



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HOMOSİSTEİNİN KARBONİK ANHİDRAZ
I VE II İZOENZİMLERİNİN AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sera ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE

TRABZON-2025

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 aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

17/07/2025

Sera ŞAHİN

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen ve her daim yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca insani ve ahlaki değerlerini kendime örnek edindiğim; tezimin her aşamasında desteğini benden esirgemeyen, tüm bu süreç boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle destek veren Prof. Dr. Selim DEMİR, Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN, Dr. Öğr. Üyesi Zekeriya DÜZGÜN, Arş. Gör. Dr. Ertuğrul YİĞİT, Arş. Gör. Fikret YANAR ve Uzm. Dyt. Seçkin KAYA'ya

Eğitim sürem içerisinde emekli olan hocamız Sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER'e,

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerinden çokça faydalandığım değerli hocalarım; Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL, Prof. Dr. Asım ÖREM, Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN, Doç. Dr. Serap ÖZER YAMAN, Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin YAMAN'a,

Lisansüstü eğitim hayatım süresince her koşulda yanımda olan Uzm. Dyt. Ceren PEKŞEN, Uzm. Dyt. Ayşe TEKİN ve Arş. Gör. Dr. Şeniz ERDEM'e

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm araştırma görevlisi, yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili anne ve babama, hayatım boyunca beni hep destekleyen ablalarım ve hayatımın her anında yanımda olan ikiz kardeşim Sema ŞAHİN'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Sera ŞAHİN

Bu tez çalışması KTÜ BAP TYL-2024-11151 numaralı proje bütçesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

ix

ŞEKİLLER DİZİNİ

xi

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xiii

ÖZET

xvi

ABSTRACT

xvii

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Homosistein ve Yapısı

3

2.1.1. Homosistein Metabolizması

4

2.1.2. Plazma Homosistein Düzeyleri

7

2.2. Enzimler ve Genel Özellikleri

7

2.2.1. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

8

2.2.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

9

2.3. Karbonik Anhidraz

10

2.3.1. Karbonik Anhidrazların Yapısal ve Katalitik Özellikleri

11

2.3.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Fizyolojik Fonksiyonları

12

2.3.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

13

2.3.4. Karbonik Anhidraz İnhibisyonu

14

2.3.4.1. Çinko İyonuna Bağlanan İnhibitörler

15

2.3.4.2. Çinko İyonuna Koordine Su Molekülü/Hidroksit İyonuna bağlanan İnhibitörler

16

2.3.4.3. Aktif Bölgenin Girişini Kapatan Bileşikler

17

2.3.4.4. Aktif Bölgenin Dışına Bağlanan Bileşikler

17

2.3.4.5. İnhibisyon Mekanizması Bilinmeyen Bileşikler

18

2.3.5. Karbonik Anhidraz Aktivasyonu

18

2.3.6. Karbonik Anhidraz I

20

2.3.7. Karbonik Anhidraz II	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Kullanılan Cihazlar, Ekipmanlar ve Malzemeler	24
3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar	24
3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	25
3.4. Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi Tayini	27
3.4.1. Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesi Tayini	27
3.4.1.1. Esteraz Aktivitesi Tayini Ölçümünde Kullanılan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi	28
3.4.1.2. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	28
3.4.1.3. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerine Asetazolamid, L-Histidin ve DL-Homosisteinin Etkisinin Belirlenmesi	29
3.4.2. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Tayini	31
3.4.2.1. Hidrataz Aktivitesi Tayini Ölçümünde Kullanılan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi	32
3.4.2.2. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	32
3.4.2.3. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Üzerine Asetazolamid, L-Histidin ve DL-Homosisteinin Etkisinin Belirlenmesi	33
3.5. Moleküler Kenetleme Analizi	34
3.5.1. Moleküler Dinamik Hesaplamalar	34
4. BULGULAR	36
4.1. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Esteraz ve Hidrataz Aktivitesi Sonuçları	36
4.1.1. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Enzim Konsantrasyonu Aralığının Belirlenmesi	36
4.1.2. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	38
4.1.3. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Asetazolamidin Etkisinin Belirlenmesi	40
4.1.4. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine L-Histidinin Etkisinin Belirlenmesi	43

4.1.5. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine DL-Homosisteinin Etkisinin Belirlenmesi	44
4.2. Karbonik Anhidraz I İzoenziminin Asetazolamid, L-Histidin ve DL-Homosistein ile Moleküler Kenetleme Analiz Sonuçları	47
4.3. Karbonik Anhidraz II İzoenziminin Asetazolamid, L-Histidin ve DL-Homosistein ile Moleküler Kenetleme Analiz Sonuçları	49
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
6. KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	70



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Deneylerde kullanılan cihaz, ekipman ve malzemelerin marka ve modelleri	24
Tablo 2. Deneylerde kullanılacak kimyasalların isim, üretici firmaları ve ürün kodları	25
Tablo 3. Karbonik anhidraz esteraz aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımı	28
Tablo 4. İnsan CA I ve II izoenzimlerinin kinetik sabitlerinin belirlenmesi için kullanılan çözelti miktarları ve konsantrasyonları	29
Tablo 5. İnsan CA I ve II izoenzimlerinin AZM, HIS ve DL-Hcy'nin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözelti miktarları ve konsantrasyonu	31
Tablo 6. Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımı	32
Tablo 7. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine AZM, HIS ve DL-Hcy etkisinin tayini için reaksiyon karışımları	34
Tablo 8. Hidrataz ve esteraz aktivite ölçüm deneylerinde uygulanan hCA I izoenzimi konsantrasyonlarına karşılık elde edilen aktivite değerleri	37
Tablo 9. Hidrataz ve esteraz aktivite ölçüm deneylerinde uygulanan hCA II izoenzimi konsantrasyonlarına karşılık elde edilen aktivite değerleri	37
Tablo 10. <i>p</i> -Nitrofenil asetat substratının farklı konsantrasyonlarında hCA I ve hCA II izoenzimlerine ait esteraz aktivite değerleri	39
Tablo 11. CO ₂ 'nin farklı konsantrasyonlarında hCA I ve hCA II izoenzimlerine ait hidrataz aktivite değerleri	39
Tablo 12. İnsan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için belirlenen V_{max} ve K_M değerleri	40
Tablo 13. Esteraz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA I ve II izoenzimlerinin % aktivite tablosu	41
Tablo 14. Hidrataz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite tablosu	41
Tablo 15. Hidrataz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite tablosu	42
Tablo 16. Esteraz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA I ve II izoenzimlerinin % aktivite tablosu	43

Tablo 17. Hidrataz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA I ve II izoenzimlerinin % aktivite tablosu	43
Tablo 18. Esteraz yöntemiyle DL-Hcy'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite tablosu	45
Tablo 19. Esteraz yöntemiyle DL-Hcy'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite tablosu	45
Tablo 20. Hidrataz yöntemiyle DL-Hcy'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite tablosu	46
Tablo 21. Hidrataz yöntemiyle DL-Hcy'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite tablosu	46
Tablo 22. Karbonik anhidraz I ve II için moleküler kenetleme analizi ile belirlenen inhibitör ligandın ve DL-Hcy'nin bağlanma skorları	49
Tablo 23. Karbonik anhidraz I ve II için moleküler kenetleme analizi ile belirlenen HIS ve AZM'nin en iyi bağlanma skorları	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Homosisteinin kimyasal yapısı	3
Şekil 2. Total plazma homosistein komponentleri	3
Şekil 3. Homosistein metabolizması	4
Şekil 4. Homosistein-tiyolakton oluşum mekanizması	6
Şekil 5. Michaelis–Menten kinetiği	10
Şekil 6. Karbonik anhidraz II izoenziminin aktif bölgesinin şematik gösterimi	11
Şekil 7. Karbonik anhidrazların katalitik döngü mekanizması	12
Şekil 8. Karbonik anhidrazların hücre altı lokalizasyonu	13
Şekil 9. Çinko iyonuna bağlanan CA inhibitörlerinin inhibisyon mekanizması	15
Şekil 10. Çinko iyonuna koordine su molekülüne bağlanan bileşikler tarafından hCA inhibisyon mekanizması	16
Şekil 11. Karbonik anhidrazların aktif bölgeye girişini kapatarak inhibe eden bileşiklerin mekanizması	17
Şekil 12. Aktif bölgenin dışında CA inhibisyon mekanizması	18
Şekil 13. X-ışını kristalografisi ile belirlenen CA I yapısı	21
Şekil 14. X-ışını kristalografisi ile belirlenen CA II yapısı	22
Şekil 15. <i>p</i> -Nitrofenil asetat'ın CA tarafından <i>p</i> -nitrofenol ve asetik aside dönüştürülme reaksiyonu	27
Şekil 16. Çalışmada, farklı başlangıç substrat konsantrasyonlarında ölçülen hız (aktivite) değerlerine dayanarak oluşturulan Michaelis-Menten grafiği örneği	29
Şekil 17. A) Enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisinin belirleneceği örnek grafik (IC ₅₀) B) Enzim aktivitesi üzerine aktivatör etkisinin belirleneceği örnek grafik (AC ₅₀)	30
Şekil 18. İnsan CA I ve II izoenzimlerinin aktivite ölçümü deneylerinde kullanılan çalışma konsantrasyon aralığını belirlemek için çizilen konsantrasyon-aktivite grafiği	38
Şekil 19. İnsan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek için kullanılan Lineweaver-Burk grafikleri	40

Şekil 20. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine AZM'nin etkisi	42
Şekil 21. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine HIS'nin etkisi	44
Şekil 22. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine DL-Hcy'nin etkisi	47
Şekil 23. Karbonik anhidraz I izoenziminin inhibitör, asetazolamid, L-histidin ve DL-homosistein ile etkileşimlerine ait 3D ve 2D görüntüleri	48
Şekil 24. Karbonik anhidraz II izoenziminin inhibitör, asetazolamid, L-histidin ve DL-homosistein ile etkileşimlerine ait 3D ve 2D görüntüleri	51
Şekil 25. Karbonik anhidraz I ile DL-Hcy etkileşimi	52
Şekil 26. Karbonik anhidraz II ile DL-Hcy etkileşimi	53

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AC₅₀	Yarı aktivasyon konsantrasyonu
AG	Bağlayıcı grup
AH	Alzheimer hastalığı
ATP	Adenozin trifosfat
AZM	Asetazolamid
b	Işık yolu
BHMT	Betain-homosistein metiltransferaz
CA	Karbonik anhidraz
CAA	Karbonik anhidraz aktivatörü
CAI	Karbonik anhidraz inhibitörü
CBS	Sistatyonin β -sentaz
cm	Santimetre
CNS	Merkezi sinir sistemi
CoA	Koenzim A
CSE	Sistatyonin γ -liyaz
EA	Enzim aktivitesi
EC	Enzim komisyonu
FAD	Flavin adenin dinükleotid
GABAAR	γ -aminobütirik asit A reseptörü
GIST	Gastrointestinal stromal tümör
hCA	İnsan karbonik anhidraz
Hcy	Homosistein
HHcy	Hiperhomosisteinemi
HIS	L-Histidin
HTL	Homosistein-tiyolakton
IC₅₀	Yarı inhibisyon konsantrasyonu
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
kDa	kiloDalton
K_M	Michealis-Menten sabiti
KVH	Kardiyovasküler hastalıklar
L	Litre

M	Molar
MCI	Hafif bilişsel bozukluk
Met	Metiyonin
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MS	Metiyonin sentaz
MT	Metiltransferaz
MTHFR	Metilen tetrahidrofolat redüktaz
MTZ	Metazolamid
N-Hcy	N-Homositeinilasyon
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NMDA	N -metil- D -aspartat
NMDAR	NMDA reseptörü
P_i	İnorganik fosfat
<i>p</i>-NPA	<i>p</i> -Nitrofenil asetat
PP_i	Pirofosfat
RMSD	Kök ortalama kare sapması
RMSF	Kök ortalama kare dalgalanma
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SAH	S-adenozil homosistein
SAHH	S-adenozil homosistein hidrolaz
SAM	S-adenozilmetiyonin
SG	Yapışkan grup
S-Hcy	S-homositeinilasyon
SHMT	Serin hidroksi metiltransferaz
t	Time (Süre)
tHcy	Total homosistein
THF	Tetrahidrofolat
U	Ünite
v	Örnek hacmi
V	Toplam hacim

$V_{\max}$	Maksimum reaksiyon hızı
ZBG	Çinko bağlama grubu
[S]	Substrat konsantrasyonu
5,10-MTHF	5,10-metilen tetrahidrofolat

Simgeler

<	küçüktür
>	büyüktür
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
$\text{\AA}$	Angstrom
α	alfa
β	Beta
γ	Gama
Δ	Delta
δ	Sigma
ε	Epsilon
ζ	Zita
η	İta
θ	Tita
ι	İota
κ	Kappa

Formüller

CO_2	Karbondioksit
H^+	Hidrojen iyonu
H_2O	Su
H_2SO_4	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
HCO_3^-	Bikarbonat iyonu
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
Zn^{2+}	Çinko iyonu

ÖZET

Homosisteinin Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Homosistein (Hcy), metiyoninin hücre içi demetilasyonu sonucu oluşan, esansiyel olmayan bir amino asittir. Hcy'nin toksik düzeylerde birikimi (hiperhomosisteinemi, HHcy), ateroskleroz, kanser, Alzheimer hastalığı, glokom ve anemi gibi çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda, HHcy'nin birçok hastalıkta karbonik anhidraz (CA) izoenzimlerinin anormal aktiviteleriyle bağlantılı olduğu da bilinmektedir. CA enzimleri, karbondioksitin geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize ederek pH dengesi, elektrolit homeostazı ve çeşitli biyosentetik süreçlerde kritik rol oynar.

Bu çalışmada, Hcy'nin insan CA I ve CA II (hCA I ve hCA II) izoenzimlerinin aktivitesi üzerindeki etkileri hem *in vitro* analizler (esteraz ve hidrataz aktivitesi tayin yöntemleri) hem de moleküler kenetleme simülasyonları aracılığıyla araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak L-histidin (HIS) ve asetazolamid (AZM) kullanılmıştır. DL-Hcy, 0–4000 μM aralığında farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak test edilmiştir. Her iki aktivite tayin yöntemi sonucunda, DL-Hcy'nin her iki izoenzimin aktivitesini artırdığı gözlemlenmiştir. Esteraz aktivitesine göre, DL-Hcy'nin AC_{50} değerleri hCA I ve hCA II için sırasıyla 16.65 μM ve 23.32 μM olarak hesaplanmıştır. Hidrataz aktivitesi sonuçları ise hCA I ve hCA II için sırasıyla 8.95 μM ve 55.91 μM AC_{50} değerleri göstermiştir.

Moleküler kenetleme analizlerinde, CA I (PDB ID: 2fof) ve CA II (PDB ID: 2fou) kristal yapıları kullanılarak DL-Hcy, HIS ve AZM ligandlarının bağlanma simülasyonları gerçekleştirilmiş ve bağlanma afiniteleri değerlendirilmiştir. Analizler, DL-Hcy'nin özellikle CA II izoenzimine karşı zayıf bir inhibitör olduğunu ve bağlanma kararlılığının düşük seviyede kaldığını ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, *in vitro* analizlerden elde edilen AC_{50} değerleri ile moleküler kenetleme bulguları birlikte değerlendirildiğinde, DL-Hcy'nin hCA I ve hCA II izoenzimlerinin aktivitesini artırabilen potansiyel bir aktivatör adayı olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aktivatör, Enzim kinetiği, Homosistein, İnhibitör, Karbonik anhidraz, Moleküler modelleme

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Homocysteine on the Activity of Carbonic Anhydrase I and II Isoenzymes

Homocysteine (Hcy) is a non-essential amino acid formed through the intracellular demethylation of methionine. Accumulation of Hcy at toxic levels (hyperhomocysteinemia, HHcy) has been associated with various pathological conditions such as atherosclerosis, cancer, Alzheimer's disease, glaucoma, and anemia. HHcy is also known to be linked to abnormal activities of carbonic anhydrase (CA) isoenzymes in many diseases. CA enzymes play a critical role in pH regulation, electrolyte homeostasis, and various biosynthetic processes by catalyzing the reversible hydration of carbon dioxide.

In this study, the effects of Hcy on the activity of human CA I and CA II (hCA I and hCA II) isoenzymes were investigated through both *in vitro* analyses (using esterase and hydase activity assays) and molecular docking simulations. L-histidine (HIS) and acetazolamide (AZM) were used as positive controls. DL-Hcy was prepared and tested at various concentrations ranging from 0 to 4000 μM . Results from both activity assays showed that DL-Hcy increased the activity of both isoenzymes. According to esterase activity, the AC_{50} values of DL-Hcy were calculated as 16.65 μM for hCA I and 23.32 μM for hCA II. Hydase activity results showed AC_{50} values of 8.95 μM for hCA I and 55.91 μM for hCA II.

In molecular docking analyses, crystal structures of CA I (PDB ID: 2fof) and CA II (PDB ID: 2fou) were used to simulate the binding of DL-Hcy, HIS, and AZM ligands and to evaluate their binding affinities. The analyses revealed that DL-Hcy is a weak inhibitor of CA II isoenzyme and exhibits low binding stability.

In conclusion, when the AC_{50} values obtained from *in vitro* analyses are evaluated together with the molecular docking findings, it is concluded that DL-Hcy is a potential activator candidate that can enhance the activity of hCA I and hCA II isoenzymes.

Keywords: Activator, Carbonic anhydrase, Enzyme kinetics, Homocysteine, Inhibitor, Molecular modelling

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Homosistein, metiyoninin hücre içi demetilasyonu sırasında oluşan ve yapısında sülfidril grubu barındıran esansiyel olmayan bir amino asittir (1, 2). Kan plazmasında Hcy; yaklaşık %1 oranında serbest tiyol, %70–80 oranında başta albümin olmak üzere plazma proteinlerine disülfid bağlarıyla bağlı, geri kalan kısmı ise oksitlenerek dimerler veya sisteinle oluşturduğu karışık disülfid yapılar şeklinde bulunur (3). Fizyolojik koşullarda total Hcy (tHcy) düzeyi 3–15 μM aralığındadır; ancak genetik faktörler, diyet ve yaşam tarzı gibi değişkenler bu seviyelerde artışa yol açabilir. Plazmada Hcy'nin patolojik düzeyde birikimi, HHcy olarak adlandırılır ve şiddetine göre hafif (16–30 μM), orta (31–100 μM) ve şiddetli (>100 μM) olmak üzere sınıflandırılır (2, 4–6). Literatürde HHcy'nin kardiyovasküler hastalıklar, nöral tüp defektleri, Alzheimer hastalığı, kanser, multipl skleroz, osteoporoz, migren, epilepsi ve gelişimsel bozukluklar gibi çok sayıda hastalıkla ilişkili olduğu, hatta birçok hastalığın patogenezinde bir risk faktörü olarak rol oynadığı bildirilmektedir (2, 4, 7–10).

Karbonik anhidrazlar (CA'lar; EC 4.2.1.1), karbondioksitin bikarbonat ve protonlara dönüşümünü katalizleyen çinko içeren metaloenzimlerdir ve hem prokaryot hem de ökaryot canlılarda bulunurlar (11). Memelilerde α -sınıfına ait 16 farklı CA izoenzimi tanımlanmıştır; bunlar kinetik özellikleri, doku dağılımı ve hücrel lokalizasyon açısından farklılık gösterir (12). İnsan CA'ları; sitozolik, mitokondriyal, membrana bağlı ve sekrete edilen izoenzimler olarak dört grupta incelenir (13). İnsan CA I ve II, eritrositlerde yüksek oranda bulunan sitozolik izoenzimlerdir. Karbonik anhidraz I, CA II'ye göre daha düşük bir katalitik kapasiteye sahip olmasına rağmen eritrositlerde miktar olarak daha fazladır (13, 14). Karbonik anhidraz izoenzimleri; pH ve elektrolit dengesi, glukoneogenez, lipogenez, üre sentezi, kemik rezorpsiyonu, hücrel sinyal iletimi ve oksidatif stres yanıtı gibi çok sayıda fizyolojik sürecin düzenlenmesinde görev alır (14–16). Öte yandan, bu enzimlerin aktivitesinde görülen patolojik düzeydeki artış veya azalmalar; kanser, glokom, anemi, osteoporoz, renal tübüler asidoz ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli klinik tablolarla ilişkilendirilmiştir (16–20). Ayrıca, farklı dokularda çeşitli işlevlere sahip çok sayıda izoformun varlığı, bu enzimlerin inhibitör ve aktivatörlerinin terapötik potansiyellerini artırmaktadır (18).

