAII enziminden 50 µL'lik hacimlerde ilave edilerek 18 saat 4°C'da inkübasyona bırakıldı, bu kuyucuklar kaplanmış oldu (kaplama yaparken her serum örneği için üç kuyucuk CA II ile kaplanırken üçü kaplanmaz).

2. İnkübasyondan alınan pleyt içindeki enzim aspire edilerek uzaklaştırıldı ve 200 µL PBS tamponu (birinci yıkama çözeltisi) ile 5 dk çalkalayıcı üzerinde yıkandı ve aspire edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.



3. Yıkama işleminden sonra her örnek için kaplı olan ve olmayan toplam altı kuyucuğa da 200 µL %3'lük bloklama tamponu ilave edildi ve hafif hızdaki çalkalayıcıda oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı.

4. Bloklamanın ardından pleyt ikinci yıkama çözeltisi (Tween20-PBS çözeltisi) ile ikinci basamakta açıklandığı gibi 3 kez yıkandı.

5. Tüm deney gruplarındaki (CAII grupları ve kontrol (immunojen verilmeyen) grubundaki) farelerin serumları %1 yağsız süt tozu içeren seyreltme tamponu kullanılarak 250 kat seyreltildi ve her bir seyreltilmiş serum örneğinden 100 µL hacimde kendisi için ayrılan altı kuyucuğa (üçü CAII kaplı ve üçü CA II kaplanmamış) ayrı ayrı pipetlendi ve oda sıcaklığında hafif hızdaki çalkalayıcıda 2 saat bekletildi.

6. Pleyt ikinci yıkama çözeltisi (Tween20-PBS çözeltisi) ile ikinci basamakta açıklandığı gibi 3 kez yıkandı.

7. Kuyucuklara 100 µL %1 yağsız süt tozu içeren seyreltme tamponuyla 1/50000 oranında seyreltilmiş antikör (HRP takılı goat anti-mouse IgG,Fc) ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda bekletildi.

8. Pleyt ikinci yıkama çözeltisi (Tween20-PBS çözeltisi) ile ikinci basamakta açıklandığı gibi 3 kez yıkandı.

9. Kuyucuklara substrat çözeltisinden 100 µL ilave edildi ve oda sıcaklığında, karanlıkta tutarak renk değişimi takip edildi. Kaplı olan kuyucuklarda 5 dk içinde altın sarısı renk görüldüğünde reaksiyonu durdurmak için sonraki aşamaya geçildi.

10. Bütün kuyucuklara 2 M H₂SO₄ çözeltisinden 100 µL ilave edilerek reaksiyon durduruldu.

11. ELISA okuyucusunda 485 nm'de renk okundu.

Sonuçlar enzim kaplı olan kuyucuklardaki absorbens değerlerinden kaplanmamış olan kuyucukların absorbens değerleri çıkartılarak değerlendirildi ve Resim 6'da gösterildi.

4. İstatistiksel Yöntemler

Bu tez çalışmasında ELISA sonuçları ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Gruplar arasında farkın olup olmadığı Kruskal wallis testi ile test edildi. İkili karşılaştırmalarda Mann



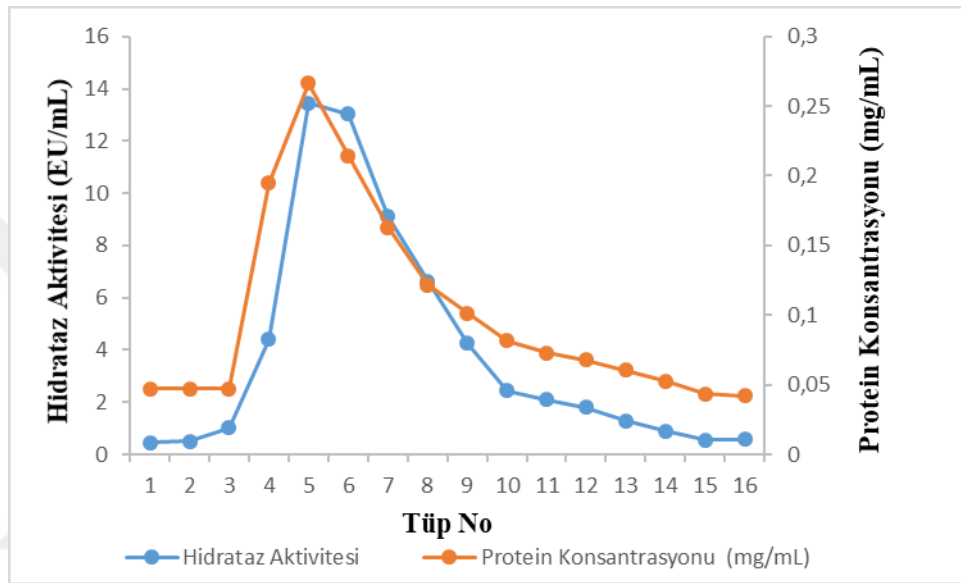
Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verileri ifade etmek için SPSS version 23 programı kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. Karbonik Anhidraz II'nin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması

Afinite kromatografisi ile elde edilen elüentlerin protein miktarları ve CA hidrataz aktivitesi ölçülerek sonuçlar Şekil 12'de verilmiştir. Bu sonuçlar, toplanan enzim örneklerinin protein konsantrasyonu ve hidrataz aktiviteleri birbirleri ile örtüştüğünü göstermektedir.



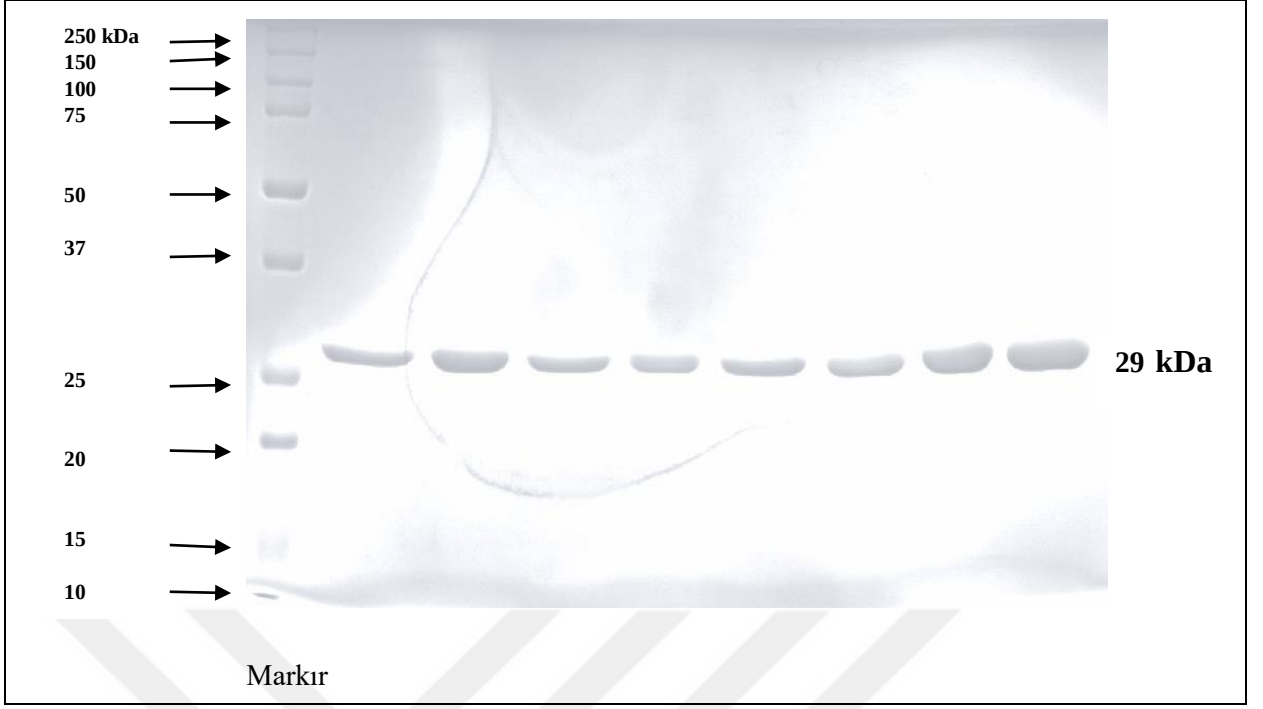
Şekil 12. Elüentlerin protein konsantrasyonları ve hidrataz aktiviteleri

Şekil 12'den anlaşılabileceği üzere protein miktarı ile hidrataz aktivitesi orantılı olan ve mümkün olduğunca yüksek aktiviteli elüentler deneylerde kullanıldı. Yapılan aktivite tayinlerinde hCAII enziminin en yüksek olduğu elüentteki hidrataz aktivitesi 50.53 enzim ünitesi (EU) olarak bulundu.

4.2. İnsan Karbonik Anhidraz II'nin (hCAII) Saflığının Kontrolü

Afinite kromatografisiyle insan eritrositlerden elde edilen hCAII enziminin saflığı SDS-PAGE yöntemiyle gösterildi. Farklı deney tüplerinden alınan elüentlerin SDS-PAGE görüntüsü Resim 3'te gösterilmiştir.