Homosisteinin patolojik düzeyleri ile CA'ların fizyolojik ve patolojik işlevleri göz önüne alındığında, her iki faktörün de çeşitli hastalık süreçlerinde önemli rol oynadığı

görülmektedir. Özellikle HHcy ve CA aktivitesindeki bozuklukların birlikte gözlemlendiği bazı nörodejeneratif hastalıklarda bu durum daha belirgindir (21–23). Hücresel proteinlerin pH değişikliklerine duyarlı yapıları ve Hcy'nin sitoplazmik düzeylerde toksik birikim gösterebilmesi, Hcy'nin CA izoenzimleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasını bilimsel açıdan anlamlı kılmaktadır.

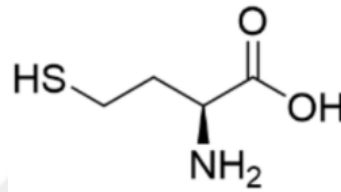
Literatürde, Hcy düzeylerindeki artış ile hCA izoenzimlerinin aktivitesindeki değişimlerin ayrı ayrı çok sayıda hastalığın patogeneğinde rol oynadığına dair bulgular mevcuttur. Ancak, bu iki biyolojik parametre arasındaki potansiyel etkileşimi doğrudan ele alan kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, Hcy'nin hCA I ve hCA II izoenzimlerinin aktivitesi üzerindeki etkilerini hem *in vitro* enzim kinetiği analizleri (esteraz ve hidrataz aktivite tayinleri) hem de moleküler kenetleme simülasyonları yoluyla kapsamlı biçimde değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Homosistein ve Yapısı

Homosistein, Met'in hücre içi demetilasyonu sırasında oluşan, yapısında sülfidril grubu içeren esansiyel olmayan bir amino asittir (Şekil 1) ve sisteinin bir homologudur (1, 2). İlk olarak 1932 yılında Nobel Kimya Ödülü sahibi Vincent du Vigneaud tarafından keşfedilen ve insanlarda tek karbon metabolizmasında önemli bir ara madde olan Hcy'nin bilinen tek kaynağı diyet proteini Met'tir (24, 25).



Şekil 1. Homosisteinin kimyasal yapısı (Song'dan, 26)

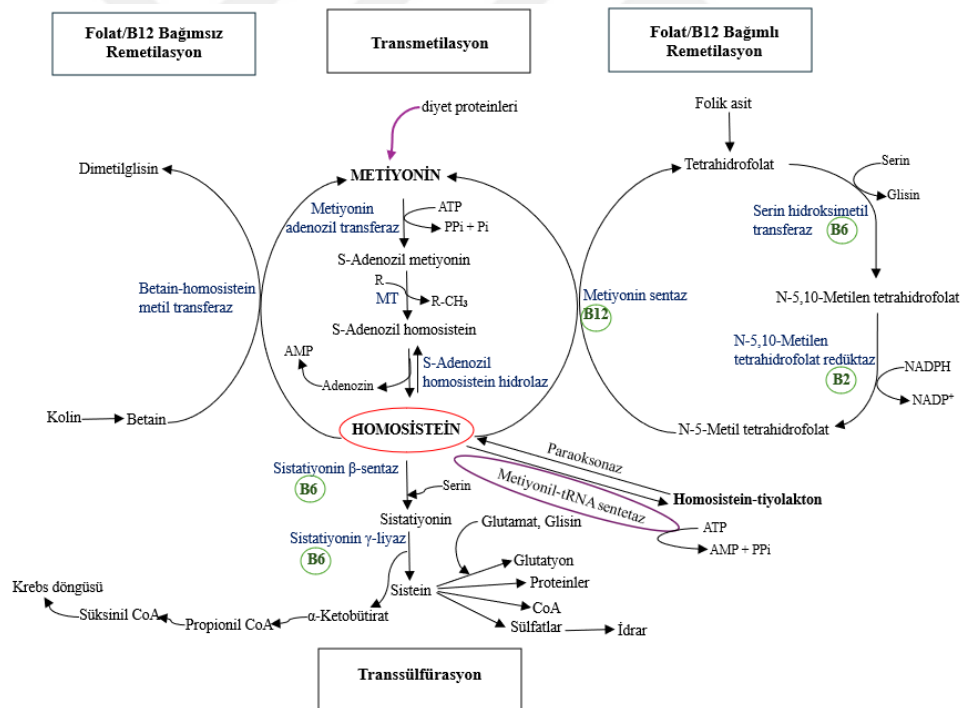
Homosistein kan plazmasında dört farklı formda bulunur (Şekil2): yaklaşık %1'i serbest tiyol, %70-80'i başta albümin olmak üzere plazma proteinlerine disülfid bağları ile bağlı, kalan kısmı ise oksitlenerek dimerler veya sisteinle birleşerek karışık disülfidler şeklinde bulunabilir (3).

İndirgenmiş (redükte)	
Homosistein	NH_3^+ $^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-SH}$
Yükseltgenmiş (Oksidize)	
Homosistin	NH_3^+ $^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S}$ $^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S}$ NH_3^+
Mikst disülfidler:	
Proteine bağlı homosistein	NH_3^+ $^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S}$ Protein -S
Sistinli homosistein	NH_3^+ $^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{-S}$ $^-\text{OOCCHCH}_2\text{-S}$ NH_3^+

Şekil 2. Total plazma homosistein komponentleri (Temel'den, 27)

2.1.1. Homosistein Metabolizması

Homosistein, vücutta Met'in sisteine metabolize edilmesi sırasında S-adenozil homosistein (SAH)'nin Hcy ve adenoine hidrolizi ile oluşan metabolik bir ara üründür. Oluşan Hcy, hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücrel homeostazın korunması gibi fizyolojik süreçlerde yer alır (3). Bununla birlikte, Hcy transmetilasyon yoluyla üretilir ve oluşan Hcy iki farklı yolla metabolize edilir (Şekil 3). Bu yollar remetilasyon ve transsülfürasyon yollarıdır (6). Bu yolların her ikisi de Met sentez döngüsünde folat (B9 vitamini), kobalamin (B12 vitamini) ve riboflavinin (B2 vitamini) yanı sıra transsülfürasyon yolu piridoksin (B6 vitamini) dahil olmak üzere kofaktörlere ihtiyaç duyar (28, 29). Bu yollar, metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) reaksiyonu için allosterik bir inhibitör olarak spesifik bir role sahip olan ve sistatyonin β -sentaz (CBS) aktivatörü olarak görev yapan S-adenozil metiyonin (SAM) tarafından koordine edilir (3).



Şekil 3. Homosistein metabolizması. ATP: adenozin trifosfat; AMP: adenozin monofosfat; PPi: pirofosfat; Pi: inorganik fosfat; CoA: koenzim A; R: alıcı; R-CH₃: metillenmiş ürün; MT: metiltransferazlar (Škovierová'dan, 9)

İlk olarak Met, transmetilasyon süreçleri için önemli bir metil donörü olan yüksek enerjili sülfonyum bileşiği SAM'ye dönüştürülür, reaksiyon metiyonin adenoziltransferaz (MAT) tarafından katalize edilir ve adenozil kısmı adenozin trifosfat (ATP) tarafından

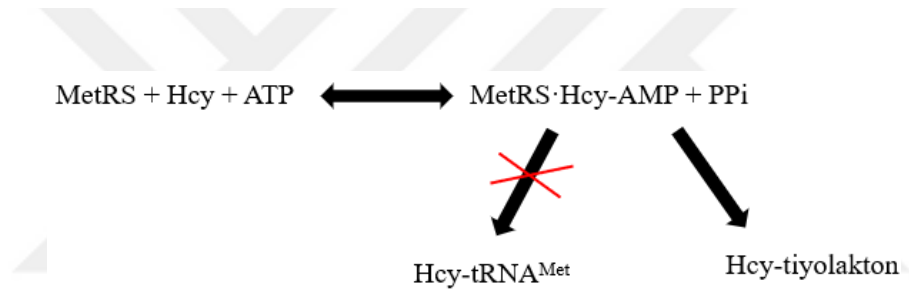
sağlanır (6). S-adenozil metiyonin, evrensel bir metil donörü olarak sadece farklı bileşiklerin (yani kreatin, epinefrin, karnitin, fosfolipidler, proteinler, nükleik asitler ve poliaminler) çeşitli hücrel biyosentezlerinde değil, aynı zamanda DNA metilasyonunun (nükleer ve mitokondriyal) düzenlenmesi, kromatin yeniden modelleme, RNA düzenleme, mikro RNA ve histonların post-translasyonel modifikasyonu gibi epigenetik modülasyonlarda da kullanılır. Bu süreç tek karbon metabolizması olarak bilinir (9, 28). Daha sonra SAM, SAH oluşturmak üzere demetillenir (6). S-adenozil homosistein çoğu SAM bağımlı metiltransferazın katalitik bölgesine SAM'ye eşit veya daha büyük bir afiniteye sahip olduğundan, SAH birçok metiltransferazın güçlü bir inhibitörüdür ve SAM/SAH oranı genellikle hücre içi metilasyon kapasitesi için bir gösterge olarak kullanılır. S-adenozil homosistein, memeli dokularında her yerde eksprese edilen SAH hidrolaz (SAHH) tarafından Hcy ve adenozeine dönüştürülür (29).

Yeterli Met varlığında oluşan Hcy, esas olarak karaciğer, böbrek, ince bağırsak ve pankreasta bulunan transsülfürasyon yolu ile geri dönüşümsüz olarak metabolize edilir (3, 29). İlk reaksiyon, Hcy ve serin arasındaki bir kondensasyondur ve CBS tarafından sistatyonin üretimine yol açar. Sistatyonin daha sonra sistatyonin γ -liyaz (CSE) tarafından sistein ve α -ketobütirata hidrolize edilir. Bu iki reaksiyon B6 vitaminine bağımlı enzimler (CSE ve CBS) tarafından katalize edilir (4). Homosisteinden transsülfürasyon yoluyla oluşan sistein son olarak sülfata oksitlenir ve idrarla atılır (6). Bununla birlikte protein sentezine ek olarak sistein, önemli bir hücrel antioksidan olan glutatyon sentezinde kullanılır (29).

Metiyonin eksikliği durumunda, Hcy Met oluşturmak üzere betain veya folat bağımlı yollar ile yeniden remetile olur (6). Folat bağımlı yolda vitamin B12 bağımlı enzim olan metiyonin sentaz (MS), N-5-metil tetra hidrofolattan Hcy'yi remetile etmek ve Met ve tetrahidrofolat (THF) üretmek için Hcy'ye bir metil grubunun dahil edilmesini katalize eder (4, 29). Tetrahidrofolat daha sonra serin hidroksimetil transferaz (SHMT) enzimi tarafından serin ve B6 vitamini varlığında 5,10-metilen tetrahidrofolat (5,10-MTHF)'ye dönüştürülür. 5,10-metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) tarafından indirgindikten sonra 5,10-MTHF, ikinci bir Hcy molekülünün remetilasyonu için kullanılabilecek olan 5-MTHF'ye dönüştürülür. 5,10-metilen tetrahidrofolat redüktaz, kofaktör olarak flavin adenin dinükleotid (FAD; B2 vitamininin aktif formu) kullanır. Folat bağımlı remetilasyon yolu neredeyse tüm hücrelerde mevcuttur (29). Betain bağımlı yolda

ise metil grubu donörü olarak betain kullanılır ve betain-homosistein metiltransferaz (BHMT) enzimi tarafından kolinden sentezlenir (9). Bu yolun ürünleri dimetilglisin (DMG) ve Met'tir. Bununla birlikte Hcy'nin BHMT'ye bağlı remetilasyonu öncelikle karaciğer, böbrek ve lenste gerçekleşir (9, 28).

Remetilasyon ve transsülfürasyon yollarına ek olarak, Hcy, homosistein-tiyolakton (HTL) oluşturmak için siklizasyona uğrayabilir ve bu tiyoester, Hcy'nin toksik ara maddesi olarak kabul edilir (30). Metiyonine yapısal benzerliği nedeniyle Hcy, metiyonil-tRNA sentetaz tarafından tanınabilir ve aktive edilebilir. Aktifleştirilmiş türev Hcy~AMP oluşturur ve daha sonra yan zincir-SH grubu ile Hcy'nin aktifleştirilmiş karbonil grubu arasındaki bir reaksiyonda molekül içi tiyoester bağı oluşumunu katalize ederek HTL'yi ortaya çıkarır (Şekil 4). Homosistein tRNA'ya aktarılmaz ve proteine dahil edilmez. Tüm organizmalar Hcy'yi HTL'ye dönüştürerek düzenler (4).



Şekil 4. Homosistein-tiyolakton oluşum mekanizması (Jakubowski'den, 25)

İnsan hücreleri ve serumda yapılan *in vitro* çalışmalar, HTL'nin iki reaksiyona girdiğini göstermiştir: Bunlar Hcy'nin bir lizin rezidüsü üzerindeki bir proteinin homosisteinilasyonu ve paraoksonaz 1 enzimi tarafından Hcy'ye enzimatik hidrolizdir (28). Bununla birlikte HTL molekülünün “protein N-homosisteinilasyonu” olarak adlandırılan bir süreçte enzimatik olmayan bir mekanizma proteinlere dahil edilmesinin, protein yapısında meydana gelen değişikliklere bağlı olarak protein fonksiyonlarının kaybına yol açtığına ve oksidasyon yoluyla daha fazla hasara duyarlı hale gelmesine neden olduğuna inanılmaktadır (25). Aynı zamanda Hcy, enzimlerin katalitik merkezleriyle etkileşerek (inhibitör veya aktivatör olarak) oksidatif stres indüksiyonu ve eksitotoksisite mekanizmaları ile de etki edebildiğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (2).

2.1.2. Plazma Homosistein Düzeyleri

Hücre içinde metabolize olmayan günlük toplam hücresel Hcy üretiminin yaklaşık %10'u plazmaya aktarılır. Normal koşullar altında, tHcy içeriği 3-5 ila 15 μM aralığındadır ve yaşlanmayla birlikte artar. Bununla birlikte Hcy düzeyleri genetik faktörler, diyet, yaşam tarzı, çeşitli ilaçlar vb. dahil olmak üzere farklı koşullardan etkilenerek artabilir. Ayrıca Hcy'yi metabolize eden enzimler CBS, MS, BHMT ve MTHFR'yi kodlayan genlerdeki mutasyonlar, Hcy'yi metabolize etme yeteneğinin bozulmasına neden olarak hücresel ve plazma Hcy seviyelerinin artmasına sebep olur. Plazmadaki yüksek Hcy düzeylerinin aralıkları hafif (16-30 μM), orta (31-100 μM) veya şiddetli (>100 μM) HHcy olarak sınıflandırılmaktadır (2, 4-6).

İnsan sağlığını etkileyebilecek bir faktör olarak Hcy'den ilk kez 1960'larda, Kuzey İrlanda'nın Belfast kentinden bir grup araştırmacının zekâ geriliği olan çocukların idrarında yüksek konsantrasyonlarda Hcy bulunmasıyla bahsedilmiştir. Bu çocukların aynı zamanda damarlarda trombüs geliştirme eğilimi gibi homosistinüri vakalarıyla birçok benzerlik gösterdiği fark edilmiştir. Damarlarda trombüs geliştirme eğilimi ilişkin araştırmalar, 1975 yılında McCully ve Wilson tarafından kandaki orta dereceli Hcy yüksekliğinin genel popülasyonda ateroskleroz için bir risk faktörü olabileceğini öne süren Hcy ateroskleroz teorisinin formüle edilmesiyle sonuçlanmıştır (30, 31). Bununla birlikte günümüze kadar yapılan çalışmalarla birlikte HHcy'nin kardiyovasküler hastalıklar (KVH), nöral tüp defektleri, atriyal fibrilasyon, Alzheimer hastalığı (AH), kanser, multipl skleroz, osteoporoz, migren, epilepsi ve gelişimsel bozukluklar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu ve birçok hastalığın gelişimi ve ilerlemesinde bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (2, 4, 7-10).

2.2. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, tüm canlı hücrelerde çeşitli biyolojik süreçlerdeki reaksiyonları katalize eden ve bir kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli aktivasyon enerjisini azaltan çoğunlukla protein yapılı biyolojik katalizörlerdir (32-34). Enzimlerin katalitik aktivitesi, devir hızı veya devir sayısı gibi çeşitli şekillerde adlandırılan bir sabit olan k_{cat} ile ifade edilir. Bu sabit, birim zamanda (genellikle dakika veya saniye başına) tek bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülebilen substrat moleküllerinin sayısını temsil eder. Örneğin; CA enzimi, substratları olan karbondioksit ve su molekülünü her saniyede yarım milyondan fazla ürünü olan bikarbonat iyonlarına dönüşümünü katalize edebilir (34).

Hemen hemen tüm enzimler proteinlerden oluşmasına rağmen, birçok enzimin katalitik aktivitesini gerçekleştirmek için kofaktör olarak bilinen protein olmayan bir bileşene ihtiyaç duyar. Bu kofaktör; Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} veya Zn^{2+} gibi inorganik bir iyon veya koenzim A gibi daha karmaşık bir organik molekül olan koenzim olabilir (35). Bir enzim aktivitesi için bir kofaktöre ihtiyaç duyduğunda, inaktif protein bileşeni apoenzim olarak adlandırılır ve apoenzim artı kofaktör holoenzim olarak adlandırılır. Ayrıca koenzim proteine sıkıca bağlandığında enzimin prostetik grubu olarak adlandırılır (34).

Enzimlerin aktif bölgesinde substratın bağlanmasını açıklamak için iki farklı model önerilmiştir. Emil Fischer tarafından önerilen anahtar-kilit modelinde, enzimin aktif bölgesi substratla tam olarak uyumludur. Buna karşılık Koshland tarafından oluşturulan indüklenmiş uyum modelinde, substratın bağlanması enzimin konformasyonunda bir değişiklik yaratarak ikisinin birbirine daha iyi uymasını sağlar. Michaelis-Menten'in teorisinde ise, ilk aşamada bir enzim-substrat kompleksinin kurulduğu ve ardından ikinci aşamada enzim ve ürünlerin serbest bırakıldığı iki katalitik reaksiyon aşaması önerilmiştir (36, 37).

2.2.1. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

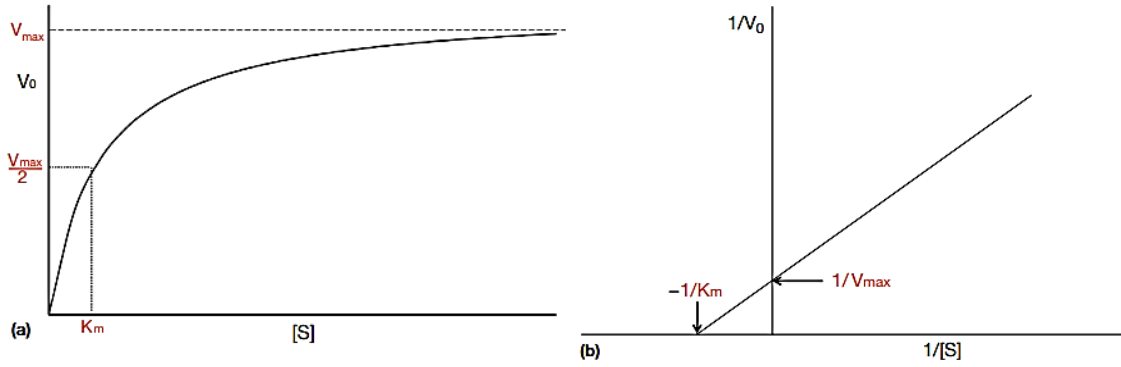
Enzimler tipik olarak katalize ettikleri reaksiyona atıfta bulunan -az son ekine, proteolitik enzimler ise genellikle -in son ekine sahiptir (34). 1950'lerin sonunda, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), enzimler için bir isimlendirme ihtiyacı olduğunu öngörmüştür. 1955'te IUBMB, enzimler için bir isimlendirme geliştirmekle görevli bir uluslararası komisyon kurulmasına karar vermiştir. 1961 yılında enzim sınıflandırması ve isimlendirme listesinin ilk versiyonunu yayınlanmıştır. Bu sınıflandırma, her katalitik reaksiyona (enzim grubu) enzim üyelerini belirtmek için enzim komisyonu (EC) adı verilen bir numaranın verildiği sayısal tabanlı bir sistemdir (36). Bu adlandırma, enzimlere aşağıdaki anlama gelen dört rakamlı bir kod atanmasına dayanır: (i) ilk rakam ana enzim sınıfını tanımlar; (ii) ikinci rakam alt sınıfı gösterir; (iii) üçüncü rakam alt-alt sınıfı belirtir ve (iv) dördüncü rakam alt-alt sınıfındaki enzimin seri numarasıdır. Katalizlenen reaksiyon türüne göre yapılan sınıflandırma ile altı enzim sınıfı tanımlanmıştır: oksidoredüktazlar (EC 1), transferazlar (EC 2), hidrolazlar (EC 3), liyazlar (EC 4), izomerazlar (EC 5) ve ligazlar (EC 6). Her ne kadar 1961 versiyonunda çeşitli revizyonlar yapılmış olsa da tanımlanan altı sınıfta herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Ancak, 2018'de yeni bir sınıf olan translokazlar eklenmiştir (33, 38).

Oksidoredüktazlar oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize ederken, transferazlar ise belirli bir fonksiyonel gruba (örneğin fosfat, açıl ve amino grupları) bir bileşikten diğerine transferini katalize eder. Hidrolaz enzimleri C-O, C-C ve C-N gibi hidrolitik bağların bölünmesini katalize eder. Bu enzim aynı zamanda su moleküllerini de transfer eder; yani substratın hidrolizi hidrolaz enzimleri tarafından katalize edilebilir. Liyazlar C-C, C-O, C-N ve C-S bağlarını hidroliz veya oksidasyon dışındaki yollarla parçalayan enzimler olarak tanımlanır. İzomerazlar, izomerizasyon reaksiyonlarını veya moleküller arası yeniden düzenlemeleri katalize eder. Ligazlar bir pirofosfat bağının hidrolizi ile iki molekül arasında C-O, C-N, C-S, C-C bağlarının oluşumunu katalize eder. Translokazlar, iyonların veya moleküllerin membranlar boyunca hareketini veya membranlar içinde ayrılmasını katalize eder (34, 38, 39).

2.2.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzim konsantrasyonu: Enzimatik reaksiyonun başlangıç hızı, enzimin farklı konsantrasyonlarında, doygun miktarda substrat varlığında ve reaksiyon ortamındaki diğer tüm koşullar sabit tutulduğunda belirlenir. Bu durumda, enzim miktarı ile reaksiyon hızı arasındaki ilişki kurulabilir. Enzim aktivitesi enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (40).

Substrat konsantrasyonu: Enzimler için, hız sadece düşük substrat konsantrasyonlarında substrat konsantrasyonu ile orantılıdır. Daha yüksek substrat konsantrasyonlarında yani enzim doymuş olduğu durumda maksimum hızına (V_{max}) ulaşır ve enzim, ne kadar çok substrat mevcut olursa olsun daha hızlı çalışamaz. Sonuçta substrat konsantrasyonu ve hız arasındaki ilişki hiperbolik bir eğri verir (Şekil 5). Michaelis sabiti (K_M), maksimum hızın yarısını veren substrat konsantrasyonudur. Bu, enzim konsantrasyonundan bağımsızdır. Michaelis sabiti ne kadar düşükse, substratın enzim için afinitesi o kadar yüksek ve reaksiyon o kadar hızlıdır (37).



Şekil 5. Michaelis–Menten kinetiği (a) Reaksiyonun başlangıç hızının (V_0) substrat konsantrasyonu ($[S]$) ile değişimi (b) Michaelis–Menten kinetiğinin Lineweaver–Burk grafiği (Talens-Perales’den, 35)

Sıcaklık: Sıcaklığın artırılması, enzimin termal kararlılığı denatürasyon ve inaktivasyon nedeniyle önemli ölçüde tehlikeye girmeden önce reaksiyonun aktivasyon enerjisini aşarak reaksiyon hızını artırabilir (41). Enzim aktivitesi sıcaklıkla artmasına rağmen, belirli bir enzimin katalitik aktivitesi için optimal sıcaklığa karşılık gelen bir maksimum değere ulaşılır. Bu sıcaklığın üzerinde enzim aktivitesi hızla düşer (40).

pH: Çoğu enzimin, katalizlenen reaksiyonun hızının maksimum olduğu bir optimum pH değeri vardır. Çoğu enzim için optimum pH aralığı 6 ile 8 arasındadır. İstisnalar dışında bu değerlerin altında veya üstünde reaksiyon hızı az ya da çok hızlı bir şekilde düşer. Bununla birlikte ortamdaki pH değişiklikleri, enzim molekülü ve substrat üzerindeki fonksiyonel grupların iyonlaşma durumunu etkiler. Optimumun üstünde veya altında aşırı pH değişiklikleri, enzimin denatürasyonuna ve ardından inaktivasyonuna neden olabilir (34, 40).

Diğer faktörler: Enzim aktivitesine etki eden diğer faktörler arasında çevresel faktörler, zaman, kofaktör, inhibitör ve aktivatör maddeler yer almaktadır (35, 37, 40).

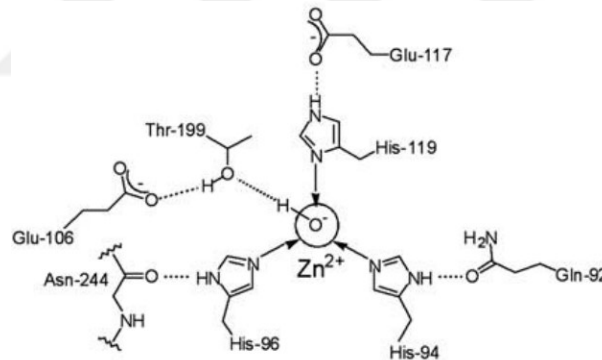
2.3. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidrazlar (CAs; EC 4.2.1.1), hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan, karbondioksitin bikarbonat ve hidrojen iyonlarına geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize eden metalloenzimlerdir (11). İlk kez 1933 yılında Meldrum N.U. ve Roughton F.J.W. tarafından keçi, öküz, tavşan, balina ve insan eritrositlerinden saflaştırılmıştır (42). Bir CA’nın aktif bölgesi çoğunlukla enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olan bir Zn^{+2} içerir ve yaklaşık 30 kDa (kiloDalton) molekül ağırlığına sahiptir. Farklı CA sınıfları çinko

yerine kadmiyum, demir veya kobalt gibi başka metal iyonlarını da içerebilir (43, 44). Bununla birlikte CA'lar α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -, θ - ve ι CA'lar olmak üzere sekiz farklı gen ailesi tarafından kodlanır. Bunların arasında hCA'lar α sınıfına aittir ve yapılarında 260 ile 459 arasında amino asit içermektedirler (11, 43, 45).

2.3.1. Karbonik Anhidrazların Yapısal ve Katalitik Özellikleri

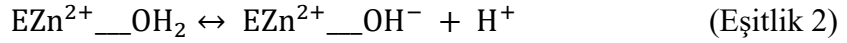
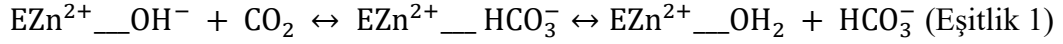
Karbonik anhidrazların aktif bölgesinde bulunan çinko His 94, His 96 ve His 119 rezidüleri ile bir su/hidroksit arasında tetrahedral bir geometriye sahiptir (Şekil 6). Karbonik anhidrazın aktif bölgesinin yer aldığı cep 15 Å çapındadır ve koni şeklindedir. Bu cep iki farklı bölge sahiptir; ilk yarısı yalnızca hidrofobik amino asitlerden, ikincisi yarısı ise yalnızca hidrofilik amino asitlerin bulunduğu bir bölgedir, bu da amfilik bir bölge yapısına yol açar (15, 46). İnsan CA'ların aktif bölgesinde buluna Zn^{2+} bağlı su/hidroksit, Thr199 ve Glu106 gibi çevredeki amino asitler ile hidrojen bağı oluşturur. Bu etkileşimler Zn^{2+} bağlı su molekülünün nükleofilikliğini artırır ve substratı (CO_2) nükleofilik saldırı için uygun bir konuma yönlendirir (47, 48).



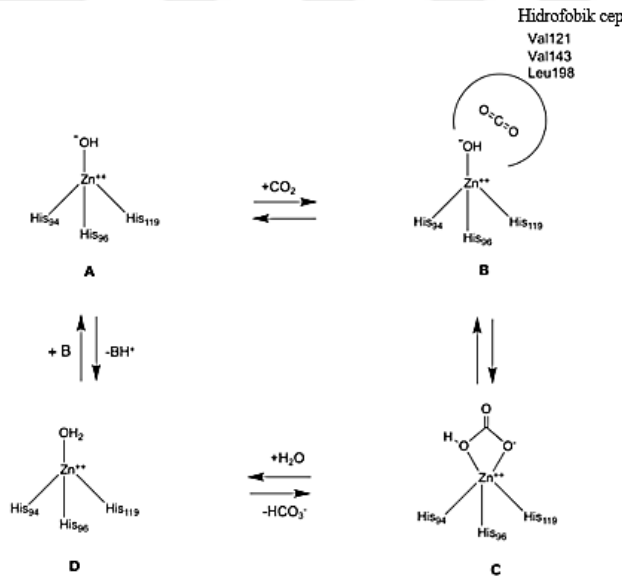
Şekil 6. Karbonik anhidraz II izoenziminin aktif bölgesinin şematik gösterimi (Fierke'den, 49)

Karbonik anhidrazlar, iki aşamalı bir katalitik mekanizma izleyerek karbondioksitin bikarbonat ve protona geri dönüşümlü hidrasyonunu ping-pong mekanizmasıyla katalize eder (Reaksiyon eşitlik 1 ve 2). İlk aşama, karbondioksitin Zn^{2+} bağlı bir hidroksit iyonuna nükleofilik saldırısını içerir ve bikarbonat oluşumuyla sonuçlanır. Bu daha sonra aktif bölgede bir su molekülü ile yer değiştirir. Hız sınırlayıcı olan ikinci aşama, katalitik olarak aktif Zn^{2+} bağlı hidroksit iyonunu, Zn^{2+} bağlı su molekülünden bir dış proton alıcısına veya bir aktif bölge rezidüsüne bir proton transfer reaksiyonu yoluyla yeniden oluşturur.

Enzimin doğal halinde bu reaksiyon, pK_a değeri 7 civarında olduğu için bir proton mekiği gibi davranan His64'ün (esas olarak hCA I, II, IV, V, VII ve IX'da) imidazol ve bazik kısmı sayesinde gerçekleşir (50, 51).



Enzimin inaktif formu, Zn^{2+} 'nin bir su molekülüne bağlı olduğu formdur (Şekil 7D). İlk adımda, su molekülü bir proton kaybederek enzimin hidroksillenmiş halini yani enzimin aktif formunu oluşturur (Şekil 7A). Hidroksit iyonu, yakındaki bir hidrofobik cepte bulunan karbondioksit (Şekil 7B) üzerinde güçlü bir nükleofil gibi davranarak Enzim-Zn- HCO_3^- kompleksini oluşturur (Şekil 7C). Daha sonra bikarbonat iyonu bir su molekülü aracılığıyla serbest bırakılır ve Enzim-Zn- H_2O kompleksi oluşur, bu da enzimin inaktif formunu yeniden oluşturur (Şekil 7D) ve katalitik döngü yeniden başlayabilir (51).



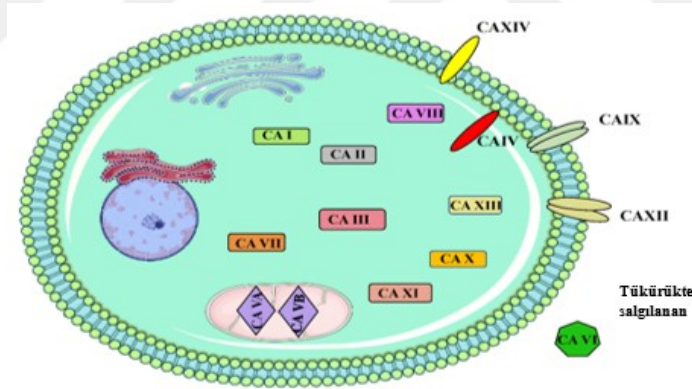
Şekil 7. Karbonik anhidrazların katalitik döngü mekanizması (Poggetti'den, 51)

2.3.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve Fizyolojik Fonksiyonları

Karbonik anhidrazlar, karbondioksitin geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize ederek pH ve elektrolit homeostazisi, glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi gibi biyosentetik reaksiyonlar, kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon, sinyal iletimi ve oksidatif strese karşı hücrel savunma, böbrekte su ve sodyum geri emilimi gibi birçok fizyolojik

süreçte yer alır (14-16). Ayrıca CA'ların motor koordinasyon, insülin salgısının düzenlenmesi ve tat algısı gibi işlevlerde de rolü vardır. Bununla birlikte sekiz farklı CA sınıfından α sınıfı, insan patolojisindeki rolü nedeniyle en fazla ilgiyi çekmiştir (43, 52).

Memelilerde bulunan α -CA'ların doku fonksiyonu, kinetik ve ekspresyon bakımından farklılık gösteren 16 izoformu belirlenmiştir (12). Bu izoformlardan CAXV izoenzimi insanlarda bulunmamaktadır (43). Bütün hCA'ları aktif bölgesinde üç histidin rezidüsü ve bir su molekülü/hidroksit iyonu ile koordine Zn^{2+} içeren α -CA'lardır ve lokalizasyonuna göre dört gruba ayrılırlar. Bunlar; sitozolik, mitokondriyal, salgısal ve membrana bağlı izoformlardır. Bu izoformlar moleküler özellikler, hücresel lokalizasyon, organ ve doku dağılımı, ekspresyon bölgeleri ve inhibitörlere duyarlılık bakımından farklılık göstermektedir (13, 47). Karbonik anhidraz I-III, CA VII ve CA XIII sitozolik, CA VA ve VB mitokondriyal, CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV membrana bağlı ve CA VI salgılanan bir izoenzimdir. Şekil 8'de izoenzimlerin hücre altı lokalizasyonu verilmiştir (53).



Şekil 8. Karbonik anhidrazların hücre altı lokalizasyonu (Singh'den, 53)

Karbonik anhidraz VIII, CAX ve CAXI izoenzimleri ise Zn^{2+} stabilizasyonunu sağlayan histidin rezidülerinin yapılarında bulunmaması nedeniyle katalitik olarak aktif değildir ve karbonik anhidraz ile ilişkili proteinler (CARP'ler) olarak da isimlendirilmektedirler (45).

2.3.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

Karbonik anhidrazlar fizyolojik fonksiyonlarının yanı sıra aktivitelerinin patolojik düzeylerde artması ya da azalması kanser, obezite, glokom, hemolitik anemi, renal tübüler

asidoz, osteoporoz ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çok sayıda patolojik süreçte rol oynamaktadır (16-20). Bununla birlikte birçok hücre, doku ve organda çeşitli lokalizasyon ve işlevlere sahip çok sayıda izoformun insanlarda mevcut olması, inhibitörlerinin ve aktivatörlerinin farmakolojik ve klinik uygulamalarının çokluğuna yol açmaktadır (18).

Karbonik anhidraz inhibitörleri (CAI) klinikte anti-glokom, diüretik, anti-tümör, anti-epileptik, anti-romatizmal ve hipoglisemik gibi terapötik potansiyeller göstermesinin yanında akut dağ hastalığı, idiyopatik intrakraniyal hipertansiyon ve son zamanlarda anti-tümör teranostik ajanlar olarak kullanılmaktadır. Diğer potansiyel uygulamalar arasında CAI'lar inflamatuvar koşullar, serebral iskemi, nöropatik ağrı veya Alzheimer/Parkinson hastalığı yönetiminde kullanımı yer almaktadır. Patojenik bakteriler, mantarlar, protozoanlar ve nematodlardan elde edilen CA'lar son yıllarda ilaç hedefi olarak değerlendirilmeye başlanmış ve kayda değer ilerlemeler kaydedilmiştir (17, 18).

Karbonik anhidraz inhibitörlerinin yanı sıra CA aktivatörlerinin (CAAs) geliştirilmesi yakın zamana kadar yeterince kullanılmamış bir araştırma alanı olarak kalmıştır ve farmakolojik uygulamalar göstermemiştir (51, 54). Bununla birlikte CA aktivasyonunun yaşlanan sıçan modellerinde gözlemlenen hafıza ve öğrenmeyi artırmaya yönelik faydalı etkileri, merkezi sinir sistemi (CNS) işlevselliğinin yaşla ilişkili bozulmasında beyin CA seviyelerinin azaldığı gözlemiyle birlikte, bu enzim ailesinin hem hastalık hem de normal nöronal işlevlerdeki önemi nedeniyle CA aktive edici ilaçların daha da geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir (54).

Sonuç olarak CA aktivatörlerinin modülatörleri olan aktivatörler veya inhibitörler kullanılarak bu enzimlerin aktivitesine müdahale edilmesi, aktivatörlerinin düzensiz olduğu durumların veya hastalıkların yönetimi için farmakolojik olarak kullanılabilecek önemli fizyolojik sonuçlara sahiptir (55).

2.3.4. Karbonik Anhidraz İnhibisyonu

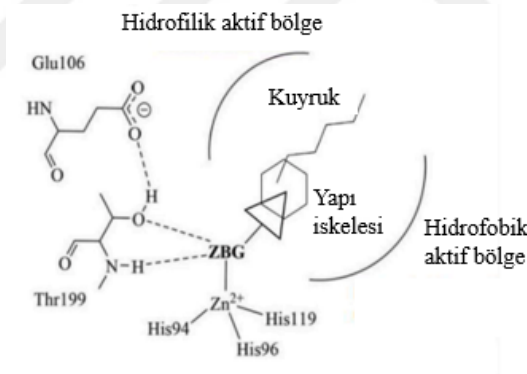
Günümüze kadar keşfedilen beş farklı CA inhibisyon mekanizması bulunmaktadır (56). Bu mekanizmalar:

1. Çinko iyonuna bağlanan inhibitörler (sülfonamidler ve onların izosterleri, ditiyokarbamatlar, karboksilatlar, hidroksilatlar)
2. Çinko iyonuna koordine su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanan inhibitörler (fenoller, poliaminler, esterler, sülfokumarinler, tiyoksokumarinler)

3. Aktif bölgenin girişini kapatan bileşikler (kumarinler ve onların izosterleri)
4. Aktif bölgenin dışına bağlanan bileşikler (2-(benzilsülfonil)-benzoik asit)
5. Bilinmeyen etki mekanizmasıyla inhibitör görevi gören bileşikler (ikincil ve üçüncül sülfonamidler, imatinib ve nilotinib)

2.3.4.1. Çinko İyonuna Bağlanan İnhibitörler

Çinko bağlayıcılar, metal iyonunu enzim aktif bölgesinden doğrudan koordine eden bir çinko bağlama grubu (ZBG)'ye sahiptir (Şekil 9). Sülfonamid, sülfamat ve sülfamid tipi klasik inhibitörlerin yanı sıra yakın zamanda keşfedilen ditiyo ve monotiyokarbamatlar, hidroksilatlar ve bazı karboksilatlar da bu tür bir inhibisyon mekanizması uygular (57). Bu ZBG içeren CAI'lar, su molekülünün veya hidroksit iyonunun yerine geçerek katalitik metal iyonuna tetrahedral veya trigonal bipiramidal geometride doğrudan koordine olurlar (47, 58, 59). Buna ek olarak, ZBG ayrıca Thr199 ve Glu106 ile de etkileşime girer. Thr199 rezidüsü yakındaki Glu106'nın karboksilat kısmına koordine olur ve bu da Thr199 hidroksil kısmının hidrojen bağlama kabiliyetini artırır (56, 59).