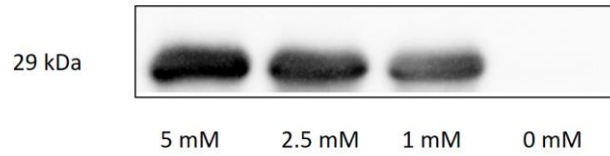
Resim 3. Saflaştırılan insan CAII enziminin Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanmış SDS-PAGE görüntüsü

hCAII enziminin molekül ağırlığı yaklaşık 29 kDa'dur. Elde edilen SDS-PAGE görüntüsünde (Resim 3) 29 kDa molekül ağırlığına karşılık gelen bölgede tek bant bulunmaktadır.

4.3. Karbonik Anhidrazın Modifikasyonu

4.3.1. hCAII'nin MGO ile Modifikasyonu

Farklı konsantrasyonlarda (0-5 mM) MGO ile modifiye edilen hCAII enziminin western blot görüntüleri resimde gösterilmiştir.



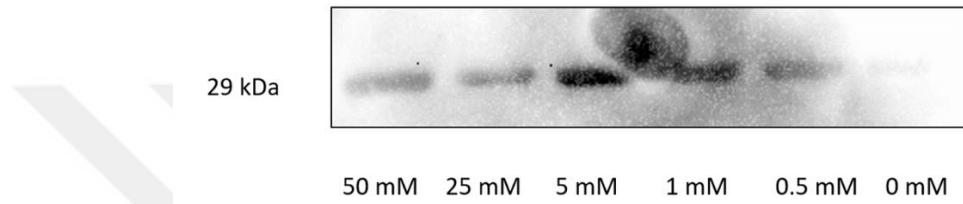
Resim 4. hCAII enziminin MGO ile modifikasyonuna ait western blot görüntüsü



Resim 4'teki western blot görüntüsünden her örnek için tek bant gözlenmektedir. Ayrıca MGO konsantrasyonuna bağlı olarak bantlardaki yoğunluk artmaktadır. MGO modifikasyonunun yapılmadığı hCAII kuyucuğunda (0 mM MGO) herhangi bir bant gözlenmemiştir.

4.3.2. hCAII'nin HTL ile Modifikasyonu (Western Blot Yöntemi için)

hCAII enzimi farklı konsantrasyonlarda (0-5 mM) HTL ile modifiye edildi. Primer antikor olarak poliklonal anti-Hcy antikor kullanılarak western blot uygulandı.



Resim 5. hCAII enziminin HTL ile modifikasyonuna ait western blot görüntüsü

Resim 5'teki western blot görüntüsünde tek bant gözlenmektedir. HTL konsantrasyonuna bağlı anlamlı değişiklikler tespit edilememiştir. En yoğun bant 5 mM HTL konsantrasyonunda gösterilmiştir. Modifikasyon yapılmayan hCAII'nin uygulandığı kuyucukta silik de olsa bant gözlenmiştir.

4.3.3. HTL ile hCAII Enziminin Modifikasyonun Doğrulanması için Yapılan Modifikasyon İşlemi (Ellman Yöntemi için): Ellman Reaktifi Kullanılarak Serbest Sülfhidril (-SH) Grup Tahmini

hCAII enzimi farklı konsantrasyonlarda (0-25 mM) HTL ile modifiye edildi. Serbest Hcy'deki ve proteinlerin varlığındaki tiyol gruplarının seviyeleri DTNB kullanılarak test edildi. Absorbanslar, 0.5 cm'lik yol uzunluğunda bir pleyt kullanılarak 412 nm'de ölçüldü. Oluşan 5'-nitrotiyobenzoat miktarı, $13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ molar absorbtivite katsayısı (ϵ) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar Tablo 7'de gösterilmiştir.



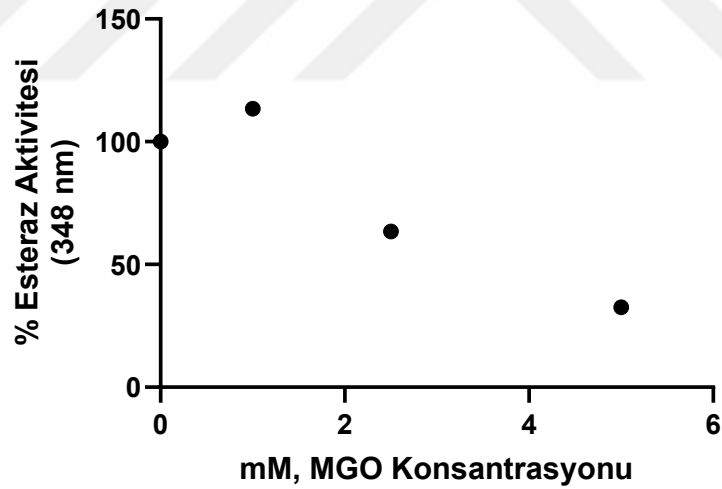
Tablo 7. HTL ile modifiye edilen hCAII enziminin doza bağılı serbest sülfhidril içeriği

HTL (mM) ile Modifiye Edilen hCAII enzimi	Serbest Sülfhidril İçeriği (M^{-1})
0	8.47×10^{-6}
1	8.40×10^{-6}
5	8.91×10^{-6}
25	10.51×10^{-6}

4.4. Karbonik Anhidraz Esteraz ve Hidrataz Aktiviteleri

4.4.1. MGO ile Modifiye hCAII'nin Esteraz Aktivitesi

hCAII'nin MGO ile modifikasyonunun enzimin esteraz aktivitesi üzerindeki etkisi Şekil 13'teki grafikte gösterilmiştir. Düşük konsantrasyonda aktivitede artış olurken, yüksek konsantrasyonda azalış gözlemlendi.

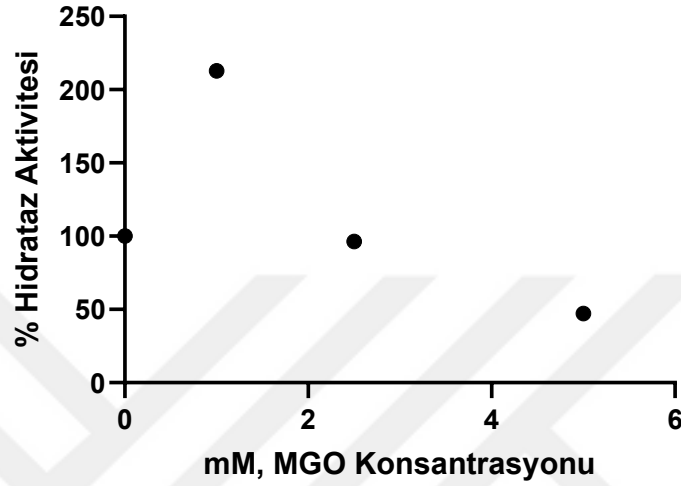


Şekil 13. MGO ile modifiye hCAII enziminin % esteraz aktivitesi ölçümü



4.4.2. MGO ile Modifiye hCAII'nin Hidrataz Aktivitesi

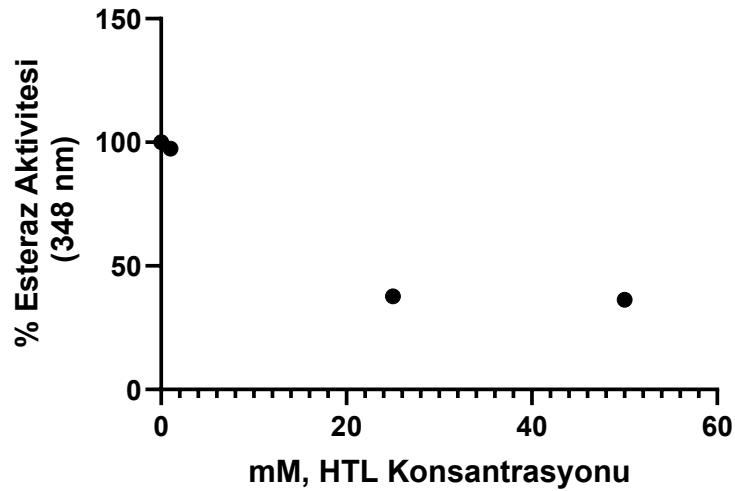
hCAII'nin MGO ile modifikasyonunun enzimin hidrataz aktivitesi üzerindeki etkisi Şekil 14'teki grafikte gösterilmiştir. Esteraz aktivitesine benzer şekilde düşük konsantrasyonda aktivitede artış olurken, yüksek konsantrasyonda azalış gözlemlendi.



Şekil 14. MGO ile modifiye hCAII enziminin % hidrataz aktivitesi ölçümü

4.4.3. HTL ile Modifiye hCAII'nin Esteraz Aktivitesi

hCAII'nin HTL ile modifikasyonunun enzimin esteraz aktivitesi üzerindeki etkisi Şekil 15'teki grafikte gösterilmiştir. Konsantrasyon artışı ile aktivitede azalış gözlemlendi.