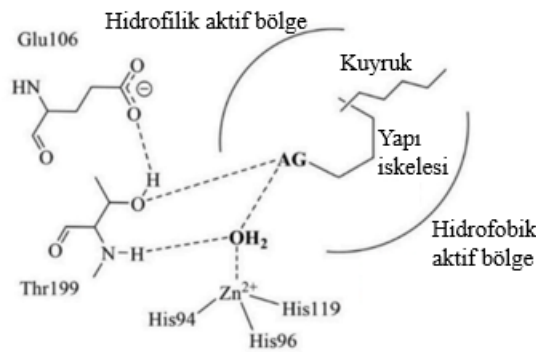
Şekil 9. Çinko iyonuna bağlanan CA inhibitörlerinin inhibisyon mekanizması (Nerella'dan, 47)

Bu inhibisyon mekanizmasını uygulayan sülfonamidler CAI'ların en önemli sınıfıdır ve bu türden en az 20 bileşik on yıllardır anti-glokom, diüretik, anti-epileptik ve anti-obezite ajanları olarak kullanılırken, bazıları anti-tümör ajanları olarak klinik çalışmalarda yer almaktadır. Bunların arasında CAIX inhibitörü olan ve şu anda ileri metastatik tümörlerin tedavisi için çalışmaları devam eden SLC-0111 yer almaktadır (56, 57, 60). Bununla birlikte sülfonamidler arasında asetazolamid, metazolamid, dorzolamid ve topiramid gibi birçok inhibitör bulunmaktadır. Ayrıca yaygın olarak reçete edilen

hidroklorotiyazid, furosemid ve bumetanid de bu sınıfta yer alır (56). Bu sınıf inhibitörlerin en büyük dezavantajı, omurgalılarda çok çeşitli CA'ları inhibe etmeleridir. Sonuç olarak, bu inhibitörleri kullanan terapötik tedavi baş ağrısı, mide bulantısı ve kilo kaybı gibi çeşitli yan etkilere çok yatkındır (13, 47).

2.3.4.2. Çinko İyonuna Koordine Su Molekülü/Hidroksit İyonuna bağlanan İnhibitörler

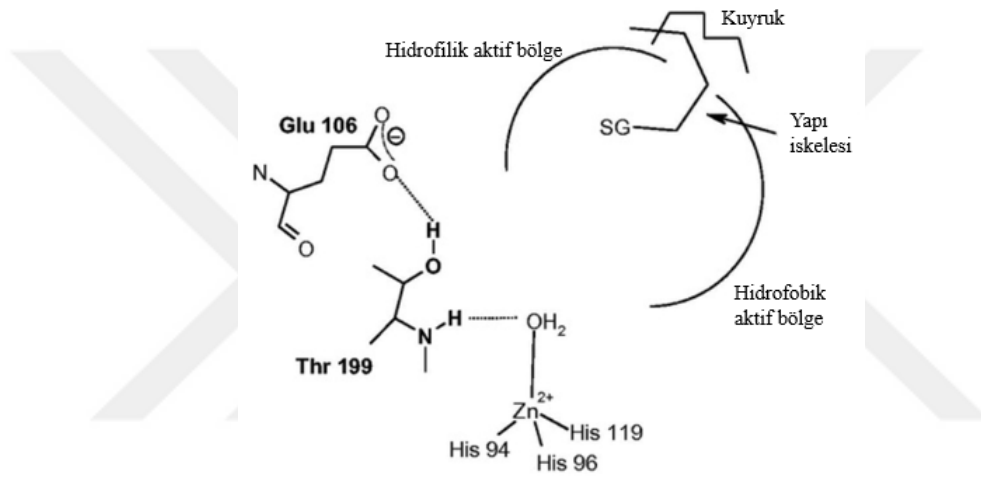
Sülfonamidlerden farklı bir inhibisyon mekanizması gösteren ilk CAI fenolken ikincisi ise poliamindir (56). Bu bileşik sınıfı bir bağlayıcı grup (AG) içerir ve bu da aktif bölgenin iki yarısı ile etkileşime girebilen bir kuyruk-yapı iskelesine bağlanır (Şekil 10). Bağlayıcı gruplar -OH (fenol), primer amin veya ester (COOR) olabilir ve yapı iskelesi aromatik, alifatik, heterosiklik olabilir. Bunların çoğu α - ve β -CA sınıflarına ait CA'lara karşı etkili inhibitör aktivite gösterir. Bu inhibitör sınıfına örnek olarak fenoller, poliaminler (örneğin spermin ve türevleri dahil spermidin), iyodür iyonu, hidrolize sülfokumarinler, birkaç karboksilat ve 2-tiyoksokumarin verilebilir. Fenollerin ve polifenollerin -OH grupları hidrojen bağı yoluyla CA aktif bölgesindeki su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanır ve hidrofobik fenil halkası enzim aktif bölgesinin hidrofobik kısmı ile van der Waals etkileşimi sergiler. Poliaminler de bir terminal amonyum grubu aracılığıyla hidrojen bağı yoluyla CA aktif bölgesindeki su/hidroksit iyonuna bağlanır (47, 56, 58).



Şekil 10. Çinko iyonuna koordine su molekülüne bağlanan bileşikler tarafından hCA inhibisyon mekanizması (Nerella'dan, 47)

2.3.4.3. Aktif Bölgenin Girişini Kapatan Bileşikler

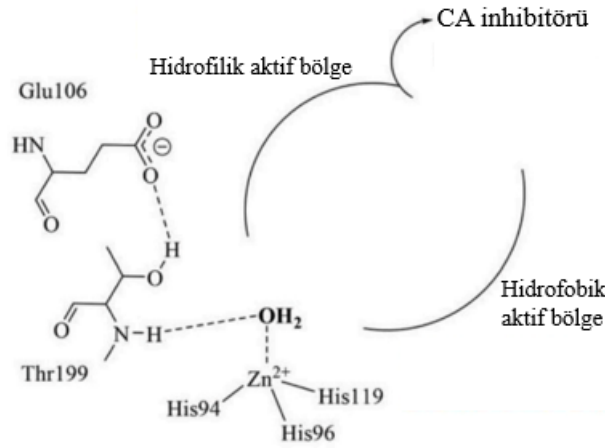
Aktif bölge girişinin kapanmasıyla hCA inhibisyonu gösteren en önemli bileşik sınıfı kumarin ve türevleridir. Diğer örnekler lakosamid, sübstitüe kumarinler, 5 ve 6 üyeli laktonlar ve tiyolaktonlar ve kinolinonlardır. Bu inhibitörler, çinko iyonuna bağlanan veya çinko koordineli su molekülüne bağlanan bileşiklere kıyasla aktif bölgede yer alan metal iyonundan daha da uzağa, temel olarak aktif bölge boşluğunun girişine bağlanır (Şekil 11). Bu inhibisyon mekanizması ile etki eden bileşikler aromatik, heterosiklik veya alifatik olabilen bir iskeleye bağlı yapışkan bir gruba (SG) sahiptir (47, 56).



Şekil 11. Karbonik anhidrazların aktif bölgeye girişini kapatarak inhibe eden bileşiklerin mekanizması (Supuran'dan, 56)

2.3.4.4. Aktif Bölgenin Dışına Bağlanan Bileşikler

İnsan CA inhibitör mekanizmasındaki hız belirleyici adım, çinko hidroksit türlerinin rejenerasyonu ile sonuçlanan çinko koordineli su molekülünden çevreye proton mekiğidir. His64, iki konformasyon (giriş ve çıkış konformasyonları) üstlenerek bu proton mekiği sürecinde rol oynar. Bununla birlikte Şekil 12'de verilen bu inhibisyon mekanizmasında yer alan 2-(benzensülfonil)-benzoik asit, His64 rezidüsünü bir hidrojen bağları ağı ile dış konformasyonunda bloke ederek inhibisyonu sağlar, bu da katalitik sürecin bu kilit adımını bozarak tüm katalitik döngünün çökmesine yol açar (47, 61).



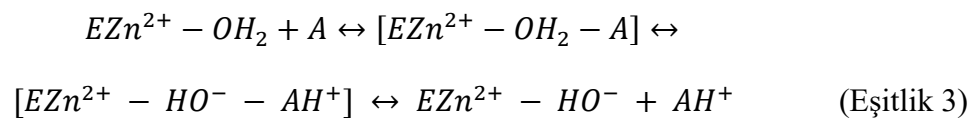
Şekil 12. Aktif bölgenin dışında CA inhibisyon mekanizması (Nerella'dan, 47)

2.3.4.5. İnhibisyon Mekanizması Bilinmeyen Bileşikler

Şimdiye kadar tartışılan inhibitör mekanizmaları, kinetik ve X-ışını kristalografisi çalışmaları aracılığıyla çok iyi aydınlatılmıştır. Bununla birlikte, son birkaç yılda, hCA inhibisyon mekanizması henüz bilinmeyen CA inhibisyonu sergileyen birkaç bileşik rapor edilmiştir. Bu tür bileşikler arasında bazı tersiyer sülfonamidler, probenesid amid türevleri ve imatinib veya nilotinib gibi kinaz inhibitörleri yer almaktadır. Bu bileşikler ile yapılan kinetik çalışmalar ilgili inhibitör aktiviteyi (fizyolojik önemi olan hCA'lara karşı) ortaya koymuştur, ancak bugüne kadar herhangi bir CA'ya bağlı bu tür inhibitörlerin X-ışını kristal yapıları mevcut değildir (18, 47).

2.3.5. Karbonik Anhidraz Aktivasyonu

Karbonik anhidraz aktivasyonuna dair 1940'lara kadar uzanan ilk kanıtlar uzun süre tartışmalı olarak kalmıştır. 1990'ların başında, yüksek oranda saflaştırılmış enzimlerin ve durdurulmuş-akış tekniği gibi hassas tekniklerin kombinasyonu, CAA'ların varlığını kanıtlayarak uzun süren tartışmalara son vermiştir (61). Karbonik anhidraz aktivatörleri biyojen aminler (histamin, serotonin ve katekolaminler), amino asitler, oligopeptidler veya küçük proteinlerdir. Karbonik anhidraz aktivatörleri için önerilen genel etki mekanizması eşitlik 3'te verilmiştir (57, 62).



Enzim-Aktivatör Kompleksi

Karbonik anhidraz aktivatörleri enzim, substrat ve aktivatörden oluşan üçlü bir kompleksin oluşumu yoluyla CA'ları rekabetçi olmayan bir şekilde aktive eder. X-ışını kristalografisi verileri, proton mekikleme rolü için temel olan His64'ün hCA II aktif bölgesinde çinko iyonundan uzakta iki farklı yönde bulunduğunu kanıtlamıştır. Bunlardan ilki His64'ün metal iyonuna doğru baktığı "in" konformasyonu olarak adlandırılırken, ikincisi His64'ün aktif bölgenin çıkışına doğru baktığı "out" konformasyonu olarak adlandırılmıştır. Bir CAA olan histamin ile ilgili X-ışını kristalografisi verileri, CAI'ların çinkoya bağlanırken, CAA'ların aktif bölge boşluğunun girişinde, metal iyonundan uzakta bağlandığını göstermiştir. Bununla birlikte metal iyonundan farklı bir bölgeye bağlanan aktivatör burada proton mekiklemesine yardımcı olur. Bu etki için CAA, Asn62, Asn67 ve Gln92 rezidülerinin yan zincirleri ile H-bağları oluşturur ve bu da aktif bölgedeki H-bağı ağının yeniden düzenlenmesine yol açar. Bu şekilde aktivatör, His64'e doğru ek bir proton mekiği olarak çalışarak katalitik döngünün hız sınırlayıcı adımına katılmaya hazır hale gelir (51, 61).

Günümüzde çeşitli hCA izoformlarına bağlı CAA'ların birkaç X-ışını kristal yapısı bulunmaktadır (58). Histamin- hCA II X-ışını kristalografisi bu türde yayınlanmış ilk çalışmadır (63). Daha sonra hCA II ve hCA I'e bağlı L- ve D-His, hCA II'ye bağlı L- ve D-Phe, D-Trp ve L-adrenalin gibi amin ve amino asit sınıflarına ait CAA'lar içeren diğer X-ışını kristal yapıları rapor edilmiştir (64). D-Triptofan dışındaki tüm aktivatörler CA'nın aktif bölgesindeki aktivatör bağlanma bölgesi A olarak adlandırılan bölgeye bağlanmaktadır. Bu bölge His64'ün konumlandığı bölgenin karşı tarafındadır ve bu konumda aktivatör amino asit rezidüleri ve H₂O molekülleri ile uygun etkileşimlere katılır. Tek istisna olan D-Trp ise aktivatör bağlanma bölgesi B olarak adlandırılan, diğer aktivatörlere kıyasla daha dış bir bağlanma bölgesine bağladığı gösterilmiştir (58, 64).

Son yıllarda CA I, II, IV, VA, XII ve XIV gibi çeşitli CA izoformlarının genetik eksiklikleri bildirilmiştir. Bunlardan bazıları osteopetroz, serebral kalsifikasyonlar, retina problemleri gibi ciddi durumlara yol açmaktadır. Bu hastalarda genellikle sadece bir izoformun genetik eksikliği mevcut olduğu gerçeği göz önüne alındığında, bu izoformların aktivatörleri kullanılarak tedavi edilebileceği düşünülmektedir (64).

Karbonik anhidraz aktivatörlerinin önemli uygulamalara sahip olabileceği alanlara Muller ve grubu tarafından araştırılan kemik mineralizasyon süreçleri de örnek verilebilir. Karbonik anhidraz IX ve XII aktivatörlerinin, kemik oluşum sürecinde kalsiyum fosfatın

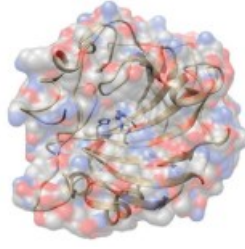
çökeltilmesi için kalsiyum karbonat oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmalar, yapay kemik parçaları elde etme imkânı ile doku mühendisliğinin önünü açmaktadır (65, 66). Bununla birlikte, şu an için CAA'lar bu durumların tedavisi için hiç kullanılmamıştır. Bunun nedeni olarak ise bu hastalıkların nadir ve karmaşık tıbbi problemler olması, klinik deneylerin bir son noktaya ulaşmadan önce çok pahalı ve zaman alıcı olduğu düşünülmektedir (64).

Sun ve Alkon tarafından yapılan ve CAA'ların önemini vurgulayan bir başka çalışmada ise araştırmacılar deney hayvanlarına D-Phe verilmesinin ardından sinaptik etkinlik, uzaysal öğrenme ve hafızada kayda değer bir farmakolojik iyileşme sağlandığını bildirerek, CAA'ların öğrenme ve hafızanın tehlikeye girdiği belirli durumları yönetmek için kullanılabileceğini göstermiştir (67, 68).

2.3.6. Karbonik Anhidraz I

Karbonik anhidraz, tanımlandığı ilk yıllarda CA B ve CA C olarak iki farklı izoform olarak belirtilmiştir. Daha sonraki yıllarda CA B ve CA C sırasıyla CA I ve CA II olarak yeniden adlandırılmıştır. Sitozolik ve vücut dokularında her yerde bulunan CA I, insan omuriliğindeki motor nöronlarda da ekspre edilir. Bununla birlikte eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan protein olan CA I, CA II aktivitesinin yalnızca yaklaşık %15'ine sahip olmasına rağmen insan eritrositlerinde CA II'den beş ila altı kat daha fazladır (16, 45, 69-71).

Karbonik anhidraz I izoenzimi, 1972 ve 1974 yılları arasında yapılan çalışmalar ile sekanslanmıştır. Enzim 260 rezidü içerir ve molekül ağırlığı yaklaşık olarak 30 kDa'dur (72, 73). Şekil 13'te CA I'in X-ışını kristalografisi ile belirlenen yapısı gösterilmektedir. Karbonik anhidraz I, solunum ve asit-baz homeostazının korunması için çok önemlidir; kandaki çözünmüş $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ havuzlarının homeostazına katkıda bulunur, beyinden ve metabolize edici dokulardan akciğerlere CO_2 taşınmasını kolaylaştırır. Ayrıca böbrek tübüllerinden H^+ atılması, böbreklerde HCO_3^- 'ün geri emiliminde rol oynar (14, 17).



Şekil 13. X-ışını kristalografisi ile belirlenen CA I yapısı (Mishra'dan, 12)

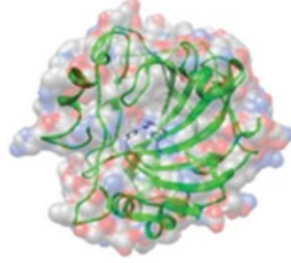
Karbonik anhidraz I'in kan dolaşımındaki konsantrasyonu normal koşullar altında tipik olarak düşüktür. Bununla birlikte, CA I seviyeleri belirli patolojik koşullar altında normal koşullara kıyasla yükselir (17). Karbonik anhidraz I retinal/serebral ödem, bipolar bozukluk, glokom ve anemi gibi hastalıklarla ilişkilidir (12, 74-76). Ayrıca yapılan bir çalışmada ankilozan spondilitli hastalarda CA I ekspresyonunun sinovyal membranda spesifik olarak arttığı ve CA I'in kalsiyum karbonat birikimini hızlandırarak eklem kalsifikasyonunu, kemikleşmeyi ve eklem füzyonunu teşvik edebileceği gösterilmiştir (77). Ayrıca Bio-Rad ve Fransa Ulusal Bilimsel Araştırma Merkezi (CNRS) tarafından diyabetik nefropati riskini ortadan kaldırmak amacıyla normoalbuminüri sergileyen diyabetli bireylerde CA I'i tanımlamak ve ölçmek için bir tanı kiti oluşturulmuş ve patenti alınmıştır (17). Bununla birlikte CA I'in bazı kanser türleri için bir biyobelirteç görevi görebileceği düşünülmektedir (16, 78).

2.3.7. Karbonik Anhidraz II

İnsan karbonik anhidraz II, bildirilen on altı hCA izoformu arasında en baskın fizyolojik izoformdur. Retina ve lens gibi gözün farklı anatomik ve hücrel bölgelerinde yüksek oranda bulunmasıyla birlikte beyinde, oligodendrositlerde ve koroid pleksus epitelinde bol miktarlarda bulunur. Bu izoform ayrıca böbrek, mide mukozası, osteoklastlar, eritrositler, iskelet kası, testisler, pankreas, akciğerler, tükürük bezleri, hepatositler vb. yerlerde de bulunur (14, 17).

Karbonik anhidraz II'nin ilk α CA kristal yapısı 1972 yılında Liljas ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir ve Eriksson ve arkadaşları tarafından daha da geliştirilmiştir (79). Şekil 14'te CA II'in X-ışını kristalografisi ile belirlenen yapısı gösterilmektedir. Karbonik anhidraz II, 259 rezidü içerir ve molekül ağırlığı 30 kDa'lık bir proteindir (80, 81). Enzimin aktif bölgesi hidrofobik (I91, V121, F131, V135, L141, V143, L198, P202, L204, V207 ve W209) ve hidrofilik (N62, H64, N67, Q92, T199 ve T200) rezidülerden oluşan iki

bölgeye sahiptir. Hidrofobik bölge substrat (CO_2) için bağlanma bölgesini içerirken, hidrofilik rezidüler proton transferi için gerekli olan yapıyı stabilize eder (82).



Şekil 14. X-ışını kristalografisi ile belirlenen CA II yapısı (Mishra'dan, 12)

1970'lerde ve 1980'lerde yapılan ilk çalışmalar CA II'nin memeli dokularında yaygın olarak ekspre edildiğini göstermiş ve önemli fizyolojik işlevlerine işaret etmiştir. Bu nedenle, CA araştırmalarının çoğu bu yüksek aktiviteli enzime odaklanmıştır (43). Karbondioksitin taşınması, atılımı ve değişimine ek olarak, hCAII hidrojen iyonlarının üretiminde, asit-baz homeostazının korunmasında, pH düzenlemesinde, metabolik asidozda ve bikarbonat iyonları bakımından zengin aköz humor salgısını üreterek gözün görmesinde rol oynar. Bununla birlikte hCA II özellikle osteoklast farklılaşması için kemiğin gelişimi ve işlevselliği için de gereklidir (17). Ayrıca CA II, glukoneogenez veya lipogenez gibi biyosentetik yollar için gerekli HCO_3^- üretmek üzere mitokondriyal ve hücre dışı CA'larla birlikte çalışarak hücrel metabolizmaya katkıda bulunabilir (83).

İnsan karbonik anhidraz II'deki genetik mutasyonların insan hastalıklarında rol oynadığı gösterilmiştir. Karbonik anhidraz II'deki genetik kusurlara ilişkin ilk rapor 1983 yılında Sly ve ark. tarafından yayınlanmıştır; renal tübüler asidoz, osteopetroz ve serebral kalsifikasyon ile karakterize otozomal resesif bir sendromdan etkilenen bir ailenin üç kardeşini rapor etmişlerdir. Hastalığın bildirilen diğer özellikler arasında gelişimsel gecikme, güçsüzlük, zeka geriliği, boy kısalığı ve ergenlik döneminde çoklu iskelet kırıkları yer alır (84, 85).

Ayrıca CA II bazı hastalıklar için (glokom, ödem, epilepsi ve irtifa hastalığı gibi) olası bir terapötik hedefi oluşturur (86). Bununla birlikte şimdiye kadar CA II, eritrosit hemolizi için bir biyobelirteç olarak kullanılmıştır; Case Western Reserve Üniversitesi'nden araştırmacılar, CAI ve CA II'yi ölçerek kan örneklerindeki hemolizi

tespit etmek için bir patent başvurusunda bulunmuştur (17). Karbonik anhidraz II ayrıca gastrointestinal stromal tümör (GIST)'ler için biyobelirteç olma potansiyeline sahiptir. GIST'lerin çoğu, önemli bir tanısal yardımcı olan güçlü KIT gen ekspresyonuna sahiptir. Bununla birlikte, GIST'nin KIT ekspresyonu göstermediği durumlarda, tanı için yeni bir biyobelirtece ihtiyaç duyulmaktadır. Çeşitli CA izoenzimleri farklı kanser türlerine karşı potansiyel tedavi hedefleri olarak tanımlandığından, Parkkila ve ark. 175 GIST'de CA II ekspresyonunu değerlendirmiş ve örneklerin %95'inin artmış CA II ekspresyonu sergilediğini bulmuştur. Çalışma ayrıca CA II'nin GIST hücre hatlarında belirgin bir şekilde eksprese edildiğini ve CAII immün reaktivite seviyesinin diğer mezenkimal tümör hücrelerinde ya düşük olduğunu ya da hiç olmadığını göstermiştir. Ayrıca, düşük veya ihmal edilebilir ekspresyon seviyeleri sergileyen proteinlerin aksine, yüksek CAII ekspresyon seviyeleri ile hastalığa özgü sağkalım oranlarında iyileşme arasında anlamlı bir korelasyon görülmüştür. Mevcut sonuçlar, CA II'nin GIST'lerin çoğunda aşırı eksprese edildiğini, mezenkimal tümörler arasında bu tümör tipi için oldukça seçici olduğunu ve bu nedenle tanıda yararlı bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir (87).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar, Ekipmanlar ve Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan cihaz, ekipman ve malzemelerin marka ve modelleri Tablo 1’de belirtilmiştir.

Tablo 1. Deneylerde kullanılan cihaz, ekipman ve malzemelerin marka ve modelleri

Cihaz, Ekipman ve Malzeme	Marka/Model
Saf su cihazı	Elga Purelab® Classic
Soğutucu dolap	Hotpoint Ariston NMTL 1928 FW
Hassas terazi	Mettler Toledo AB204-S
Karıştırıcı (Vorteks)	IKA Vorteks Genius 3
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	IKA RH BASIC 2
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Yarı-otomatik pipet (1-20 µL)	Eppendorf
Yarı-otomatik pipet (20-200 µL)	Eppendorf
Yarı-otomatik pipet (100-1000 µL)	Eppendorf
Yarı-otomatik pipet (1-5 mL)	Eppendorf
pH-metre	HANNA Instruments HI 2211 pH/ORP Meter
CO ₂ tüpü	
Mikroplate Okuyucu	VersaMax
Cam Deney Tüpleri	SH&GLASS

3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasalların isimleri, üretici firmaları ve ürün kodları Tablo 2’de belirtilmiştir.

Tablo 2. Deneylerde kullanılacak kimyasalların isim, üretici firmaları ve ürün kodları

Kullanılan Kimyasallar	Üretici Firmalar ve Ürün Kodları
İnsan eritrosit karbonik anhidraz I	Sigma-Aldrich, C4396-5 mg
İnsan eritrosit karbonik anhidraz II	Sigma-Aldrich, C6165-5 mg
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Sigma-Aldrich, T1503-1 kg
Hidroklorik asit	Carlo Erba, , 7647-01-0, % 37
<i>p</i> -Nitrofenil Asetat	Sigma-Aldrich, N8130-10 g
Asetazolamid	Sigma-Aldrich, A-6011
NaOH (Sodyum hidroksit)	Sigma-Aldrich, 415413
H ₂ SO ₄ (Sülfürik asit)	Sigma-Aldrich, 258105
HEPES (Sodium 2-(4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl) ethanesulfonate	BLDpharm- Cat. No. BD17232-100 g
Aseton	Sigma-Aldrich, 650501
DL-Homosistein	Sigma-Aldrich, H4628- 1 g
L-Histidin	Sigma-Aldrich, H8125-5 g

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Tez çalışmasında deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanış aşamaları aşağıda belirtilmektedir. Hazırlanan çözeltiler aksi belirtilmedikçe kullanılabilecek kadar +4 °C’de saklandı. Esteraz aktivitesi deneyleri oda sıcaklığında, hidrataz aktivitesi deneyleri ise buz soğukluğunda gerçekleştirildi. Çalışmada hazırlanan CA, DL-Hcy, AZM ve HIS çözeltileri hidrataz aktivitesi ölçümü için HEPES tamponunda, esteraz aktivitesi ölçümü için ise Tris-SO₄ tamponunda hazırlandı.

1 M NaOH: 4 g NaOH saf suda çözülerek son hacmi 100 mL’ye tamamlandı ve tampon çözeltilerin pH’larının ayarlanmasında kullanıldı.

1 M HCl: Yoğunluğu 1.18 g/mL olan %37’lik stok HCl’den 8.36 mL alınıp bir miktar saf suya eklendi, hacmi saf su ile 100 mL’ye tamamlandı ve tampon çözeltilerin pH’larının ayarlanmasında kullanıldı.

1 M H₂SO₄ çözeltisi: Yoğunluğu 1.84 g/mL olan %98’lik stok H₂SO₄’ten 2.72 mL alınıp bir miktar saf suya eklendi, hacmi saf su ile 50 mL’ye tamamlandı ve tampon çözeltilerin pH’larının ayarlanmasında kullanıldı.

0.05 M Tris-SO₄ (pH=7.4) tampon çözeltisi: 6.05 g tris (hidroksimetil)-aminometan 900 mL saf suda çözüldü, çözeltinin pH'sı 1 M H₂SO₄ ile 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı ve EAT ölçümlerinde tampon çözelti olarak kullanıldı.

3 mM *p*-Nitrofenil asetat (substrat): 135 mg *p*-Nitrofenil asetat 5 mL aseton ile çözüldü ve magnetik karıştırıcıda hızlıca karıştırılan 245 mL saf suya yavaşça damla damla ilave edilerek hazırlandı. EAT ölçümleri için substrat olarak kullanılan bu çözelti günlük olarak deneyden hemen önce hazırlandı.

25 mM HEPES çözeltisi (pH=8.9): 6.64 g HEPES 800 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 8.9'a ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı. HAT deneylerinde tampon olarak kullanılacak olan bu çözelti günlük olarak deneyden hemen önce hazırlandı.

hCA I çözeltisi: 34.48 µM (1000 mg/mL) stok hCA I çözeltisinden esterase aktivitesi için Tris-SO₄ tamponu ile hidrataz aktivitesi için HEPES tamponu ile seyreltilerek 20-500 nM konsantrasyona sahip hCA I enzim çözeltisi hazırlandı.

hCA II çözeltisi: 34.48 µM (1000 mg/mL) stok hCA II çözeltisinden esterase aktivitesi için Tris-SO₄ tamponu ile hidrataz aktivitesi için HEPES tamponu ile seyreltilerek 2-50 nM konsantrasyona sahip hCA II enzim çözeltisi hazırlandı.

Doygun CO₂ çözeltisi: 250 mL saf sudan (0°C'de) 40-45 dakika boyunca CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.

15 mM AZM çözeltisi: 6.7332 mg AZM 1 M NaOH ile çözüldükten sonra HEPES/Tris-SO₄ tamponu ile son hacmi 2 mL'ye tamamlandı. AZM ana stok çözeltisi kullanılarak reaksiyon ortamında son konsantrasyon 0-200 µM olacak şekilde AZM ara stok çözeltileri HEPES/Tris-SO₄ tamponu ile seyreltilerek günlük olarak hazırlandı.

15 mM HIS çözeltisi: 4.7256 mg histidin tartıldı, HEPES/Tris-SO₄ tamponunda çözüldü ve üzeri HEPES/Tris-SO₄ tamponu ile 2 mL'ye tamamlandı. Histidin ana stok çözeltisi kullanılarak reaksiyon ortamında son konsantrasyon 0-1000 µM olacak şekilde histidin ara stok çözeltileri HEPES/Tris-SO₄ tamponu ile seyreltilerek günlük olarak hazırlandı.

60 mM DL-Hcy çözeltisi: 17.076 mg Hcy tartıldı, HEPES/Tris-SO₄ tamponunda çözüldü ve üzeri Tris-SO₄ tamponu ile 2 mL'ye tamamlandı. Hcy ana stok çözeltisi

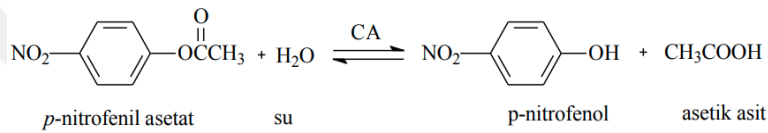
kullanılarak reaksiyon ortamında son konsantrasyon 0-4000 μM olacak şekilde Hcy ara stok çözeltileri HEPES/Tris- SO_4 tamponu ile seyreltilerek günlük olarak hazırlandı.

3.4. Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi Tayini

Çalışmada kullanılan ve elde edilen hacim ve konsantrasyonlar için kullanılan değerler reaksiyon ortamındaki nihai değerlerdir.

3.4.1. Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesi Tayini

Esteraz aktivitesi tayin yönteminin prensibi, CA enziminin ortamda bulunan ester bileşiklerini hidroliz etme yeteneğine dayanmaktadır. Şekil 15’de verilen reaksiyona göre, CA substrat olarak kullanılan *p*-Nitrofenil asetatı (*p*-NPA) 348 nm’de absorbands veren *p*-Nitrofenol’e ve asetik aside hidroliz etmektedir (88).



Şekil 15. *p*-Nitrofenil asetat’ın CA tarafından *p*-nitrofenol ve asetik aside dönüştürülme reaksiyonu

Esteraz aktivitesi tayini çalışmasında her bir ölçüm üç kez tekrarlanıp ortalama değerler alınarak Eşitlik 4’e göre enzim aktivitesi hesaplandı. Tüm deneyler sabit sıcaklıkta gerçekleştirildi.

$$EA \left(\frac{U}{L} \right) = \frac{\Delta A \cdot V \cdot 10^6}{\epsilon \cdot b \cdot x \cdot t \cdot x \cdot v} = \frac{\Delta A \cdot 300 \mu\text{L} \cdot 10^6}{5 \cdot 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1\text{cm} \cdot 3 \text{ dk} \cdot 20 \mu\text{L}}$$

$$= \Delta A \cdot 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{dk}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} = \Delta A \cdot 1000 / L \quad (\text{Eşitlik 4})$$

EA: Enzim aktivitesi (U/L)

ΔA =3 dakika sonundaki absorbands değişimi ($A_s - A_i$)

V=Toplam hacim (300 μL)

ϵ =Molar absorpsiyon katsayısı ($5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b=Işık yolu (1 cm)

t=zaman (3 dk)

v=Örnek hacmi (20 μL)

U=Ünite

3.4.1.1. Esteraz Aktivitesi Tayini Ölçümünde Kullanılan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan ticari olarak satın alınan hCA I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisini değerlendirmek ve esteraz aktivitesi ölçümü deneylerinde kullanılacak enzim konsantrasyonu aralığını belirlemek için oda sıcaklığında ve sabit substrat konsantrasyonunda reaksiyon karışımındaki son enzim konsantrasyonu hCA I için 0-500 nM, hCA II için 0-50 nM olacak şekilde esteraz aktivitesi tayini yapıldı.

Esteraz aktivitesi tayini çalışmasında, 96'lık mikro kuyucuklara 130 µL tampon (Tris-SO₄ tamponu (0.05 M; pH: 7.4); 20 µL enzim çözeltisi ve 150 µL substrat bileşiği (1.5 mM p-NPA) eklenmesinin hemen ardından, mikropate okuyucu kullanılarak 348 nm dalga boyunda 20 saniye aralıklarla 10 dakika boyunca kinetik okuma yapıldı. Çalışmada 2.40'ıncı dakikadaki absorbans değerleri birinci okuma ve 5.40'ıncı dakikadaki absorbans değerleri ikinci okuma olarak kullanıldı. Esteraz aktivitesi tayini deneylerinde kullanılan çözeltiler ve miktarları Tablo 3'te gösterilmiştir.

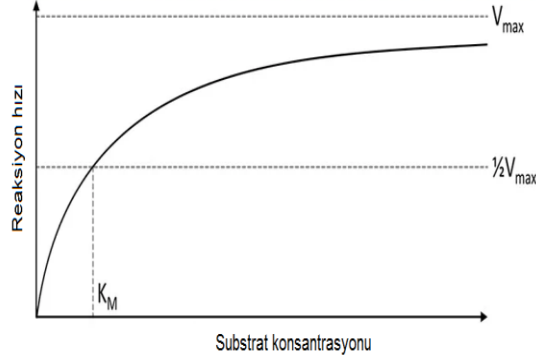
Tablo 3. Karbonik anhidraz esteraz aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kontrol	Numune
Tris-SO ₄ tamponu (0.05 M; pH: 7.4)	150 µL	130 µL
hCA I veya II Enzim Çözeltisi	-	20 µL
p-Nitrofenilasetat (1.5 mM)	150 µL	150 µL
UV spektrofotometre kullanılarak 348 nm dalga boyunda birinci okuma (2.40 dakika)		A _i
UV spektrofotometre kullanılarak 348 nm dalga boyunda ikinci okuma (5.40 dakika)		A _s

3.4.1.2. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

İnsan CA I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek ve kinetik sabitlerin (K_M ve V_{max}) saptanması amacı ile optimum şartlarda enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: 100 nM; hCA II: 15 nM) p-NPA için 0.05-1.5 mM arasında değişen on farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı ve esteraz aktivitesi değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümünde kullanılan çözelti miktarları ve p-NPA konsantrasyonları Tablo 4'te verilmiştir. Reaksiyon hızı-

substrat konsantrasyonu Michaelis-Menten grafiği çizilerek V_{max} ve K_M değerleri belirlendi (Şekil 16).



Şekil 16. Çalışmada, farklı başlangıç substrat konsantrasyonlarında ölçülen hız (aktivite) değerlerine dayanarak oluşturulan Michaelis-Menten grafiği örneği

Tablo 4. İnsan CA I ve II izoenzimlerinin kinetik sabitlerinin belirlenmesi için kullanılan çözelti miktarları ve konsantrasyonları

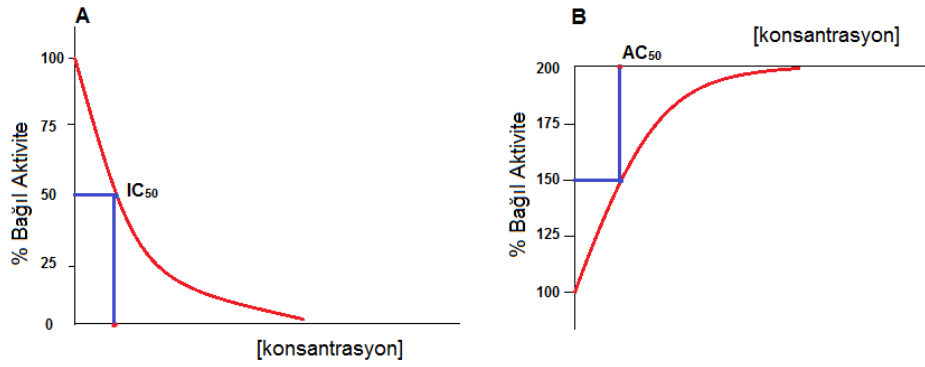
	hCA Enzim Çözeltisi	p-NPA	$[p\text{-NPA}]$ Konsantrasyon
1	20 μL	150 μL	1.5 mM
2	20 μL	150 μL	1.25 mM
3	20 μL	150 μL	1 mM
4	20 μL	150 μL	0.75 mM
5	20 μL	150 μL	0.625 mM
6	20 μL	150 μL	0.5 mM
7	20 μL	150 μL	0.375 mM
8	20 μL	150 μL	0.25 mM
9	20 μL	150 μL	0.125 mM
10	20 μL	150 μL	0.05 mM
Kontrol		150 μL	1.5mM

3.4.1.3. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerine Asetazolamid, L-Histidin ve DL-Homosisteinin Etkisinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerine DL-Hcy'nin etkisinin belirlenmesi için enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: 40 nM; hCA II: 6 nM) ve nihai (5 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 25 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 200 μM ; 250 μM ; 500 μM ; 1000 μM ; 2000 μM ; 3000 μM ve 4000 μM) DL-Hcy konsantrasyonları, deney

tüplerine Tablo 5’te belirtildiği hacimlerde pipetlemeler yapıldıktan sonra aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Her bir ölçüm üç kez tekrarlanıp ortalama değerler hesaplandı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak DL-Homosistein için DL-Hcy konsantrasyonu-% aktivite grafiği çizildi. Grafiklere ait eğim denklemi kullanılarak aktivitenin %50 arttığı Hcy konsantrasyonu AC_{50} değeri olarak belirlendi (Şekil 17B).

Aynı ölçümler enzim konsantrasyonları sabit tutularak (AZM için hCA I:100 nM; hCA II:15 nM, HIS için hCA I: 40 nM; hCA II: 6 nM) inhibitör etkisini doğrulamak için AZM ve aktivatör etkisini doğrulamak için ise HIS kullanılarak Tablo 5’te belirtilen hacimlerde pipetlemeler yapılarak tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak her ikisi içinde konsantrasyon-% aktivite grafikleri çizildi ve AZM için IC_{50} (Şekil 17A), HIS için AC_{50} (Şekil 17B) değerleri belirlendi.