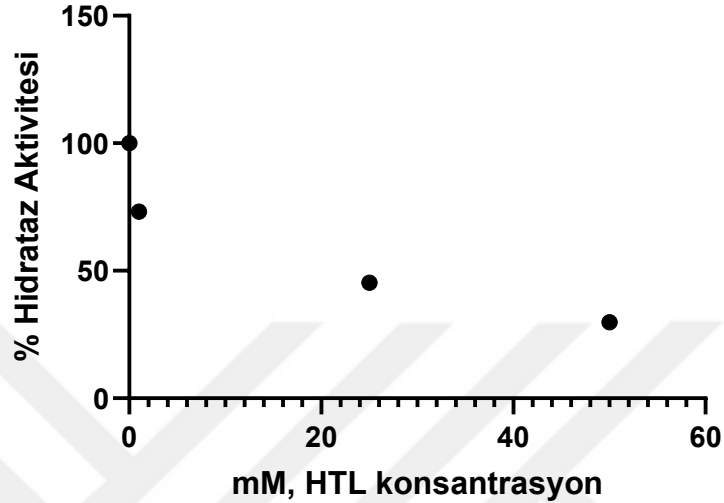


Şekil 15. HTL ile modifiye hCAII enziminin % esteraz aktivitesi ölçümü



4.4.4. HTL ile Modifiye hCAII'nin Hidrataz Aktivitesi

hCAII'nin HTL ile modifikasyonunun enzimin hidrataz aktivitesi üzerindeki etkisi Şekil 16'daki grafikte gösterilmiştir. Konsantrasyon artışı ile aktivitede azalış gözlemlendi.



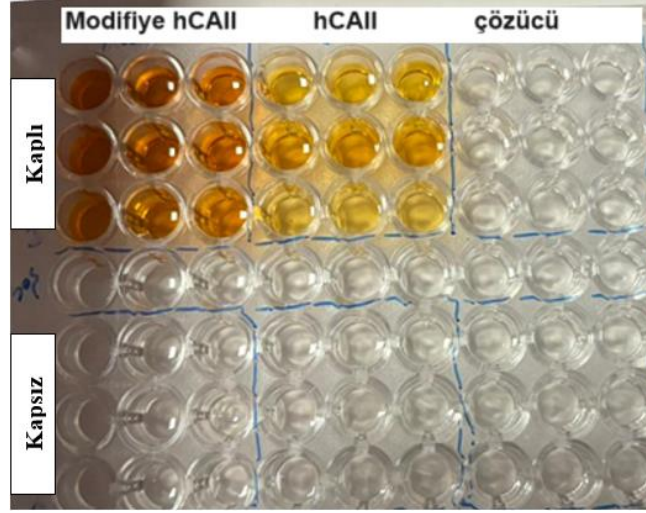
Şekil 16. HTL ile modifiye hCAII enziminin % hidrataz aktivitesi ölçümü

4.5. Farelerde saf hCAII ve Modifiye hCAII Formlarının İmmünizasyon Sonuçları

4.5.1. Farelerde saf hCAII, HTL ve MGO ile Modifiye hCAII'nin Antikor Titreleleri

Saf hCAII enzimi ve farelere verilen doz ile modifiye edilen hCAII enzimi ile mikroplyetler kaplanıp ELISA yöntemiyle farelerin serumlarındaki antikor titreleleri belirlendi. Sonuçlar Resim 6'da gösterildi.

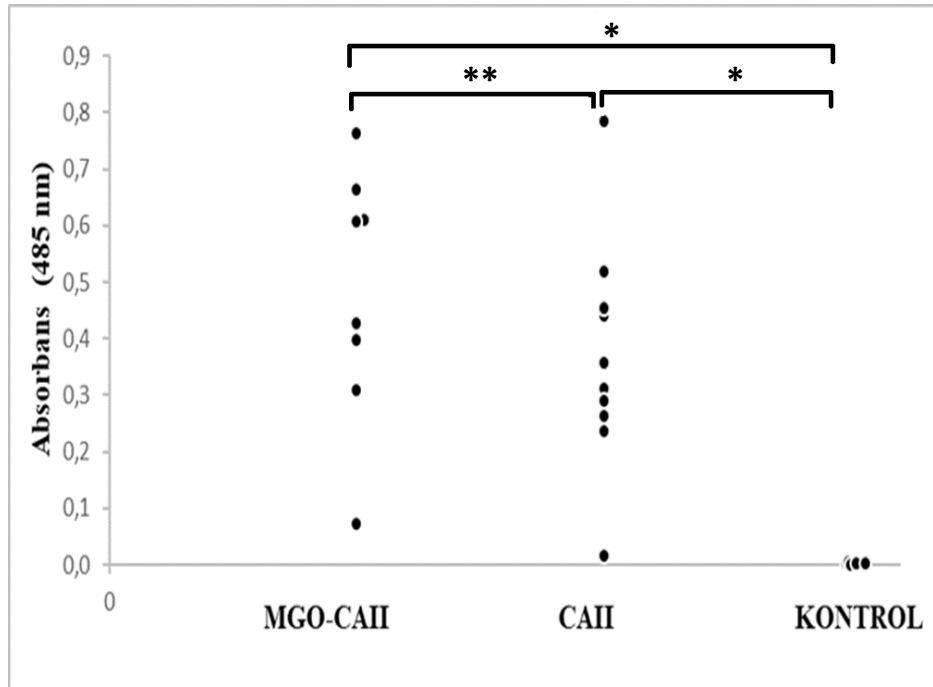




Resim 6. ELISA yönteminde modifiye olan ve olmayan hCAII antikorlarının etkisi

Saf hCAII ile HTL ve MGO ile modifiye CAII formlarına karşı antikor oluşmaktadır (Şekil 17 ve 18). Saf hCAII ve modifiye hCAII formlarına karşı gelişen antikor titreleri sadece immünojen verilmeyen kontrolleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p < 0.01$ anlamlı fark olduğu belirlendi.

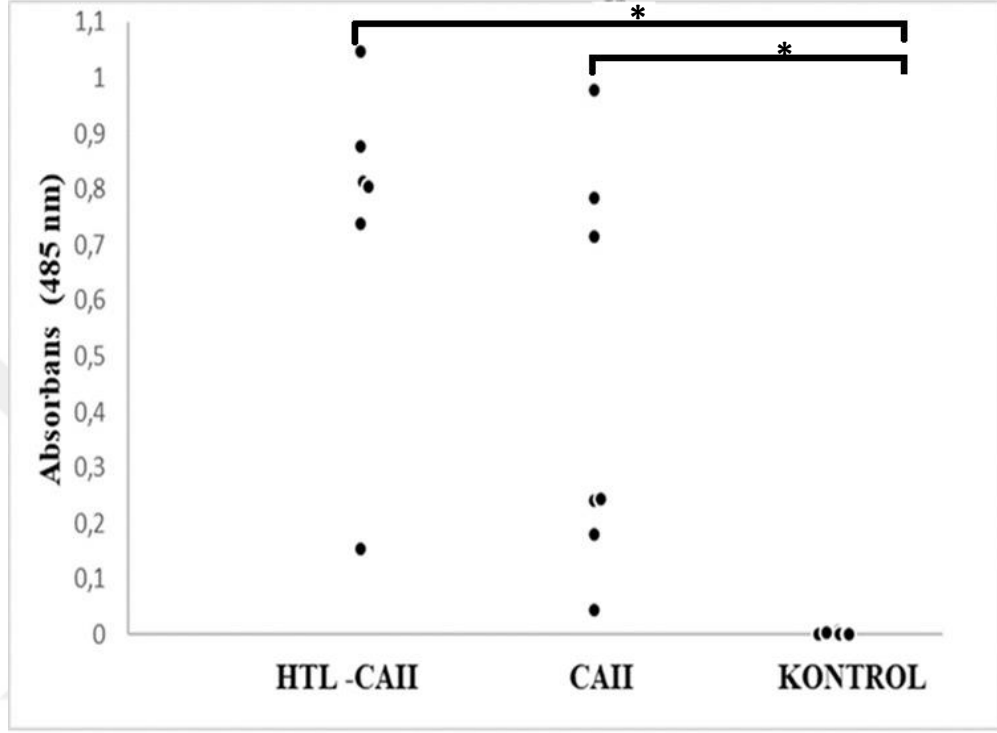
MGO ile modifiye hCAII grubu ve saf hCAII grupları karşılaştırıldığında $p < 0.05$ olduğu belirlendi ve anlamlı fark bulunmuştur (Şekil 15). MGO ile modifikasyon hCAII'nin antijenik özelliğini artırmıştır.



Şekil 17. MGO ile modifiye CAII antikor titreleri (* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$)



HTL ile modifiye hCAII grubu ve saf hCAII grupları karşılaştırıldığında ise $p>0.05$ olduğu belirlenerek anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 18). HTL ile modifikasyon hCAII'nin antijenik özelliğinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır.