Şekil 17. A) Enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisinin belirleneceği örnek grafik (IC_{50})
B) Enzim aktivitesi üzerine aktivatör etkisinin belirleneceği örnek grafik (AC_{50})

Tablo 5. İnsan CA I ve II izoenzimlerinin AZM, HIS ve DL-Hcy'nin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözelti miktarları ve konsantrasyonu

Tampon/Reaktifler		Tüpler ⁺														
		Kontrol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Son konsantrasyon (µM)	AZM [®]	0	0	0.1	1	5	10	40	80	120	160	200				
	HIS [#]	0	0	0.2	2	20	200	400	800	1000						
	Hcy [*]	0	0	5	10	20	25	50	100	200	250	500	1000	2000	3000	4000
Tris-SO ₄ tamponu (µL)		150	130	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110	110
hCA I veya II (µL)		-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Miktar (µL)	AZM	-	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	HIS	-	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Hcy	-	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
p-nitrofenil asetat (µL)		150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Toplam hacim (µL)		300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Absorbans ^α (2.40 dakika)		A _{i0}	A _{i1}	A _{i2}	A _{i3}	A _{i4}	A _{i5}	A _{i6}	A _{i7}	A _{i8}	A _{i9}	A _{i10}	A _{i11}	A _{i12}	A _{i13}	A _{i14}
Absorbans ^α (5.40 dakika)		A _{s0}	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	A ₁₀	A ₁₁	A ₁₂	A ₁₃	A ₁₄

© (Eldeeb vd., 2021); [#] (Parkes ve Coleman, 1989); ^{*} (Sharma vd., 2014)

⁺ Reaksiyon tüpleri substrat eklenmeden önce 15 dakika oda sıcaklığında tutulacaktır.

^a 348 nm dalga boyu; A_i: 0. dakika absorbansı; A_s: 3. dakika absorbansı.

3.4.2. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Tayini

İnsan CA hidrataz aktivitesi Wilbur-Anderson yöntemine göre ölçüldü. Bu yöntemin esası ortamda substrat olarak bulunan CO₂'nin hidrasyonu sonucu ortaya çıkan H⁺ iyonunun ortamın pH'sını 8.2'den 7.0'a düşürmesi için geçen sürenin ölçülmesine dayanmaktadır (89).

İnsan CA I ve II (insan eritrositlerinden saflaştırılmıştır; Sigma, St Louis, MO, ABD) tarafından katalize edilen CO₂ hidrasyon hızı, buz soğukluğunda pH'taki düşüş hızının gözlemlenmesiyle elektrometrik olarak belirlendi. Hidrataz aktivitesi tayini deneylerinde kullanılacak çözeltiler ve miktarları Tablo 6'da gösterilmiştir. Her bir ölçüm üç kez tekrarlanıp ortalama değerler hesaplandı. Karbondioksit kaçışını önlemek amacıyla reaksiyon tüpüne yerleştirilen pH elektrodunun üst kısmı kauçuk bir bilezikle çevrelendi. Katalizlenmemiş (enzimsiz) CO₂ hidrasyon değerleri, enzim katalizli olanlardan çıkarılarak körleme yapıldı.

Karbondioksit hidrataz aktivitesi birimi enzim ünitesi (EU), $EU=(t_0-t_c)/t_c$ denklemi kullanılarak hesaplandı. Bu formülde t_0 ve t_c , sırasıyla enzimatik olmayan (kontrol) ve enzimatik (numune) reaksiyonların pH değişim sürelerini temsil etmektedir.

Tablo 6. Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kontrol	Numune
HEPES Tamponu (son konsantrasyon 12.5 mM; pH: 8.8)	2500 μ L	2400 μ L
İnsan CA I veya II Enzim Çözeltilisi	-	100 μ L
Deiyonize Su (%100 CO ₂ gazı ile doyurulmuş)	2500 μ L	2500 μ L
pH'nın 8.2'den 7.0'a düşme süresi (saniye)	t_0	t_c

3.4.2.1. Hidrataz Aktivitesi Tayini Ölçümünde Kullanılan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan ticari olarak satın alınan hCA I ve II aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisini değerlendirmek ve hidrataz aktivitesi ölçümü deneylerinde kullanılacak enzim konsantrasyonu aralığını belirlemek için buz soğukluğunda ve 19 mM sabit substrat konsantrasyonunda (CO₂ ile doymuş saf su) reaksiyon karışımındaki nihai enzim konsantrasyonu hCA I için 0-500 nM, hCA II için 0-50 nM olacak şekilde hidrataz aktivitesi tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak çizilen aktivite-konsantrasyon grafiği Şekil 16'da sunulmaktadır.

3.4.2.2. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

İnsan CA I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek ve kinetik sabitlerin saptanması amacı ile optimum şartlarda enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: 100 nM; hCA II: 15 nM) %100 CO₂ ile doyurulmuş 2.5 mL buz soğukluğunda deiyonize su (CO₂: 11.4 mM; 13.3 mM; 15.2 mM; 17.1 mM; 19 mM) beş farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Substrat konsantrasyonu %100 CO₂ ile doyurulmuş buz soğukluğunda deiyonize suyun hacmi azaltılarak ayarlandı ve azaltılan miktar kadar deiyonize su ilave edilerek son substrat hacmi olan 2.5 mL hacim tamamlandı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak aktivite değerleri hesaplandı. Reaksiyon hızı-substrat konsantrasyonu Michaelis-Menten grafiği

izilerek V_{max} ve K_M değerleri belirlendi (Şekil 16). Bu değerler bize deney prosedürünün doğru çalıştığını gösterdi.

3.4.2.3. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Üzerine Asetazolamid, L-Histidin ve DL-Homosisteinin Etkisinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine DL-Hcy'nin etkisinin belirlenmesi için enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: 40 nM; hCA II: 6 nM) ve nihai (5 µM; 10 µM; 20 µM; 25 µM; 50 µM; 100 µM; 200 µM; 250 µM; 500 µM; 1000 µM; 2000 µM; 3000 µM ve 4000 µM) DL-Hcy konsantrasyonları, deney tüplerine Tablo 7'de belirtildiği hacimlerde pipetlemeler yapıldıktan sonra **3.4.2'de** belirtildiği gibi ölçüm ve hesaplamalar yapıldı. Her bir ölçüm üç kez tekrarlanıp ortalama değerler hesaplandı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak DL-Hcy için DL-Hcy konsantrasyonu - % aktivite grafiği çizildi. Grafiıklere ait eğim denklemi kullanılarak aktivitenin %50 arttığı Hcy konsantrasyonu AC_{50} değeri olarak belirlendi (Şekil 17B).

Aynı ölçümler enzim konsantrasyonları sabit tutularak (AZM için hCA I: 100 nM; hCA II: 15 nM, HIS için hCA I: 40 nM; hCA II: 6 nM) inhibitör etkisini doğrulamak için AZM ve aktivatör etkisini doğrulamak için ise HIS kullanılarak Tablo 7'de belirtilen hacimlerde pipetlemeler yapılarak tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar kullanılarak her ikisi içinde konsantrasyon-% aktivite grafikleri çizildi ve AZM için IC_{50} (Şekil 17A), HIS için AC_{50} (Şekil 17B) değerleri belirlendi.

Tablo 7. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine AZM, HIS ve DL-Hcy etkisinin tayini için reaksiyon karışımları

Tampon/Reaktifler		Tüpler ⁺														
		Kontrol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Son konsantrasyon (µM)	AZM [®]	0	0	0.1	1	5	10	40	80	120	160	200				
	HIS [#]	0	0	0.2	2	20	200	400	800							
	DL-Hcy*	0	0	5	10	20	25	50	100	200	250	500	1000	2000	3000	4000
HEPES tamponu (mL)		2.5	2.4	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
hCA I-II (µL)		-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Miktar (µL)	AZM	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	HIS	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	DL-Hcy	-	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
%100 CO ₂ (mL)		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Toplam hacim (mL)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Süre (saniye) ^α		t _{0k}	t _{c1}	t _{c2}	t _{c3}	t _{c4}	t _{c5}	t _{c6}	t _{c7}	t _{c8}	t _{c9}	t _{c10}	t _{c11}	t _{c12}	t _{c13}	t _{c14}

3.5. Moleküler Kenetleme Analizi

Karbonik anhidraz enzimlerinin kristal yapıları (CA I: 2foy, CA II: 2fou) Protein Data Bank'tan alındı (90, 91). DL-Homosistein (PubChem: 778) yapısı PubChem veritabanından elde edildi (92). Bağlanma simülasyonları AutoDock Vina (93) motorunu kullanan PyRx yazılımı (94) ile gerçekleştirildi. Grid kutusu protein aktif bölgesini kapsayacak şekilde 15 Å³ boyutlarında ayarlandı. Arama parametreleri exhaustiveness=8, enerji penceresi=3 kcal/mol ve konformasyon sayısı=9 olarak belirlendi.

3.5.1. Moleküler Dinamik Hesaplamalar

Protein-ligand sistemlerinin dinamik özellikleri GROMACS 2024.4 paketi (95) ile analiz edildi. Kompleksler Chimera (96) yazılımıyla oluşturuldu ve PDBFixer (97) ile yapısal optimizasyon gerçekleştirildi. Sistemde AMBER99SB-ILDN alan kuvvetleri (98) ve TIP3P su modeli (99) kullanıldı. DL-Homosistein molekülü için ACPYPE (100) aracılığıyla AM1-BCC yük dağılımı (101) ve GAFF parametreleri (102) hesaplandı.

Kompleksler rombik dodekahedron simülasyon kutusuna yerleştirilip 150 mM NaCl içeren fizyolojik ortamda modellendi. Sistem enerji minimizasyonundan sonra, 310 K'de 300 ps NVT (Berendsen termostatu) ve 1 bar basınçta 1 ns NPT (V-rescale termostat, Berendsen barostat) dengeleme aşamalarından geçirildi.

Üretim aşaması 100 ns süreyle ve 2 fs zaman adımıyla yürütüldü. V-rescale sıcaklık ve Parrinello-Rahman basınç kontrolörleri kullanıldı. Hidrojen içeren bağlar LINCS ile sabitlendi. Elektrostatik etkileşimler PME yöntemiyle (kesim=1.2 nm), van der Waals etkileşimleri ise 1.2 nm kesim ve 1.0 nm switch değerleriyle hesaplandı. Yapısal özellikler 100 ps aralıklarla kaydedildi.

Yörünge analizleri GROMACS yazılımı ile yapıp GraphPad Prism'de görselleştirildi.



4. BULGULAR

4.1. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Esteraz ve Hidrataz Aktivitesi Sonuçları

Çalışmada kullanılan ve elde edilen hacim ve konsantrasyonlar için kullanılan değerler reaksiyon ortamındaki nihai değerlerdir. Esteraz aktivitesi ölçümü deneyleri oda sıcaklığında, hidrataz aktivitesi ölçümü deneyleri ise buz soğukluğunda gerçekleştirildi.

4.1.1. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Enzim Konsantrasyonu Aralığının Belirlenmesi

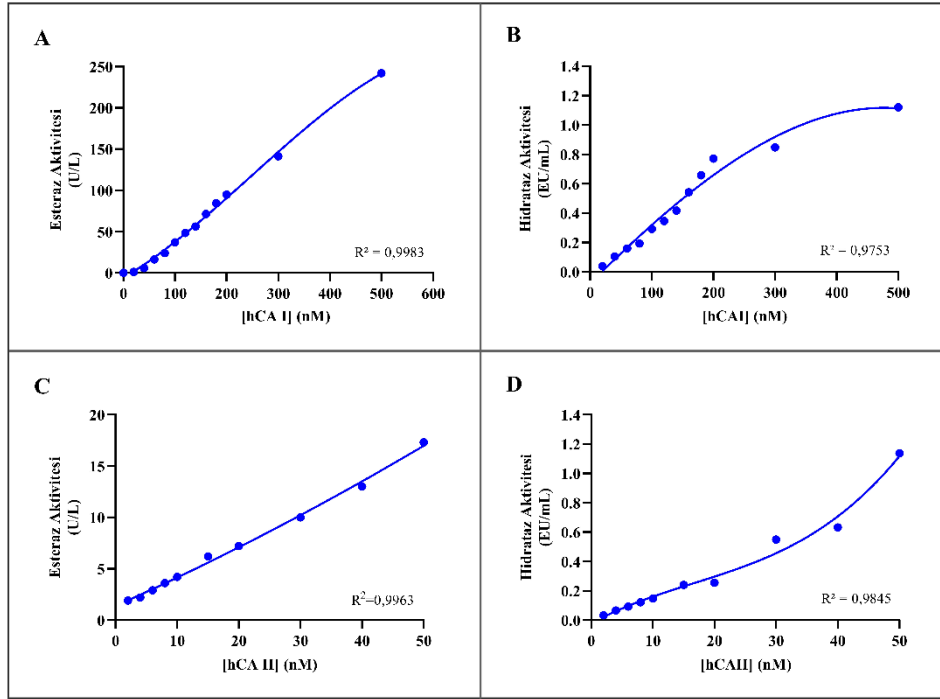
İnsan eritrositlerinden saflaştırılan ticari olarak satın alınan hCA I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisini değerlendirmek amacıyla esteraz ve hidrataz yöntemi kullanıldı. Esteraz aktivitesi ölçümü deneylerinde kullanılan enzim konsantrasyonu aralığını belirlemek için 1.5 mM substrat konsantrasyonunda (p-NPA) reaksiyon karışımındaki enzim konsantrasyonu hCA I için 0-500 nM, hCA II için 0-50 nM olacak şekilde esteraz aktivitesi tayini yapıldı. Hidrataz aktivitesi ölçümü deneylerinde kullanılacak enzim konsantrasyonu aralığını belirlemek için ise 19 mM substrat konsantrasyonunda (CO₂ ile doymuş saf su) reaksiyon karışımındaki enzim konsantrasyonu hCA I için 0-500 nM, hCA II için 0-50 nM olacak şekilde hidrataz aktivitesi tayini yapıldı. Elde edilen bulgular Tablo 8 ve 9'da, bu bulgular kullanılarak çizilen aktivite-konsantrasyon grafiği ise Şekil 18'de sunulmaktadır. Sonuçlar ve aktivite-konsantrasyon grafikleri incelendiğinde belirtilen şartlar altında yöntemin doğru çalıştığı ve hCA I için 0-500 nM, hCAII için 0-50 nM enzim konsantrasyonu aralığının uygun olacağı tespit edildi.

Tablo 8. Hidrataz ve esteraz aktivite ölçüm deneylerinde uygulanan hCA I izoenzimi konsantrasyonlarına karşılık elde edilen aktivite değerleri

Yöntem	Esteraz	Hidrataz
[CA I] (nM)	EA (U/L)	EA (EU/mL)
20	1.1	0.03
40	6	0.10
60	16.4	0.15
80	23.9	0.19
100	37.1	0.29
120	48.3	0.34
140	56.1	0.41
160	71.4	0.54
180	84.5	0.65
200	94.7	0.77
300	141.2	0.84
500	242	1.1

Tablo 9. Hidrataz ve esteraz aktivite ölçüm deneylerinde uygulanan hCA II izoenzimi konsantrasyonlarına karşılık elde edilen aktivite değerleri

Yöntem	Esteraz	Hidrataz
[CA II] (nM)	EA (U/L)	EA (EU/mL)
2	1.9	0.03
4	2.2	0.06
6	2.9	0.09
8	3.6	0.12
10	4.2	0.14
15	6.2	0.24
20	7.2	0.25
30	10	0.54
40	13	0.63
50	17.3	1.1



Şekil 18. İnsan CA I ve II izoenzimlerinin aktivite ölçümü deneylerinde kullanılan çalışma konsantrasyon aralığını belirlemek için çizilen konsantrasyon-aktivite grafiği (A) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü (B) hCA I'in hidrataz aktivitesi ölçümü (C) hCA II'nin esteraz aktivitesi ölçümü (D) hCA II'nin hidrataz aktivitesi ölçümü

4.1.2. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

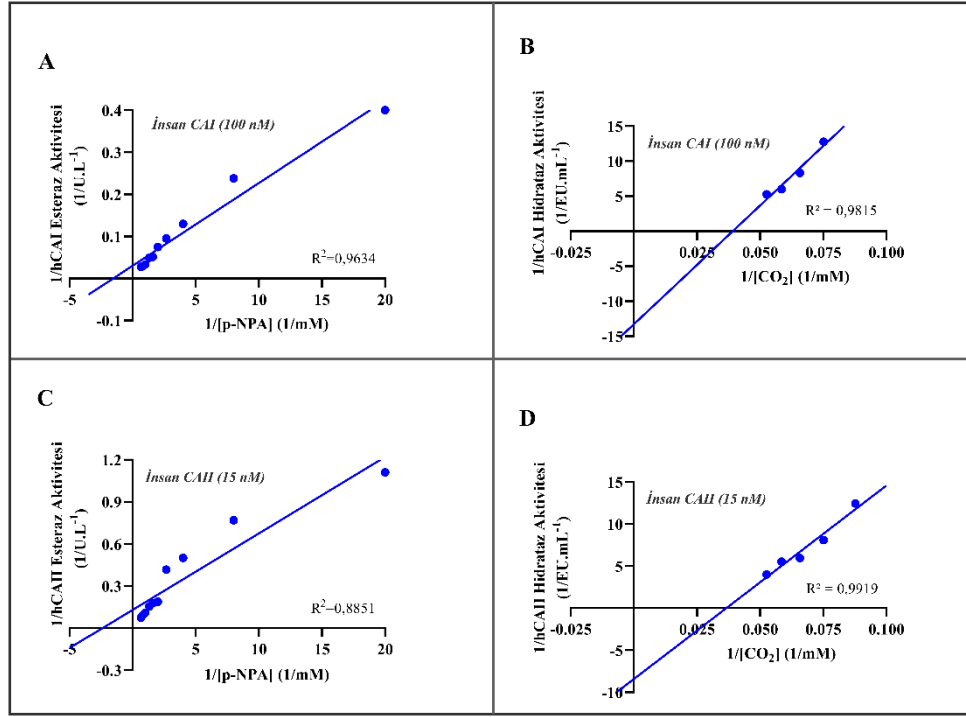
İnsan CA I ve II aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek için enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: 100 nM; hCA II: 15 nM) p-NPA için 0.05-1.5 mM arasında değişen on farklı substrat konsantrasyonunda reaksiyon karışımları hazırlandı ve esteraz aktivitesi belirlendi. Benzer şekilde enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: 100 nM; hCA II: 15 nM) CO₂ için 11.4-19 mM arasında değişen beş farklı substrat konsantrasyonunda reaksiyon karışımları hazırlandı ve hidrataz aktivitesi belirlendi. Elde edilen bulgular Tablo 10 ve 11'de, bu bulgular kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 19'da verilmiştir. Grafıklere ait eğim denklem kullanılarak V_{max} ve K_M değerleri hesaplandı (Tablo 12).

Tablo 10. *p*-Nitrofenil asetat substratının farklı konsantrasyonlarında hCA I ve hCA II izoenzimlerine ait esteraz aktivite değerleri

Enzim	hCA I	hCA II
[<i>p</i> -NPA] (mM)	EA (U/L)	EA(U/L)
0.05	2.5	0.9
0.125	4.2	1.3
0.25	7.7	2
0.375	10.5	2.4
0.5	13.4	5.3
0.625	19.5	5.6
0.75	20.2	6.5
1	30.3	9.1
1.25	34.6	11.1
1.5	36.2	13.5

Tablo 11. CO₂'nin farklı konsantrasyonlarında hCA I ve hCA II izoenzimlerine ait hidrataz aktivite değerleri

Enzim	hCA I	hCA II
[CO ₂] (mM)	EA (EU/mL)	EA (EU/mL)
11.4	0.02	0.08
13.3	0.07	0.12
15.2	0.12	0.16
17.1	0.16	0.18
19	0.19	0.24



Şekil 19. İnsan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek için kullanılan Lineweaver-Burk grafikleri (A) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü sonucu (B) hCA I'in hidrataz aktivitesi ölçümü sonucu (C) hCA II'nin esteraz aktivitesi ölçümü sonucu (D) hCA II'nin hidrataz aktivitesi ölçümü sonucu

Tablo 12. İnsan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için belirlenen V_{max} ve K_M değerleri

Yöntem	Esteraz		Hidrataz	
Enzim (nM)	hCA I (100)	hCA II (15)	hCA I (100)	hCA II (15)
V_{max}	32.25 U/L	29.4 U/L	0.204 EU/mL	0.259 EU/mL
K_M	0.64 mM	2.9 mM	27.59 mM	31.67 mM

4.1.3. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Asetazolamidin Etkisinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine AZM'nin etkisinin belirlenmesinde enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: 100 nM; hCA II: 15 nM) nihai (0,1 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 10 μ M; 40 μ M; 80 μ M; 120 μ M; 160 μ M ve 200 μ M) AZM konsantrasyonları kullanıldı ve aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular Tablo 13-15'te ve bu bulgular kullanılarak çizilen AZM konsantrasyonu-% Aktivite

grafikleri Şekil 20’de verilmiştir. Grafiklere ait eğim denklemi kullanılarak IC50 değerleri hesaplandı. İnhibitör yokluğunda CA aktivitesi %100 aktivite olarak belirlendi.