Şekil 18. HTL ile modifiye hCAII antikor titreleri (* $p<0.01$)



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidrazlar, karbon dioksitin bikarbonat iyonu ve protona geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize ederek solunum, karbon dioksit taşınması, pH ve elektrolit homeostazisi ve biyosentetik reaksiyonlarla ilgili bir dizi fizyolojik süreçte rol oynarlar. Anormal ekspresyonları ve/veya inhibitörleri, glokom, ödem, obezite ve kanser dahil olmak üzere bir dizi patoloji ile ilişkilendirilmiştir. CA'ların biyokimyasal, fonksiyonel ve yapısal yönleriyle ilgili çok sayıda literatür olmasına rağmen, genellikle spesifik izoenzim odaklı PTM'ler hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Son yıllarda, CA'ların PTM merkezli çalışmalarında genellikle korunmuş amino asitlerdeki modifikasyon olayları tespit edilebilmiştir ancak bu modifikasyonların fonksiyonel önemi net olarak ortaya konulamamıştır (5). Bu tez çalışmasında karbonik anhidrazın *in vitro* olarak enzimatik olmayan glikasyon ve homosisteinilasyonu ile bu modifikasyonların enzim aktivitesi ve antijenitesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

PTM'lerden enzimatik olmayan glikasyon ve homosisteinilasyon ile proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonu reaksiyonunun etkilerini araştırmak için model olarak hCAII izoenzimi kullanıldı. hCAII, beyin, mide, bağırsak, böbrek ve üreme organları da dahil olmak üzere çeşitli organlarda eksprese edilen iyi karakterize edilmiş bir enzimdir ve eritrositlerde oldukça bol miktarda bulunur. Turnover sayısının 1.4×10^6 olması ile karbondioksitin geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize eden, hayvanlar aleminde bilinen en hızlı enzimlerden biridir (11). hCAII yapısal ve katalitik özellikleri iyi bilinmesi sebebiyle ve hem MGO hem de HCY reaksiyonu için potansiyel 24 adet lizin ve 7 adet arjinin (260 amino asitten) kalıntısı içerdiği için bu çalışmada incelenecek enzim olarak seçildi. hCAII ile yapılan posttraslasyonel modifikasyonların proteomik *in vivo* çalışmalarında eksiklikler mevcuttur ve yapılan bu çalışma ile *in vitro* olarak HTL ve MGO ile modifiye edilen hCAII'nin antijenik özellikleri ilk defa değerlendirildi. Ayrıca *in vitro* olarak yapılan bu modifikasyonların enzimin aktivitesine etkilerini araştıran bu çalışma her ne kadar *in vivo* sonuçları yansıtmasa da, HTL ve MGO ile modifikasyonların enzim aktivitesinde değişikliğe sebep olduğunu göstermiştir.

Karbonik anhidraz II izoenziminin insan eritrositlerinden izole edilmesi için Sefaroz 4B'ye kenetlenmiş sülfanilamid yöntemine dayalı afinite kromatografisi uygulandı. İzole edilen enzimin saflığı SDS-PAGE (Resim 3'te) ile gösterildi. Elde edilen görüntü molekül ağırlığı yaklaşık 29 kDa ve tek bant olan hCA II enzimini göstermektedir.



İnsan CAII enziminin *in vitro* ortamda N-homosisteinilasyonu için son konsantrasyonu 1 mg/mL olan saf enzim 0-50 mM HTL ile 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı (7). N-homosisteinilasyonu teyit etmek amacıyla, HTL ile modifiye olan hCAII enzimi örnekleri ile western blot uygulaması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Resim 4'te verilmiştir. HTL modifikasyonunu gösteren bantlar elde edilmiş olmasına rağmen, doz bağımlı değişiklikler gösterilememiştir. Burada karşılaşılan sorun olarak, antikorun modifiye proteinleri tespit edemediği düşünülmüştür. Literatürde tavsiye edilen ticari antikorlarla çeşitli doku ve hücrelerde protein modifikasyonlarının belirlendiği iddia edilmiştir. Ancak o çalışmalarda kullanılan Abcam anti-N-Hcy-protein antikorunun üretimden kalması üzerine üretimdeki az sayıdaki antikorlardan biri olan USBiological anti-Hcy (151837) tavşan poliklonal antikoru satın alınarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bununla ilgili olarak, Jakubowski'nin (31) yayınladığı bir derlemede, literatürde tavsiye edilen ticari kitlerin (tavşan poliklonal anti-Hcy antikorlar Abcam (ab15154) veya Sigma-Aldrich (AB5512)) kullanıldığında bu antikorların çeşitli N-homosisteinlenmiş proteinleri tanımakta yetersiz kaldığı ve hatalı sonuçlara sebep olduğu belirtilmiştir. Buradaki sorunun, anti-Hcy antikorunun, yapısal olarak N-Hcy proteini ile ilgisi olmayan bir Hcy-glutaraldehit-BSA eklentisine ilgi göstermesi olduğu düşünülmüştür. Laboratuvarımızda bol miktarda bulunan tarafımızdan saflaştırılan ve HTL ile modifiye edilen hCAI izoenzimi ve ticari sığır serum albümin proteinleri ile de western blot denemeleri yapılmıştır. Ancak HTL modifikasyonuna bağlı bantlar gözlemlense de, doz bağımlı değişiklikler yine tespit edilememiştir. Aynı antikor kullanılarak ELISA yöntemi ile de ölçüm yapılmıştır, ancak modifikasyona bağlı bir fark ortaya konulamamıştır. Modifikasyonların varlığı son olarak Ellman yöntemi ile ortaya konulmak istenmiştir. Ancak yapılan ölçümlerde net bir fark tespit edilememiştir (Tablo 7). Bu haliyle HTL ile bir modifikasyon olsa da bu modifikasyonun doz bağımlı olduğu gösterilememiştir.

Bu tez çalışmasındaki diğer bir enzimatik olmayan PTM türü proteinlerin glikasyonudur. Bu durum, diyabet hastalarında görülen yüksek kan şekeri ve ilişkili diğer patolojilerde görülmektedir. Dikarbonil glikasyonunun önemli işlevsel etkileri vardır, çünkü arjinin proteinlerin işlevsel bölgelerinde daha yüksek oranda bulunur ve glikasyonu pozitif yük kaybına neden olur. Bu glikasyon guanido grubu ve ligand bağlama etkileşimlerinde yer alan elektrostatik etkileşimlerin kaybı anlamına gelir ve proteinlerde inhibisyon ve işlev bozukluğu ile sonuçlanır (23). Bu tez çalışmasında hCAII'nin glikasyonu için dikarboniller arasında daha reaktif olan (50) metilglioksal (0-5 mM) kullanıldı ve *in vitro* ortamda 1



mg/mL son konsantrasyondaki hCAII enzimi ile 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak glikasyon işlemi yapıldı (27). Glikasyon ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan protein miktarı, ortam sıcaklığı, dikarbonil türü ve modifikasyonun gerçekleşme süresi oldukça değişkenlik göstermektedir (50,51). Ancak çalıştığımız (0-5 mM) doz aralığı daha önce aralarında CA enziminin de olduğu farklı özelliklere sahip proteinlerin glioksal kullanılarak yapılan modifikasyonlarında doza bağlı artan karbonil içeriğinin belirlendiği en düşük doz olması nedeniyle sınırladığımız aralıktır. Biyolojik sistemlerde, reaktif karbonil gruplarının çoğu proteinlerin sisteinil, lizil ve arjinil kalıntılarına bağlı olduğundan, %10'dan daha az metilglioksal bağlanmamış formda mevcuttur. Dolayısıyla proteinlere bağlanan dikarbonillerin fraksiyonları, fizyolojik koşullar altında plazmada ölçülen konsantrasyonlarından önemli ölçüde fazladır. Bugüne kadar yapılan modifikasyon çalışmalarında; örneğin sitokrom c, insülin ve histon H2A gibi proteinlerle *in vitro* reaksiyon çalışmaları için çok daha yüksek MGO konsantrasyonları da (1-10 mM) kullanılmıştır (52,53) Bununla birlikte, mevcut deneylerin bazılarında DNA hasarını tetiklemek için çok yüksek (50 mM) MGO konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu değerler fizyolojik açıdan sorgulanabilir olsa da, nispeten kısa bir süre içinde enzim aktivitesi ve antijenitesini tetiklemek için gereklidir (54). Modifikasyon işlemlerinde glikasyon işleminin doğrulanması için western blot yöntemi uygulanmış ve (0-5 mM) MGO konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak bant kalınlıklarında artış olduğu ve modifiye edilmeyen hCAII enziminin olduğu kuyucukta herhangi bir bant olmadığı gözlenmiştir (Resim 3). Böylece gerek modifikasyonun net olarak ortaya konulması sebebi gerekse önceki çalışmalarda tercih edilen doz olan 5 mM'lık MGO konsantrasyonu antijenitenik etkinin ortaya konulmasında tercih edilmiştir (27).

Proteinlerin işlevi kesinlikle konformasyonlarına bağlıdır. Bu nedenle, proteinlerle stabil eklentiler oluşturabilen ve yapısal konformasyonlarını bozan HTL ve MGO gibi bir molekülle modifikasyonlar proteinlerin fonksiyonunu ve enzimlerin katalitik aktivitesini değiştirebilmektedir. Bu tez çalışmasında MGO ile modifiye edilen hCAII enziminin aktivitesi hidrataz ve esteraz yöntemleri ile araştırıldı. hCAII enziminin MGO ile modifikasyonunda düşük doza bağlı olarak her iki yöntemle yapılan aktivite ölçümlerinde de aktivasyon olduğu belirlenirken, artan metilglioksal dozu konsantrasyonlarına bağlı olarak enzimin inhibe olduğu bulundu (Şekil 13 ve 15) . Aktivite ölçüm sonuçlarına göre, bu tez çalışması aralığında düşük dozda yüksek aktivasyon ve yüksek dozda inhibisyon



halinin belirlenmesi, MGO için daha önceki çalışmalarda gösterilmiş hormesis durumunun bir yansıması olabilir (55).

Evrin sırasında hücrelerin, bozulan homeostazı yeniden sağlamak ve toksik ajanların neden olduğu hasarı önlemek için uyarlanabilir biyolojik bir yanıt mekanizmasına sahip olduğu ileri sürülmüştür. Bu mekanizma hormesis olarak bilinir ve stres kaynaklı hafif bir uyarımın biyolojik olarak faydalı etkilere yol açtığı genel bir olguyu tanımlar (55). Örneğin, yaşlanmada düşük düzeyde ROS veya MGO organizmanın yaşam süresini artırırken, daha yüksek düzeyler ömrü kısaltabilir (56). MGO'nun hormetik etkisi ilk kez kanser hücrelerin büyümesi üzerinde gösterilmiştir (55,57). Son çalışmalar, hormetik bir etkinin RCS'ler tarafından da uygulandığına dair önemli kanıtlar sağlamış ve mitohormesisin yanı sıra "glikohormesisin" de var olduğunu göstermiştir. Zemva ve ark (58) mayada düşük seviyelerdeki MGO'nun çok aşamalı bir savunma mekanizmasını aktive ettiğini göstermiştir. Bu geri bildirim mekanizması, gelişmiş RCS üretiminin önlenmesini, reaktif metabolitlerin detoksifikasyonunu (yani Nrf2'nin indüklenmesi ve glioksalaz 1'in sentezinin artması ve protein kalite kontrol sistemi tarafından hasarın giderilmesini (yani moleküler şaperonlar HSP70 ve BTN2'nin indüklenmesi) amaçlayan transkripsiyonel bir yanıtı içerir. Glikohormetik yanıt memeli hücrelerinde de mevcuttur ve onların artan enerji akışına önceden adapte olmalarını sağlar (55).

Proteinlerin glikasyona bağlı yapısal ve fonksiyonel karakterizasyonları tam olarak anlaşılamamıştır. Sharma ve ark. (27) yaptığı bir çalışmada glikasyon ajanı olarak glioksal (GO) kullanılarak farklı proteinler (alfa laktalbümin, α -LA; lizozim, Lyz; karbonik anhidraz CA; ve miyoglobin, Myo) üzerinde meydana gelen erken ve geç konformasyonel değişiklikler ve fonksiyonel değişiklikler üzerine sistematik bir araştırma yapmışlar ve çalışmanın sonucunda, bu tez çalışmasına paralel olarak, GO ile modifiye edilen CA enzimin inhibe olduğunu bulmuşlardır. CA enziminin 24 lizin amino asiti içermesine rağmen, proteinlerin glikasyon için kullanılan bileşiğine karşı yapısal duyarlılığı, lizin içeriğinin sayısına veya glikasyonun derecesine tam olarak bağlı olmadığı anlaşılmıştır. Ayrıca, benzer lizin içeriğine sahip proteinler (CA ve Myo), glioksal ile glikasyon boyutunda üç kat fark göstererek miyoglobinde daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Sonuçlar, belirli lizin kalıntılarının glikasyondan korunabileceğine (erişilemez) veya glikasyon ajanına karşı reaktivitelerinin çok zayıf olabileceğini göstermektedir (27). Proteinlerin doğal durumdan konformasyonel olarak değiştirilmiş duruma yapısal geçişler, enzimin aktif bölgelerini etkilemiş ve dolayısıyla katalitik verimliliklerini bozmuş olabilir. Diğer açıdan,



enzim aktivitesinde gözlemlenen değişikliklerin, sadece glioksal tarafından aktif bölgedeki kalıntıların kovalent modifikasyonuna bağlı olmadığı ve yapısal değişikliklerden kaynaklandığını gösteren sonuçlar da mevcuttur. Belki de yapısal değişiklikler işlevsel verimlilik için yeterlidir. Enzim fonksiyonlarındaki bu tür değişikliklerin hücrel mekanizmalarda da değişikliklere yol açacağı belirtilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda CA'nın glikasyona yatkın olduğu gösterilmiştir. Antiglikasyon özelliği olduğu bilinen S-allyl l-cysteine (SAC) molekülünün CA'nın MGO tarafından kovalent modifikasyonuna karşı etkisi araştırılmış ve MGO ile modifiye edilen CA'nın fonksiyonel aktivitesinde %100 kayıp olduğu ancak ortama MGO ile aynı zamanda 1 mM konsantrasyonda SAC ilave edilmesi sonucunda enzim aktivitesindeki kaybın yaklaşık %50 oranında olduğu belirlenmiştir. Ancak, MGO ile modifiye edilen CA'nın modifikasyonu tamamlandıktan sonra ortama ilave edilen SAC ile durumun tersine çevrilemediği ortaya konulmuştur (27,60).

İnsan CAII izoenzimi, 260 amino asitlik bir proteindir ve yapısında 24 Lys, 12 His, 2 Cys, 8 Tyr, 12 Phe, 7 Trp, 7 Arg, 2 Met amino asiti bulundurmaktadır (3). Yapıda hedef amino asitlerin bulunması ve sayısı kadar bunların yerleşimi de çok önemlidir. hCAII üzerinde HTL ve MGO için hedef amino asitler olan lizin ve MGO için arjinin gibi aminoasit rezidüleri sayıca fazla olmasa da yerleşim yeri enzim aktivitesinde önemli rol oynamaktadır. Histidin, sistein ve lizin amino asitleri sıklıkla enzimlerin katalitik aktiviteden sorumlu aktif bölgelerde bulunmaktadır. Bu amino asitlerden His64, 94, 96 119 ve Lys127 hCAII'nin aktif bölgesindeki katalitik aktiviteden sorumludur (3). Bu nedenle HTL ve MGO modifikasyonu aktiviteyi etkilemiş olabilir. Fizyolojik koşullarda MGO, AGE'ler üretmek için daha çok arjinin kalıntılarına bağlanır. İnsan proteinlerinde ortalama 26 arjinin kalıntısı bulunmuştur, bu da tüm proteinlerin %3-13'ünün MGO türevi bir eklenti içerdiğini göstermektedir. MGO tarafından modifiye edilen arjinin sayısı proteinler arasında farklılık göstermektedir. Beta aktin, alfa enolaz ve HSP 90 beta için toplam arjinin sayısı sırasıyla 19, 17, 32 ve modifiye edilen arjinin sayısı 9'dur. Aldehit dehidrogenaz 16 A1'in 58 arjinine sahip olması ve MGO'nun sadece 5 arjinin modifiye etmesi dikkat çekicidir. Piruvat kinaz M'de 31 arjinin bulunur ve 11 kadar arjinin MGO ile etkileşime girer (59). Dolayısıyla hCAII'nin sahip olduğu 7 arjinin amino asitinden hangilerinin MGO ile modifikasyon oluşturduğu mevcut ölçüm yöntemleriyle ortaya konulamamış olsa da aktivite ve antijenite üzerinde önemli etkileri olabileceği düşünülmektedir.



Bu tez çalışmasında HTL ile modifiye edilen hCAII enziminin aktivitesinin hidrataz ve esteraz yöntemleri ile belirlendiğinde, 0-50 mM HTL konsantrasyonları arasında doz artışına bağlı olarak enzimin inhibe olduğu görüldü. Yapılan diğer benzer çalışmalarda gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ve laktat dehidrogenaz enzimlerinin homosisteinilasyonunun da enzimatik aktivitelerinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur (61). Ayrıca hCAII enziminin homosisteinilasyonunda p-nitrofenil asetatın hidrolizine dayanan esteraz aktivitesi ölçümünde artan HTL dozuna bağlı olarak azalma tespit edilmiştir (7). Ancak bu çalışmada modifikasyon sonrası artan HTL diyaliz ile uzaklaştırılmamıştır. Dolayısıyla HTL'nin enzim aktivitesine olan doğrudan etkisi ihmal edilmiştir.

Karbonik anhidraz asidik bir proteindir. Asidik proteinlerin HTL ile modifikasyonları araştıran çalışmalarda CAII'de yapısal değişiklikler olduğu ve agregat oluşumu gözlemlendiği bulunmuştur. Dolayısıyla N-homosisteinlenmiş asidik proteinlerin katlanmadığı ve agregat oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir (7).