Tablo 13. Esteraz yöntemiyle AZM’nin farklı konsantrasyonları için hCA I ve II izoenzimlerinin % aktivite tablosu

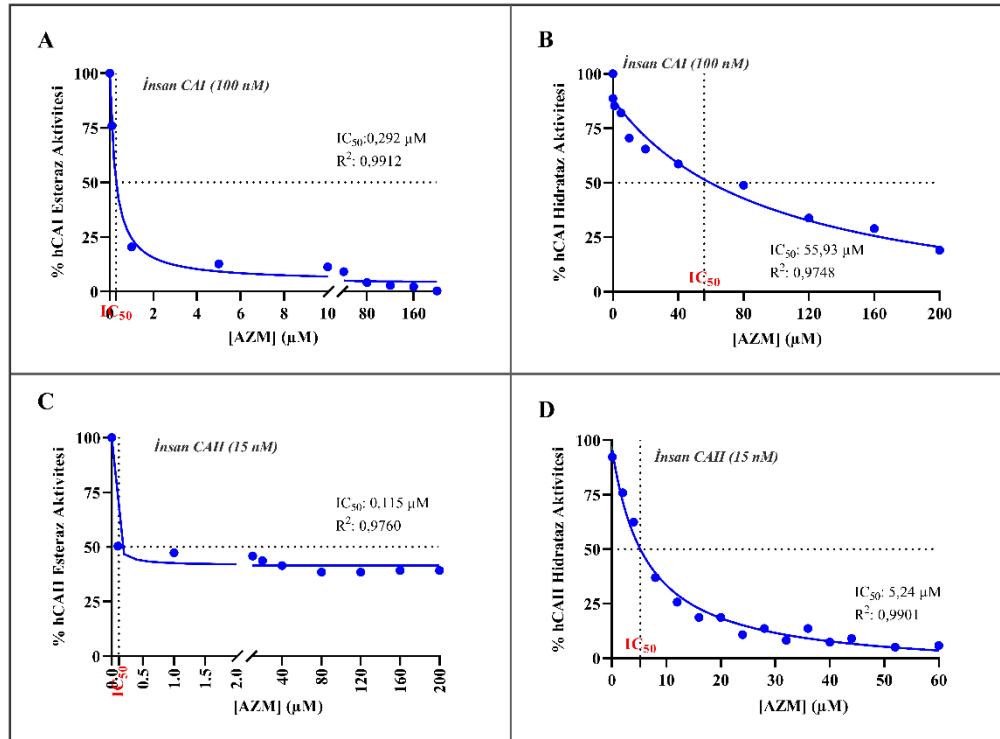
Enzim	hCA I		hCA II	
[AZM] (mM)	EA (U/L)	% Aktivite	EA (U/L)	% Aktivite
0	36.3	100	13.5	100
0.1	27.6	76	6.8	50
1	7.4	20	6.4	47
5	4.6	13	6.2	46
10	4.1	11	5.9	44
40	3.3	9	5.6	41
80	1.5	4	5.2	38
120	1	3	5.2	38
160	0.8	2	5.3	39
200			5.3	39

Tablo 14. Hidrataz yöntemiyle AZM’nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite tablosu

Enzim	hCA I	
[AZM] (mM)	EA (EU/mL)	% Aktivite
0	0.39	100
0.1	0.35	89
1	0.33	85
5	0.32	82
10	0.27	70
20	0.25	65
40	0.23	59
80	0.19	49
120	0.13	34
160	0.11	29
200	0.07	19

Tablo 15. Hidrataz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite tablosu

Enzim	hCA II	
[AZM] (μM)	EA (EU/mL)	% Aktivite
0	0.29	100
0.1	0.26	92
2	0.22	76
4	0.18	62
8	0.10	37
12	0.07	26
16	0.05	19
20	0.05	19
24	0.03	11
28	0.04	14
32	0.02	8
36	0.04	14
40	0.02	7
44	0.02	9
52	0.01	5
60	0.01	6



Şekil 20. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine AZM'nin etkisi (A) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü (B) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü (C) hCA II'nin esteraz aktivitesi ölçümü (D) hCA II'nin hidrataz aktivitesi ölçümü

4.1.4. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine L-Histidinin Etkisinin Belirlenmesi

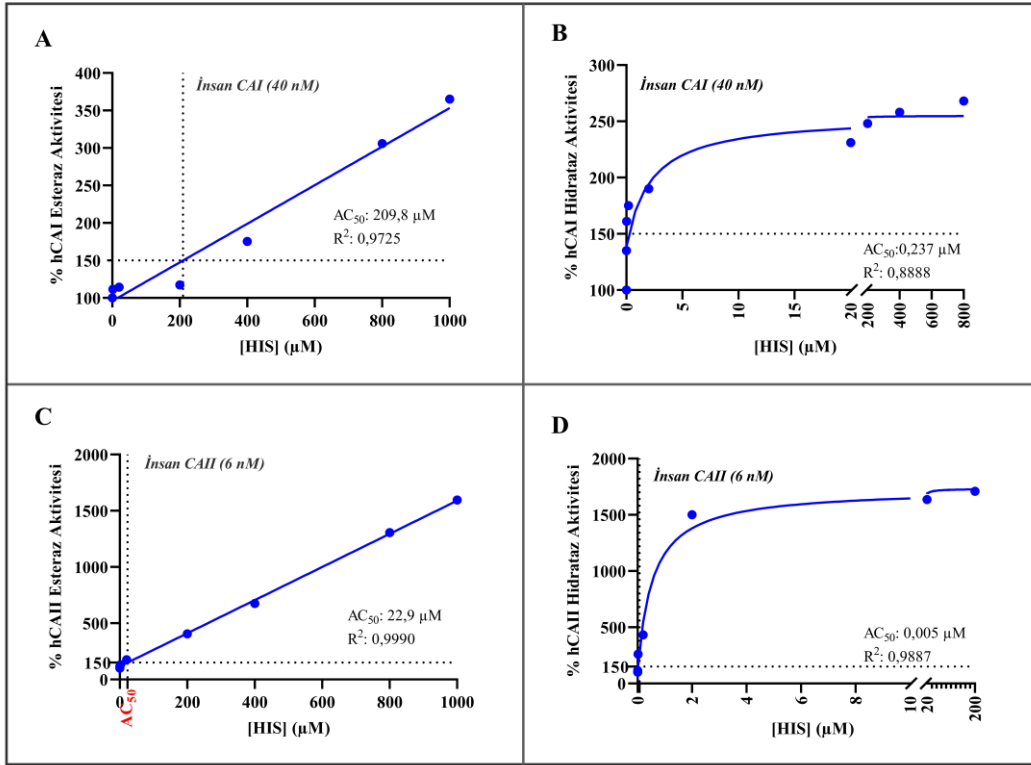
Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine HIS'nin etkisinin belirlenmesinde enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCAI: 40 nM; hCAII: 6 nM) nihai (0,2 μ M; 2 μ M; 20 μ M; 200 μ M; 400 μ M; 800 μ M ve 1000 μ M) HIS konsantrasyonları kullanıldı ve aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular Tablo 16 ve 17'de ve bu bulgular kullanılarak çizilen HIS konsantrasyonu-% aktivite grafiği Şekil 21'de verilmiştir. Grafiklere ait eğim denklemi kullanılarak AC_{50} değerleri hesaplandı. Aktivatör yokluğunda CA aktivitesi %100 aktivite olarak belirlendi.

Tablo 16. Esteraz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA I ve II izoenzimlerinin % aktivite tablosu

Enzim	hCA I		hCA II	
[HIS] (μ M)	EA (U/L)	% Aktivite	EA (U/L)	% Aktivite
0	6.9	100	2	100
0.2	7	101	2.3	115
2	7.7	111	2.6	130
20	7.9	114	3.5	175
200	8.1	117	8.1	405
400	12.1	175	13.5	675
800	21.1	306	26.1	1305
1000	25.2	365	31.9	1595

Tablo 17. Hidrataz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA I ve II izoenzimlerinin % aktivite tablosu

Enzim	hCA I		hCA II	
[HIS] (μ M)	EA (EU/mL)	% Aktivite	EA (EU/mL)	% Aktivite
0	0.05	100	0.02	100
0.002	0.06	135	0.02	114
0.02	0.08	161	0.05	260
0,2	0.09	175	0.09	433
2	0.09	190	0.32	1501
20	0.11	231	0.35	1635
200	0.12	249	0.37	1709
400	0.13	258		
800	0.13	268		



Şekil 21. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine HIS'nin etkisi (A) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü (B) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü (C) hCA II'nin esteraz aktivitesi ölçümü (D) hCA II'nin hidrataz aktivitesi ölçümü

4.1.5. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine DL-Homosisteinin Etkisinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine DL-Hcy'nin etkisinin belirlenmesinde enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: 40 nM; hCA II: 6 nM) nihai (5 μ M; 10 μ M; 20 μ M; 25 μ M; 50 μ M; 100 μ M; 200 μ M; 250 μ M; 500 μ M; 1000 μ M; 2000 μ M; 3000 μ M ve 4000 μ M) DL-Hcy konsantrasyonları kullanıldı ve aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular Tablo 18-21'de ve bu bulgular kullanılarak çizilen DL-Hcy konsantrasyonu-% Aktivite grafiği Şekil 22'de verilmiştir. Grafiklere ait eğim denklemi kullanılarak AC_{50} değerleri hesaplandı. DL-Homosistein yokluğunda CA aktivitesi %100 aktivite olarak belirlendi.

Tablo 18. Esteraz yöntemiyle DL-Hcy'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite tablosu

Enzim	hCA I	
[DL-Hcy] (μM)	EA (U/L)	% Aktivite
0	6.9	100
5	7.2	104
10	7.9	114
20	8.5	123
25	8.9	129
50	10.1	146
100	14.1	204
200	23.6	342
250	29.4	426
500	54.9	796
1000	104	1507
2000	193.3	2801
3000	270.3	3917
4000	333.8	4838

Tablo 19. Esteraz yöntemiyle DL-Hcy'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite tablosu

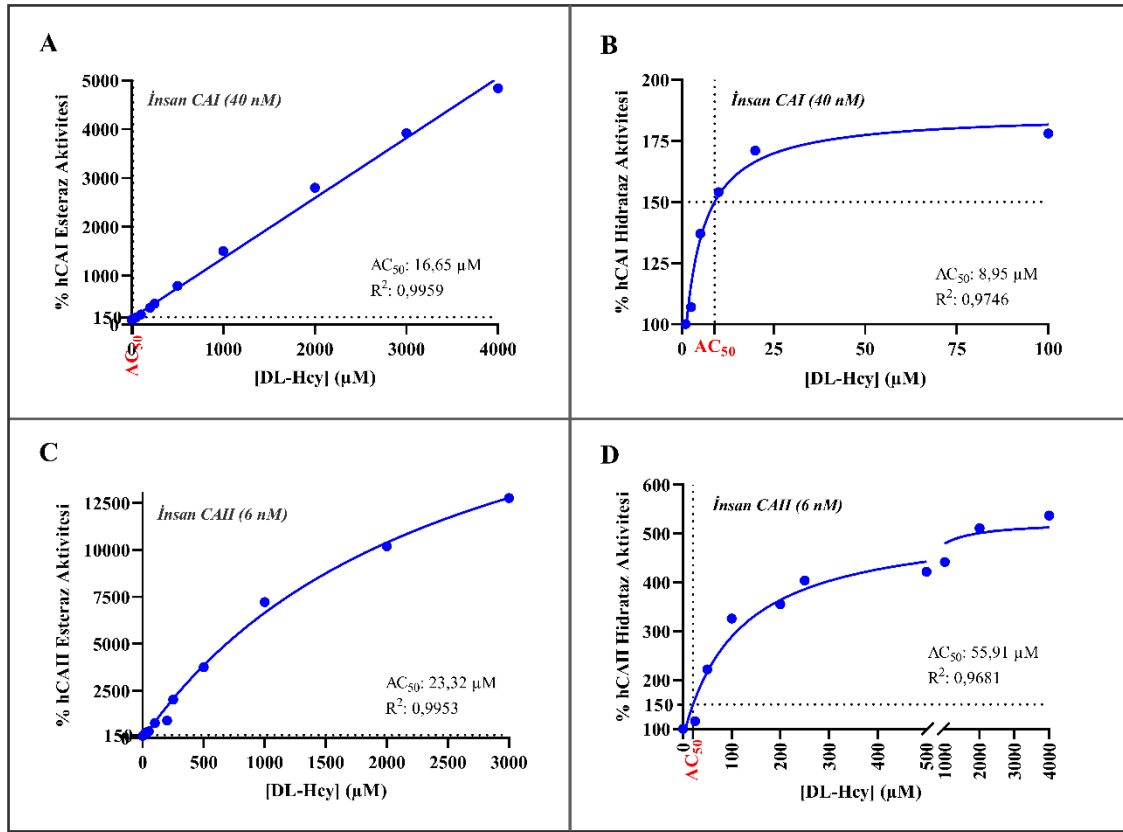
Enzim	hCA II	
[DL-Hcy] (μM)	EA (U/L)	% Aktivite
0	2.8	100
5	3.7	132
10	4.2	152
20	4.7	168
25	7.9	285
50	9.4	337
100	22.1	790
200	25.5	912
250	56.9	2034
500	105.1	3753
1000	202.1	7219
2000	285.4	10193
3000	357.2	12758

Tablo 20. Hidrataz yöntemiyle DL-Hcy'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite tablosu

Enzim	hCA I	
[DL-Hcy] (μM)	EA (EU/mL)	% Aktivite
0	0.32	100
2.5	0.35	107
5	0.44	137
10	0.5	154
20	0.5	171
100	0.6	178

Tablo 21. Hidrataz yöntemiyle DL-Hcy'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite tablosu

Enzim	hCA II	
[DL-Hcy] (μM)	EA (EU/mL)	% Aktivite
0	0.13	100
5	0.13	100
10	0.13	100
20	0.15	116
25	0.15	116
50	0.28	222
100	0.42	326
200	0.45	355
250	0.52	404
500	0.54	422
1000	0.57	442
2000	0.66	511
3000	0.66	511
4000	0.69	537



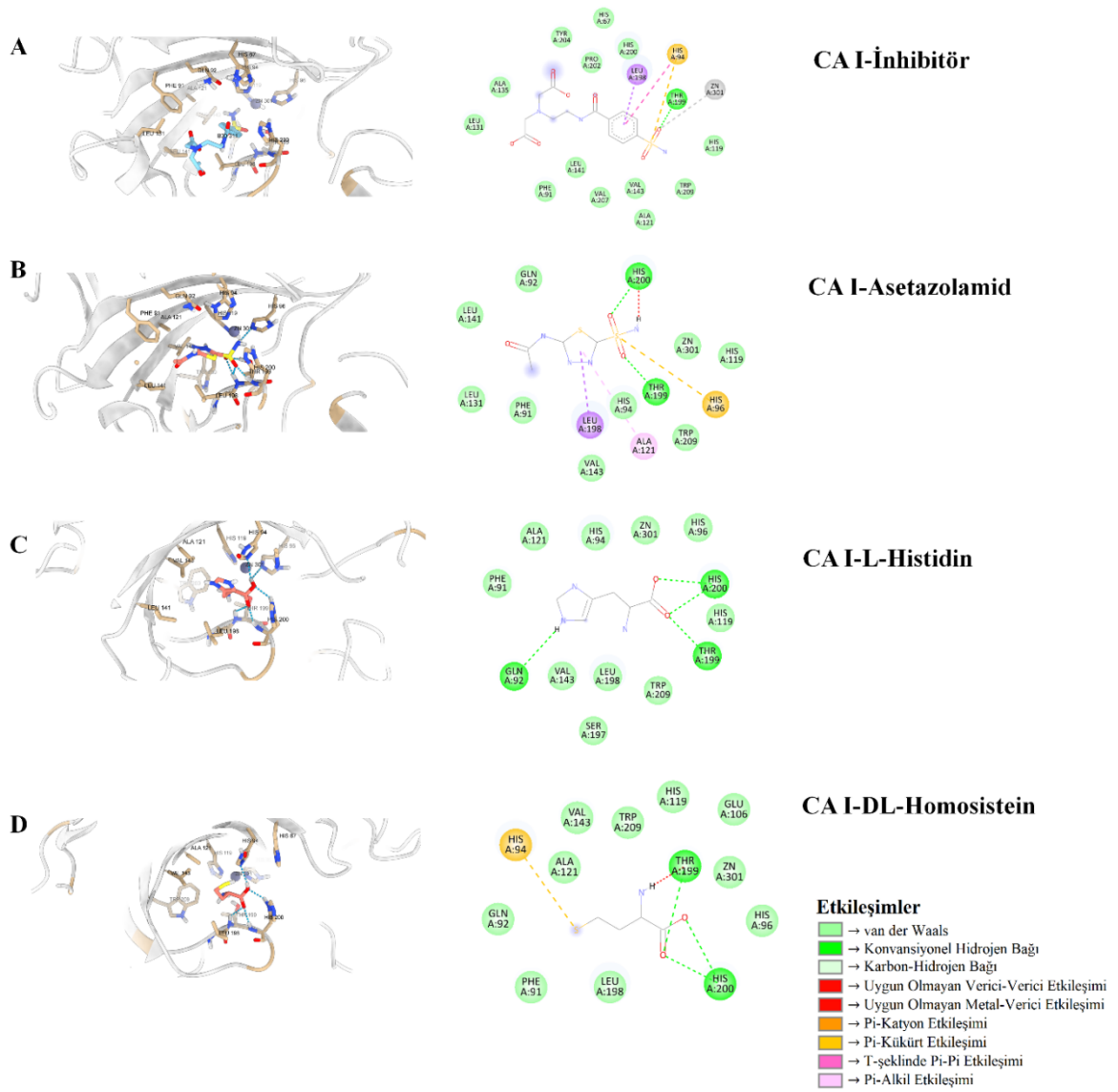
Şekil 22. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine DL-Hcy'nin etkisi (A) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü (B) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü (C) hCA II'nin esteraz aktivitesi ölçümü (D) hCA II'nin hidrataz aktivitesi ölçümü

4.2. Karbonik Anhidraz I İzoenziminin Asetazolamid, L-Histidin ve DL-Homosistein ile Moleküler Kenetleme Analiz Sonuçları

Asetazolamidin CA I (2FOY) ile en iyi bağlanma afinitesi -6.3 kcal/mol, bağlanma afinite aralığı -6.3 ile -4.6 kcal/mol ve ilk 3 en iyi poz; -6.3, -5.8, -5.8 kcal/mol olduğu görülmüştür (Şekil 23).

L-Histidinin CA I (2FOY) ile en iyi bağlanma afinitesi -5.8 kcal/mol, bağlanma afinite aralığı -5.8 ile -4.5 kcal/mol ve ilk 3 en iyi poz; -5.8, -5.3, -5.1 kcal/mol olduğu görülmüştür (Şekil 23).