Bu çalışmada proteinlerin enzimatik olmayan glikasyon ve homosisteinilasyon modifikasyonlarının hCAII'nin antijenitesine etkisini belirlemek için farelere tek doz uygulandı. hCAII enziminin homosisteinilasyonu için insanlardaki fizyolojik yüksek konsantrasyon sınır değeri olan 100 µM HTL ile 24 sa 37°C'de inkübe edildikten sonra uygulandı. Glikasyon için hiperglisemik durumu yansıtan değer olan 5 mM MGO ile 24 sa 37°C'de inkübe edilmesiyle modifiye edilen hCAII enzimleri kullanıldı (51).

Bu çalışmada Balb-c farelere insan CA II izoenzimleri uygulandığından dolayı, yapılan ilk değerlendirme olarak, hCA II izoenziminin tüm doğal ve modifiye formlarının fareler için antijenik özelliklere sahip olduğunu başarılı şekilde gösterdik ($p<0.001$) (Resim 6, Şekil 17). Bu tez çalışmasında MGO ile modifikasyonun modifiye olmayan hCAII enzime kıyasla antijeniteyi önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 17). Şentürk A. ve ark. (62) yaptığı benzer bir çalışmada oksidatif stres sonucu oluşan ve oksidatif stresin belirteci olarak da kullanılan 4-hidroksinonenal (HNE), malondialdehit (MDA) ve peroksinitrit (PN) ile modifiye edilen hCAI ve hCAII'nin antijenik etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada bazı ajanların (PN) antijeniteyi artırırken bazılarının (HNE ve MDA) azaltıcı etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasında ise HCY ile modifikasyonunun antijenite üzerinde belirgin bir etkisi bulunamamıştır ($p>0.05$). Bu modifikasyonlar ile hCAII izoenziminin fare bağışıklık sistemi tarafından tanınan hCAII enzimi üzerindeki önemli bir epitopu maskeleyebileceği düşünülmektedir. hCAII enziminde



HCY ve MGO için hedef amino asitler olan lizin ve MGO için arjinin gibi aminoasit rezidüleri sayıca fazla olmasa da yerleşim yeri antijenitesinde de önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle modifikasyon antijeniteyi etkilemiş olabilir.

N-homosisteinlenmiş (N-HCY) proteininin immünojenik olabileceği ilk olarak N-HCY-LDL ile aşıl原因an tavşanların anti-N-HCY-protein antikorları geliştirdiği gösterilerek kanıtlanmıştır. Bu tür immünizasyonlardan elde edilen anti-serumların N-HCY-proteinleri üzerindeki N-HCY-Lys epitopunu tanıdığı ancak modifiye edilmemiş proteinlere bağlanmadığı belirlenmiştir (31). Ayrıca insan çalışmalarında serumda HTL ile modifiye edilmiş apolipoprotein A1 ve Alzheimer hastalarında mikrotübülle ilişkili protein 1'in N-homosisteinilasyonu, tanımlanmıştır (30). N homosisteinile edilmiş insan proteinleri hakkındaki sınırlı sayıdaki çalışmaların nedenleri muhtemelen HTL'nin yarı ömrünün kısa olması ve sitoplazmik ve serum enzimleri, yani bleomisin hidrolaz ve paraoksonaz 1 tarafından metabolize edilmeye duyarlılığıdır; bu da HTL'nin çok zor tespit edilebilirliğini gösterir. İnsanlarda tespit edilen düşük sayıdaki N-homosisteinlenmiş proteinlerin aksine, bir tiyoester probu ve kütle spektrometresi bazlı kimyasal profil oluşturma proteomikleri kullanılarak HTL ile tedavi edilen HeLa hücrelerinde birkaç yüz N-homosisteinlenmiş protein tanımlanmıştır (30).

Protein modifikasyonlarında glikasyon, dikarbonil bileşikler gibi küçük moleküllerin protein ile etkileşimi CEL, CML, pentosidin, argpirimidin ve çapraz bağlı eklentiler gibi florojenik ve florojenik olmayan AGE'ler üretir. Bu AGE'ler makromoleküller üzerinde otoimmün reaksiyona neden olan neoepitoplar oluşturur. Hem doğal fibrinojen (N-Fib) hem de MGO ile modifiye olan fibrinojene (MGO-Fib) karşı immün yanıt deney hayvanlarında araştırılmış ve antikor titresinin N-Fib ile karşılaştırıldığında MGO-Fib durumunda oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. N-Fib'e kıyasla, MGO-Fib'e karşı oluşan serum antikorları maksimum inhibisyon yüzdesi göstermiştir. Bu durum, protein üzerinde yüksek immünojenite kazandıran neoepitopların oluşumunu açıkça göstermiştir (63). Üstelik kalıcı hiperglisemik durumda dikarbonil konsantrasyonu önemli ölçüde yükselmiştir. Ayrıca, glikolize proteinler üzerinde neoepitoplara maruz kalma ve bunların oluşması, onları oldukça immünojenik hale getirir ve bu da otoantikorların üretimine yol açar (23).

Sonuç olarak, hCA II enzimi insan eritrositlerinden saflaştırıldıktan sonra HCY ve MGO ile enzimatik olmayan posttranslasyonel modifikasyonları *in vitro* olarak gerçekleştirilmiş ve western blot yöntemiyle doğrulanmıştır. Modifikasyonların enzim



aktivesi üzerine etkileri araştırıldığında, glikasyona bağılı olarak hormesis durumunu *in vitro* yansıtabileceğı ve N-homosisteinilasyona bağılı olarak enzim aktivitesinde artan konsantrasyonla ilişkili inhibisyona neden olduğı belirlenmiştir. Bu modifikasyonların enzimin antijenik özelliklerine etkisi araştırıldığında ise hCAII enziminin MGO ile modifikasyonun Balb-c farelerde yüksek immün cevap oluşturarak antijeniteyi arttırdığı, HCY'nin antijeniteyi değıştirmediğı sonucuna ulaşılmıştır. MGO ile modifikasyonun neden olduğı yüksek antijenitenin sebebinin moleküllerin etkileştiğı aminoasitlerin farklı olması ve bu hedef amino asitlerin hCAII üzerindeki yerleşimlerinin de farklı olması nedeninden kaynaklanabileceğı kanaatine varılmıştır.



6. KAYNAKLAR

1. CT Supuran (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery* 7(2): 168-181.
2. Aspatwar A, Supuran, CT, Waheed A, Sly WS, Parkkila S (2023). Mitochondrial carbonic anhydrase VA and VB: properties and roles in health and disease. *The Journal of Physiology* 601(2): 257-274.
3. Şentürk A (2015). Oksidatif olarak modifiye edilmiş karbonik anhidraza karşı otoantikor oluşumunun ve bu antikorların bazı romatoid hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon
4. Sharma C, Hamza A, Boyle E, Donu D, Cen Y(2024). Post-Translational Modifications and Diabetes. *Biomolecules* 14(3): 310.
5. Di Fiore A, Supuran CT, Scaloni A, De Simone G (2020). Human carbonic anhydrases and post-translational modifications: a hidden world possibly affecting protein properties and functions. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35(1):1450-1461.
6. Sharma GS, Singh LR (2017). Conformational status of cytochrome c upon N-homocysteinylation: Implications to cytochrome c release. *Arch Biochem Biophys* 614:23-27.
7. Sharma GS, Kumar T, Singh LR (2014). N-homocysteinylation induces different structural and functional consequences on acidic and basic proteins. *PloS One* 9(12): e116386.
8. Gharib R, Khatibi A, Khodarahmi R, Haidari M, Husseinazadeh S (2020). Study of glycation process of human carbonic anhydrase II as well as investigation concerning inhibitory influence of 3-beta-hydroxybutyrate on it. *International Journal of Biological Macromolecules* 149: 443-449.
9. Jakubowski M, Szahidewicz-Krupska E, Doroszko A (2018). The Human Carbonic Anhydrase II in Platelets: An Underestimated Field of Its Activity. *Biomed Res Int* 28: 4548353.
10. Köksal Z, Alım Z, Bayrak S, Gülçin İ, Özdemir H (2019). Investigation of the effects of some sulfonamides on acetylcholinesterase and carbonic anhydrase enzymes. *J Biochem Mol Toxicol* 33(5): e22300.
11. Zamanova S, Shabana AM, Mondal UK, Ilies MA (2019). Carbonic anhydrases as disease markers. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(7): 509-533.



12. Domsic JF, Avvaru BS, Chae UK, Gruner SM, Agbandje-McKenna M, Silverman DN, McKenna R (2008). Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase II. *Journal of Biological Chemistry* 283: 30766-30771.
13. Huang X, Winter D, Glover, DJ, Supuran, CT, Donald, WA (2023). Effects of Phosphorylation on the Activity, Inhibition and Stability of Carbonic Anhydrases. *International Journal of Molecular Sciences* 24(11): 9275.
14. Barresi E, Ravichandran R, Germelli L, Angeli A, Baglini E, Salerno S, Marini AM, Costa B, Da Pozzo E, Martini C, Da Settimo F, Supuran C, Cosconati S, Taliani S (2021). Carbonic anhydrase activation profile of indole-based derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36(1): 1783-1797.
15. Wang R, Wang G (2019). Protein Modification and Autophagy Activation. *Adv Exp Med Biol* 1206: 237-259.
16. Li Y, Zhang R, Hei H (2023). Advances in post-translational modifications of proteins and cancer immunotherapy. *Front Immunol* 22(14): 1229397.
17. Di Fiore A, Supuran CT, Scaloni A, De Simone G (2022). Post-translational modifications in tumor-associated carbonic anhydrases. *Amino Acids* 54: 543–558.
18. Kitamura N, Galligan JJ (2023). A global view of the human post-translational modification landscape. *The Biochemical Journal* 480(16): 1241-1265.
19. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E (2014). PhosphoSitePlus, Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res* 43: D512-D520.
20. Yu K, Zhang Q, Liu Z, Zhao Q, Zhang X, Wang Y, Wang ZX, Jin Y, Li X, Liu ZX (2019). qPhos: A database of protein phosphorylation dynamics in humans. *Nucleic Acids Res* 47: D451-D458.
21. Ullah S, Lin S, Xu Y, Deng W, Ma L, Zhang Y, Liu Z, Xue Y (2016). dbPAF: An integrative database of protein phosphorylation in animals and fungi. *Sci Rep* 6: 23534.
22. Rehman S, Alouffi S, Faisal M, Qahtan AA, Alatar AA, Ahmad S (2021). Methylglyoxal mediated glycation leads to neo-epitopes generation in fibrinogen: Role in the induction of adaptive immune response. *Int J Biol Macromol* 1(175): 535-543.
23. Rehman S, Song J, Faisal M, Alatar AA, Akhter F, Ahmad S, Hu B (2021). The Neoepitopes on Methylglyoxal- (MG-) Glycated Fibrinogen Generate Autoimmune Response: Its Role in Diabetes, Atherosclerosis, and Diabetic Atherosclerosis Subjects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 6621568.



24. Sirangelo I, Iannuzzi C (2021). Understanding the Role of Protein Glycation in the Amyloid Aggregation Process. *International Journal of Molecular Sciences* 22(12): 6609.
25. Rabbani N, Thornalley P (2014). Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nat Protoc* 9: 1969-1979.
26. Xue J, Ray R, Singer D (2014). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) specifically recognizes methylglyoxal-derived AGEs. *Biochemistry* 53(20): 3327-3335.
27. Sharma GS, Bhattacharya R, Krishna S, Alomar SY, Alkhuriji AF, Warepam M, Kumari K, Rahaman H, Singh LR (2021). Structural and Functional Characterization of Covalently Modified Proteins Formed By a Glycating Agent, Glyoxal. *ACS Omega* 6(32): 20887-20894.
28. Galligan JJ, Wepy JA, Streeter MD, Kingsley PJ, Mitchener MM, Wauchope OR, Beavers WN, Rose KL, Wang T, Spiegel DA, Marnett LJ (2018). Methylglyoxal-derived posttranslational arginine modifications are abundant histone marks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(37): 9228-9233.
29. Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S (2016). The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci* 17(10): 1733.
30. Loubane G, Robert G, Firdaus SB, Venne P, Comeau C, Boudreault PL, Komba JE, Wagner JR, Naylor S, Klarskov K (2023). Conundrum of dehydroascorbic acid and homocysteine thiolactone reaction products: Structural characterization and effect on peptide and protein N-homocysteinylation. *Free Radical Biology & Medicine* 206: 111-124.
31. Jakubowski H (2019). Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease. *Physiological Reviews* 99(1): 555-604.
32. Stroylova YY, Chobert JM, Muronetz VI, Jakubowski H, Haertlé T (2012). N-homocysteinylation of ovine prion protein induces amyloid-like transformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 526(1): 29-37.
33. Jyoti, Mir AR, Habib S, Siddiqui SS, Ali A, Moinuddin (2016). Neo-epitopes on methylglyoxal modified human serum albumin lead to aggressive autoimmune response in diabetes. *Int J Biol Macromol* 86: 799-809.



34. Undas A, Perla J, Lacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H (2004). Autoantibodies against N-homocysteinylation proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke* 35(6): 1299-304.
35. Włoczkowska O, Perla-Kaján J, Smith AD, de Jager C, Refsum H, Jakubowski H (2021). Anti-N-homocysteine-protein autoantibodies are associated with impaired cognition. *Alzheimer's & Dementia* 7(1): e12159.
36. Colasanti T, Sabatinelli D, Mancone C, Giorgi A, Pecani A, Spinelli FR, Di Giamberardino A, Navarini L, Speziali M, Vomero M, Barbati C, Perricone C, Ceccarelli F, Finucci A, Celia AI, Currado D, Afeltra A, Schininà ME, Barnaba V, Conti F, Alessandri C (2020). Homocysteinylation alpha 1 antitrypsin as an antigenic target of autoantibodies in seronegative rheumatoid arthritis patients. *Journal of Autoimmunity* 113: 102470.
37. Nowakowska-Plaza A, Potaczek DP, Gluszko P, Undas A (2014). Antibodies to N-homocysteinylation albumin and haemoglobin in patients with rheumatoid arthritis: a potential new marker of disease severity. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 43(1): 17-21.
38. Bhat S, Mary S, Banarjee R, Giri AP, Kulkarni MJ (2014). Immune response to chemically modified proteome. *Proteomics Clinical Applications* 8(1-2): 19-34.
39. Sule R, Rivera G, Gomes AV (2023). Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. *BioTechniques* 75(3): 99–114.
40. Aslım HP, Bulut O (2021). Western Blot. *Journal of Advances in Vet Bio Science and Techniques* 6(1): 45-56.
41. Atasever A, Ozdemir H, Gulcin I, Kufrevioglu OI (2013). One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chemistry* 136(2): 864-870.
42. Wilbur KM, Anderson NG (1948). Carbonic Anhydrase Colorimetric Determination. *Electrometric and Journal of Biological Chemistry* 176: 147-154.
43. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
44. GL Ellman (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
45. Arslan O, Nalbantoğlu B, Demir N, Özdemir H, Küfrevioğlu Öİ (1996). A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences* 26: 163-166.



46. Verpoorte JA, Mehta S, Edsall JT (1967). Esterase activities of human carbonic anhydrase B and C. Journal of Biological Chemistry 242: 4221-4229.
47. Bergmayer U, Graßl M (1988). Methods of Enzymatic Analysis: samples, reagents, assesment of results. Third Edition (Vol. II, sayfa. 441-456). Weinheim: VCH Publishers.
48. Alver A (1997). Belirli yaş gruplarındaki sağlıklı bireylerde serum total karbonik anhidraz ve karbonik anhidraz III aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon
49. Alver A, Menteşe A, Karahan SC, Erem C, Keha EE, Arikan MK, Eminağaoğlu MS, Deger O (2007). Increased serum anti-carbonic anhydrase II antibodies in patients with Graves' disease. Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association 115(5): 287-291.
50. Farzadfard A, König A, Petersen SV, Nielsen J, Vasili E, Dominguez-Meijide A, Buell AK, Outeiro TF, Otzen DE (2022). Glycation modulates alpha-synuclein fibrillization kinetics: A sweet spot for inhibition. The Journal of Biological Chemistry 298(5): 101848.
51. Ahmad R, Warsi MS, Abidi M, Habib S, Siddiqui S, Khan H, Nabi F, Moinuddin (2024). Structural perturbations induced by cumulative action of methylglyoxal and peroxyxynitrite on human fibrinogen: An *in vitro* and *in silico* approach. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy 307: 123500.
52. Banerjee S (2017). Formation of Pentosidine Cross-Linking in Myoglobin by Glyoxal: Detection of Fluorescent Advanced Glycation End Product. J Fluoresc 27: 1213-1219.
53. Banerjee S, Chakraborti AS (2014). Structural alterations of hemoglobin and myoglobin by glyoxal: a comparative study. International Journal of Biological Macromolecules 66: 311-318.
54. Kang JH (2003). Oxidative damage of DNA induced by methylglyoxal in vitro. Toxicology Letters 145(2): 181-187.
55. Nigro C, Leone A, Fiory F, Prevezano I, Nicolò A, Mirra P, Beguinot F, Miele C (2019). Dicarbonyl Stress at the Crossroads of Healthy and Unhealthy Aging. Cells 8(7): 749.
56. Kold-Christensen R, Johannsen M (2020). Methylglyoxal Metabolism and Aging-Related Disease: Moving from Correlation toward Causation. Trends in Endocrinology and Metabolism 31(2): 81-92.



57. Nokin MJ, Durieux F, Bellier J, Peulen O, Uchida K, Spiegel DA, Cochrane JR, Hutton CA, Castronovo V, Bellahcène A (2017). Hormetic potential of methylglyoxal, a side-product of glycolysis, in switching tumours from growth to death. *Scientific Reports* 7(1): 11722.
58. Zemva J, Fink CA, Fleming TH, Schmidt L, Loft A, Herzig S, Knieß RA, Mayer M, Bukau B, Nawroth PP (2017). Hormesis enables cells to handle accumulating toxic metabolites during increased energy flux. *Redox Biol* 13: 674-686.
59. Kotian, NP, Prabhu A, Tender T (2024). Methylglyoxal Induced Modifications to Stabilize Therapeutic Proteins: A Review. *Protein J* 43: 39-47.
60. Bhattacharya R, Saini S, Ghosh S, Roy P, Ali N, Parvez MK, Al-Dosari MS, Mishra, AK, Singh LR (2023). Organosulfurs, S-allyl cysteine and N-acetyl cysteine sequester di-carbonyls and reduces carbonyl stress in HT22 cells. *Scientific Reports* 13(1): 13071.
61. Chen SM, Tang XQ (2022). Homocysteinylation and Sulfhydration in Diseases. *Current neuropharmacology* 20(9): 1726-1735.
62. Senturk A, Alver A, Karkucak M, Küçük M, Rendi TA (2023). Oxidative modification of carbonic anhydrase by peroxynitrite trigger immune response in mice and rheumatic disease patients. *Am J Med Sci* 366(6): 438-448.
63. Perween S, Abidi M, Faizy AF, Moinuddin (2022). Biophysical changes in methylglyoxal modified fibrinogen and its role in the immunopathology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Biological Macromolecules* 202: 199-214.



EKLER



EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi

T.C. KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU						
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu				
	AÇIK ADRESİ	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 61080 /Trabzon				
	TELEFON	0462- 3775667				
	FAKS, E- posta	0462- 3252270 – etikhd@ktu.edu.tr				
BAŞVURU BİLGİLERİ	ETİK KURUL DOSYA NO:	2021 / 24				
	ÇALIŞMANIN ADI	"Karbonik Anhidraz II" nin Homosistein ve Metilglioksal ile Modifikasyonunun Enzim Aktivitesi ve Antijenik Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi"				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI	ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ahmet ALVER			
	UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya				
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, ÜNVANI/ADI/SOYADI	*Arş.Gör.Neslihan SAĞLAM, Arş.Gör.Elif ŞAHİN, Arş.Gör.Şeniz DOĞRAMACI				
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	TEZ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:9		Tarih: 16/03/2021			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'na incelenmiş; yapılan inceleme sonucunda araştırmanın KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Yönergesi'ne uygun bulunarak onaylanmasına ve araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.					
	ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYILARI	40 adet Fare				
BAŞLANGIÇ Tarihi ve ETİK KURUL İZİN SÜRESİ:						
ÜYELER						
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma İle İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ahmet AYAR Başkan	Fizyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Serdar TÜRKİYILMAZ Başkan V.	Genel Cerrahi	KTÜ Tıp Fakültesi	E	☐ Var Yok ☒	☐ E ☒ H	KATILMADI
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ Üye	Histoloji ve Embriyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Doç.Dr.Zerrin PULATHAN Üye	Kalp ve Damar Cerrahisi	KTÜ Tıp Fakültesi	K	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Rezzan ALİYAZICIOĞLU Üye	Temel Eczacılık Bilimleri Biyokimya	KTÜ Eczacılık Fakültesi	K	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Mine KADIOĞLU DUMAN Üye	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	K	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Sabriye ÇANAKÇI Üye	Moleküler Biyoloji	KTÜ Fen Fakültesi	K	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Doç.Dr.Nuray YILMAZ ALTINTAŞ Üye	Ağız Diş ve Çene Cerrahisi	KTÜ Diş Hekimliği Fakültesi	K	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Dr.Öğr.Üyesi Şükrü KELEŞ Üye	Tıp Tarihi ve Etik	KTÜ Tıp Fakültesi	E	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Dr.Öğr. Üyesi İsmail SAYGIN Üye	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Sait AL Üye	Veteriner Hekim	KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi	E	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Doç.Dr.Hasan Rıza AYDIN Üye	Üroloji	Kanuni Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	
Ecz.Hazım ÖZTUNA Üye	Eczacı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	E	☐ Var Yok ☒	☐ E ☒ H	KATILMADI
Günay CİN Üye		Sivil Üye	K	☐ Var Yok ☒	☒ E ☐ H	



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : NESLİHAN SAĞLAM
Uyruğu : TC
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	KTÜ, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2024
Yüksek Lisans	KTÜ, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2016
Lisans	KTÜ, Kimya Bölümü	2010
Lise	Trabzon Lisesi	2005

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl)
1. Arş.Gör.	KTÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2014-
2. Erasmus Stajı	Nalecz Biyosiberetik ve Biyomedikal Mühendisliği Enstitüsü PAS, Polonya	2022-2023 (4 ay)

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Tıbbi Biyokimya

YAYINLAR (Tez yazım kurallarına göre yazılmalıdır)

- Bozoğlu ST, Cömert HSY, Şalcı G, Alver A, Saygın İ. Sağlam N, Erdem Ş, İmamoğlu M, Sarıhan H (2024). Evaluation of the effectiveness of mother milk exosomes in the experimental corrosive esophagitis model. Pediatric Surgery International, 40(1): 118.



2. Çetinavcı D, Yenilmez E, Bıyık AF, Alver A, Sağlam N (2023). Effects of rosmarinic acid on cyclophosphamide-induced nephrotoxicity in rats. Cukurova Medical Journal 48(3): 902-910.
3. Sahin E, Saglam N, Erdem S, Alvuroglu E, Abidin I, Yulug E, Alver A (2022). 7,8-Dihydroxyflavone alleviates Endoplasmic Reticulum Stress in cafeteria diet-induced metabolic syndrome. Life Sci 1(306):120781.
4. Kahraman C, Rendi TA, Sağlam N, Akca II, Abidin I, Alver A (2022). Reciprocal effects of adipose tissue denervation and high fat diet on serum metabolic parameters and adipokine levels in rats: a long term study. Journal Of Evolutionary Biochemistry And Physiology 58(2): 410-417.
5. Keser H, Doğramacı Ş, Şahin E, Sağlam N, Erdem M, Alver A, Aydın-Abidin S. (2020). The TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone improves sensory-motor performance and reduces lipid peroxidation in old mice. General Physiology and Biophysics 39(5): 471-479.
6. Kahraman C, Alver A, Akça İİ, Rendi TA, Sağlam N (2019). Retroperitoneal yağ dokusu denerve edilmiş sıçanlarda yüksek yağlı diyetin yağ dokusundaki oksidatif strese etkisi. SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi 9(2): 85-89.

BİLDİRİLER

1. Çetinavcı D, Kutlu A, Akman AU, Gür Kutlu B, Zengin T, Keskin O, Arıcı T, Yenilmez E, Alver A, Sağlam N (2021). 3rd International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2021). 3rd International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2021) (pp.33). Ankara, Turkey
2. Çetinavcı D, Yenilmez E, Bıyık AF, Alver A, Sağlam N (2021). Effects of Rosmarinic Acid Against Nephrotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats. International Congress of Future Medical Pioneers. 8:77.
3. Yalduz F, Sağlam N, Şahin E, Alver A (2020). De novo lipogenezde beyin kaynaklı nörotrofik faktör ile asetil coa karboksilaz arasındaki ilişkinin incelenmesi. 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, Gaziantep, Türkiye, 18-20 Aralık 2020.
4. Sağlam N, Şahin E, Alver A, Menteşe A (2020). Oleuropeinin RAW264.7 hücre serisinde CD36 gen ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi. 31. Ulusal Biyokimya



Kongresi, Gaziantep, Türkiye, 18-20 Aralık 2020.

5. Şahin E, Sağlam N, Doğramacı Ş, Alver A (2020). Bir BDNF Agonisti Olan 7,8 dihidroksiflavon (7,8-DHF) yaşlı farelerin karaciğerindeki oksidatif stresi azaltır. 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, Gaziantep, Türkiye, 18-20 Aralık 2020.
6. Akça II, Sağlam N, Şahin E, Bodur A, Alver A (2018). Serum ghrelin levels of BDNF heterozygous mice were increased by high-fat diet. 1st International Food and Medicine Congress, Ankara, Turkey, 24-27 May 2018.
7. Bodur A, Şahin E, Sağlam N, Akça II, Alver A (2018). Investigation of serum neuropeptide y levels in BDNF +/- mice fed with high-fat diet. 1st International Food and Medicine Congress, Ankara, Turkey, 24-27 May 2018.
8. Kahraman C, Alver A, İnce İ, Ahmadi Rendi T, Sağlam N (2017). Carbohydrate and High Fat Diet Effect of Oxidative Stress in Adipose Tissue. 1st Adnan Menderes University International Health Sciences Congress, Aydın, Turkey, June 29- July1, 2017, 420-420.
9. Sağlam N, Ahmadi Rendi T, Kahraman C, Alver A (2016). Resistin Levels in Denervated Obese Rats. 41st FEBS, Aydın, Turkey, 3-8 September 2016, no.283, 176-176.
10. Sağlam N, Rendi AT, Kahraman C, Alver A (2015). Adiponectin levels in denervated Obese Rats. 27th National Congress of Biochemistry, Antalya, Turkey, 3-6 November 2015, 219-219.

HOBİLER

1. Seyahat etmek
2. Kitap okumak
3. Film izlemek