Moleküler kenetleme çalışmalarında DL-Hcy, test edilen bileşikler arasında en düşük bağlanma afinitesini göstermiştir (Şekil 23). Karbonik anhidraz I için -4.7 kcal/mol bağlanma skoru değerleri, standart CA inhibitörlerinden (CA I: -7.4 kcal/mol, CA II: -9.0 kcal/mol) oldukça düşük bir bağlanma potansiyeline işaret etmektedir (Tablo 22).



Şekil 23. Karbonik anhidraz I izoenziminin inhibitör, asetazolamid, L-histidin ve DL-homosistein ile etkileşimlerine ait 3D ve 2D görüntüleri A) CA I-inhibitör B) CA I-Asetazolamid C) CA I-L-Histidin D) CA I-DL-Homosistein

Tablo 22. Karbonik anhidraz I ve II için moleküler kenetleme analizi ile belirlenen inhibitör ligandın ve DL-Hcy'nin bağlanma skorları

Ligand	Bağlanma Skoru (kcal/mol)	
	CAI (2FOY)	CAII (2FOU)
CA inhibitör*	-7.4	-9.0
DL-Hcy	-4.7	-4.4

Değerler, moleküler docking simülasyonları ile hesaplanan en yüksek bağlanma afinite skorlarını göstermektedir. Daha negatif değerler, daha güçlü bağlanma afinitesini gösterir. *her protein için kendi XRAY yapısı içindeki inhibitör tercih edilmiştir.

4.3. Karbonik Anhidraz II İzoenziminin Asetazolamid, L-Histidin ve DL-Homosistein ile Moleküler Kenetleme Analiz Sonuçları

Asetazolamidin CA II (2FOU) ile en iyi bağlanma afinitesi -6.8 kcal/mol; bağlanma afinite aralığı -6.8 ile -4.8 kcal/mol ve ilk 3 en iyi poz -6.8, -5.9, -5.8 kcal/mol olduğu görülmüştür (Şekil 24). Elde edilen sonuçlarda AZM zayıf-orta düzeyde bağlanma afinitesi göstermektedir (-6.8 kcal/mol zayıf bir bağlanma değeri). Karbonik anhidraz II'ye CA I'e göre biraz daha güçlü bağlanmaktadır, ancak bu fark önemli düzeyde değildir. Genel olarak bağlanma değerleri optimal etkileşim için yetersiz olduğu görülmüştür.

L-Histidinin CA II (2FOU) ile en iyi bağlanma afinitesi -5.4 kcal/mol, bağlanma afinite aralığı -5.4 ile -4.4 kcal/mol ve ilk 3 en iyi poz; -5.4, -5.4, -5.2 kcal/mol olduğu görülmüştür (Şekil 24). Elde edilen sonuçlarda HIS, her iki enzimle de oldukça zayıf bağlanma afinitesi göstermektedir. Bağlanma değerlerinin (-5.4 ile -5.8 kcal/mol) etkili bir etkileşim için çok düşük olduğu görülmüştür. Her iki enzimle de benzer düzeyde zayıf etkileşim sergilemiştir.

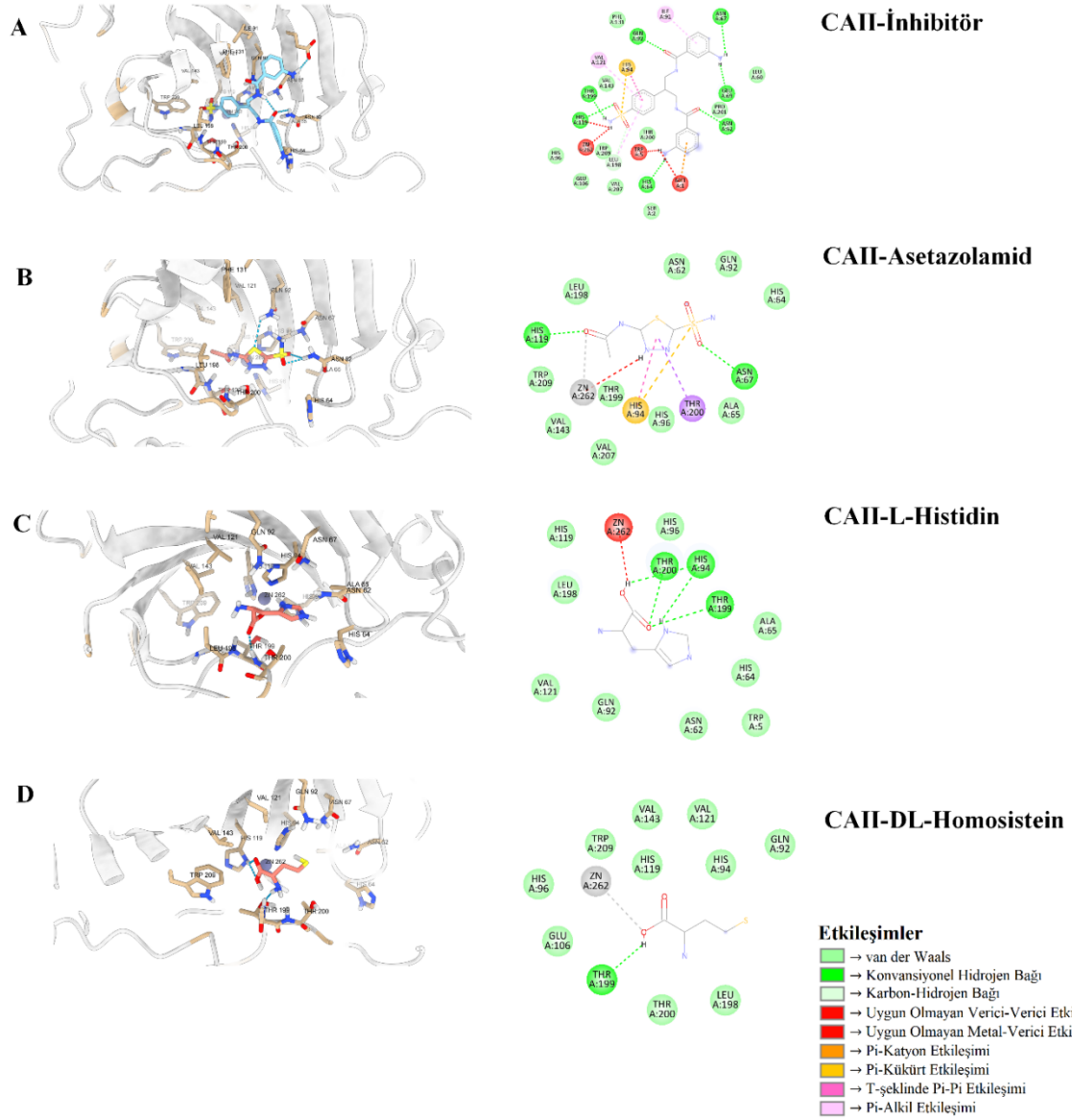
Hem AZM hem de HIS enzimlerle optimal olmayan etkileşimler göstermektedir. Asetazolamid görece daha iyi bağlanma gösterse de değerler güçlü bir inhibitör etkisi için yetersizdir. L-Histidinin bağlanma değerleri, etkili bir ligand olarak değerlendirilemeyeceğini göstermektedir. Her iki bileşik için de daha güçlü bağlanma afinitesine sahip alternatif moleküller araştırılmalıdır. Mevcut bağlanma değerleri, bu bileşiklerin terapötik kullanımı için uygun olmayabileceğini düşündürmektedir.

L-Histidin ve AZM'nin CA I ve CA II için en iyi bağlanma afiniteleri Tablo 23'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, her iki bileşiğin de CA izoformlarıyla yeterince güçlü etkileşimler gösteremediğini ortaya koymaktadır. Daha etkili inhibitörler için yapısal modifikasyonlar veya tamamen farklı moleküler yapıların araştırılması önerilmektedir.

Moleküler kenetleme çalışmalarında DL-Hcy, test edilen bileşikler arasında en düşük bağlanma afinitesini göstermiştir (Şekil 24). Karbonik anhidraz II için -4.4 kcal/mol'luk bağlanma skoru değeri, standart CA inhibitörlerinden (CA I: -7.4 kcal/mol, CA II: -9.0 kcal/mol) oldukça düşük bir bağlanma potansiyeline işaret etmektedir (Tablo 22).

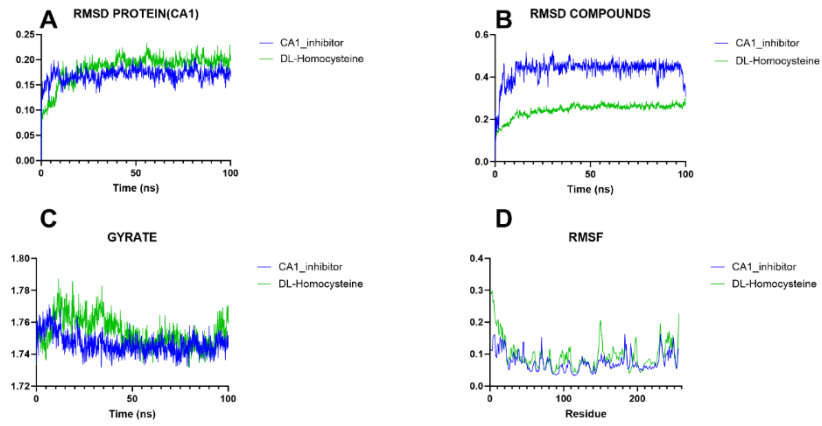
Tablo 23. Karbonik anhidraz I ve II için moleküler kenetleme analizi ile belirlenen HIS ve AZM'nin en iyi bağlanma skorları

Protein	Ligand	En İyi Bağlanma Skoru (kcal/mol)
CA II (2FOU)	AZM	-6.8
CA II (2FOU)	HIS	-5.4
CA I (2FOY)	AZM	-6.3
CA I (2FOY)	HIS	-5.8



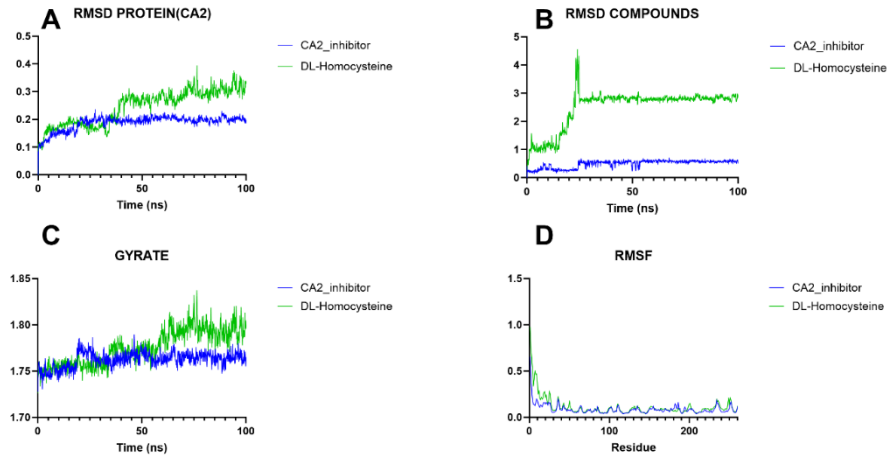
Şekil 24. Karbonik anhidraz II izoenziminin inhibitör, asetazolamid, L-histidin ve DL-homosistein ile etkileşimlerine ait 3D ve 2D görüntüleri A) CAII-inhibitör B) CA II-Asetazolamid C) CA II-L-Histidin D) CA II-DL-Homosistein

Moleküler dinamik simülasyonlarda, DL-Hcy-CA I kompleksi 100 ns boyunca protein yapısında minimal konformasyonel değişiklikler göstermiş ve protein yapısının kompaktlığı korunmuştur. RMSD (kök ortalama kare sapması) profili, protein yapısının çoğunlukla kararlı olduğunu, yüzey döngülerinde beklenen esnekliği gösterdiğini ortaya koymuştur. Jirasyon yarıçapı analizi, kompleksin yapısal kompaktlık seviyesini yaklaşık 1.75 nm’de koruduğunu göstermiştir (Şekil 25).



Şekil 25. Karbonik anhidraz I ile DL-Hcy etkileşimi (A) CA I izoenziminin iki farklı ligand varlığında protein yapısının kararlılığı (B) Ligandların bağlanma bölgesindeki RMSD değişimleri (C) Protein-ligand komplekslerinin jirasyon yarıçapı analizi (D) Protein yapısının amino asit bazında esnekliğini gösteren RMSF profili

Karbonik anhidraz II ile etkileşiminde ise önemli farklılıklar gözlenmiştir. Protein RMSD değerleri diğer ligandlara kıyasla daha yüksek (0.3 nm) seyretmiş ve ligand RMSD'si 3 nm'ye kadar yükselmiştir. Bu yüksek RMSD değeri, DL-Hcy'nin simülasyon süresi içinde bağlanma cebinden ayrıldığını göstermektedir. Protein yapısında zamanla artan bir genişleme (jirasyon yarıçapı 1.80 nm'ye kadar) gözlenmiştir. Kök ortalama kare dalgalanma (RMSF) profili, bazı spesifik bölgelerde diğer ligandlara kıyasla daha yüksek amino asit esnekliği olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, DL-Hcy'nin özellikle CA II enzimi için zayıf bir inhibitör adayı olduğunu ve bağlanma kararlılığının düşük olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 26).



Şekil 26. Karbonik anhidraz II ile DL-Hcy etkileşimi (A) CA I izoenziminin iki farklı ligand varlığında protein yapısının kararlılığı (B) Ligandların bağlanma bölgesindeki RMSD değişimleri (C) Protein-ligand komplekslerinin jirasyon yarıçapı analizi (D) Protein yapısının amino asit bazında esnekliğini gösteren RMSF profili

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Homosistein, Met'in hücre içi demetilasyonu sırasında oluşan ve yapısında sülfidril grubu içeren esansiyel olmayan bir amino asittir (1, 2). Homosistein metabolizması, hücrenin hayatta kalması için gerekli biyokimyasal adımlar olan çeşitli moleküllerin üretilmesi ve çok sayıda enzim, kofaktör ve düzenleyici mekanizma içeren karmaşık biyokimyasal yollara dayanmaktadır. Bu sistem, Met kullanılabilirliğini, protein homeostazını ve DNA-metilasyonunu düzenlemek için çok önemlidir, bu nedenle post-genomik ve epigenetik düzenleme mekanizmalarında anahtar yollar sunar (3, 21, 103).

Bu sistemin bozulması ve Hcy'nin toksik birikimi (HHcy), mitokondriyal disfonksiyona, hücrel hipometilasyona, inflamasyonun indüklenmesine, pro-apoptotik faktörlerin aktivasyonuna, oksidatif stresin artmasına, ROS ve RNS oluşumuna, ardından protein, nükleik asit ve karbohidrat oksidasyonuna ve sitotoksitede rol oynadığı bilinen lipid peroksidasyon ürünlerinde artışa yol açar (3, 6, 9, 104, 105). Bu nedenle Hcy, çeşitli hastalık durumlarının başlangıcında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalar HHcy'nin, nöral tüp defektleri, KVH, atriyal fibrilasyon, AH, kanser, multipl skleroz, glokom, anemi, osteoporoz, migren, epilepsi, gelişimsel bozukluklar ve majör depresif bozukluk gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu ve birçok hastalığın gelişimi ve ilerlemesinde bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (2, 4, 7-10, 106, 107).

Hiperhomosisteineminin ilişkili olduğu kanser, epilepsi, AH, anemi ve glokom ve majör depresif bozukluk gibi birçok hastalık CA'ların aktivitelerinin patolojik düzeylerde artması ya da azalmasıyla da ilişkilidir (16, 21, 82, 108). Karbonik anhidrazlar karbondioksitin geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize ederek pH ve elektrolit homeostazisi, glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi gibi biyosentetik reaksiyonlar, kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon, sinyal iletimi ve oksidatif strese karşı hücrel savunma gibi birçok işlevde yer alır (14-16). Karbonik anhidrazların birçok hücre, doku ve organda çeşitli lokalizasyon ve işlevlere sahip çok sayıda izoformunun insanlarda mevcut olması, inhibitörlerinin ve aktivatörlerinin farmakolojik ve klinik uygulamalarının çokluğuna yol açmıştır (18). Bu nedenle CA aktivitelerinin modülatörleri olan aktivatörler veya inhibitörler kullanılarak bu enzimlerin aktivitesine müdahale edilmesi, aktivitelerinin düzensiz olduğu durumların veya hastalıkların yönetimi için farmakolojik olarak kullanılabilecek önemli fizyolojik sonuçlara sahiptir (55).

Bu doğrultuda hem Hcy'nin hem de hCA'ların çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu ve bu iki etkenin aktivite patolojilerinin çok sayıda hastalıkta kesiştiği görülmektedir. Bununla birlikte yapılan literatür taramalarında çeşitli patolojilerde Hcy ve hCA enzim aktivitelerinin olası rolünün ayrı ayrı araştırıldığı kayda değer sayıda çalışma olmasına rağmen bu iki etkenin birlikte değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında, Hcy'nin hCA izoenzimlerinin aktivitesi üzerindeki etkisinin *in vitro* analizler (esteraz ve hidrataz aktivitesi tayin yöntemi) ve moleküler kenetleme analizleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Homosisteinin hCA izoenzimlerinin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla hCA izoenzimleri arasından eritrositlerde önemli miktarlarda bulunan ve birçok dokuda toplam CA aktivitesinin büyük bir kısmından sorumlu olması nedeniyle hCA II izoenzimi ve hCA II aktivitesinin yalnızca yaklaşık %15'ine sahip olmasına rağmen insan eritrositlerinde hCA II'den beş ila altı kat daha fazla bulunan hCA I izoenzimi seçilmiştir (13, 14, 70).

Aktivite ölçümlerinde kullanılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisini değerlendirmek ve *in vitro* analizlerde kullanılacak konsantrasyon aralıkları belirlenmesi amacıyla esteraz ve hidrataz aktivitesi tayin yöntemi kullanıldı. Elde edilen bulgular ve aktivite-konsantrasyon grafikleri incelendiğinde belirtilen şartlar altında yöntemin doğru çalıştığı ve hCA I için 0-500 nM, hCA II için 0-50 nM enzim konsantrasyonu aralığının uygun olacağı tespit edildi.

Uygun konsantrasyonu aralığının belirlenmesinin ardından hCA I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek için V_{max} ve K_M değerleri hesaplandı. Hidrataz aktivitesi tayin yönteminde hCA I (100 nM) ve hCA II (15 nM) için V_{max} değeri sırasıyla 0.204 EU/ml ve 0.259 EU/ml K_M değeri ise 27.59 mM ve 31.67 mM olarak hesaplandı. Esteraz aktivitesi tayin yönteminde hCA I (100 nM) ve hCA II (15 nM) için V_{max} değeri sırasıyla 32.25 U/L ve 29.4 U/L K_M değeri ise 0.64 mM ve 2.9 mM olarak hesaplandı. Literatür incelendiğinde, genel olarak CA ile ilgili yapılan araştırmalarda K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanmadığı görülmektedir. Bu tez çalışması, bu alandaki literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır.

İnsan CA I ve II izoenzimlerinin konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: 100 nM; hCA II: 15 nM) inhibitör etkisini doğrulamak için; esteraz aktivitesi tayin yönteminde hCA I ve hCA II izoenzimleri için 9 farklı konsantrasyon, hidrataz aktivitesi tayin yönteminde

ise hCA I izoenzimi için 10 farklı konsantrasyon, hCA II izoenzimi için 15 farklı konsantrasyonda AZM çözeltisi kullanıldı ve AZM için IC_{50} değerleri belirlendi. Esteraz aktivitesi tayin yönteminde elde edilen bulgular değerlendirildiğinde AZM, hCA I için $0.292 \mu M$ IC_{50} değeri , hCA II için $0.115 \mu M$ IC_{50} değeri göstermiştir. Hidrataz aktivitesi tayin yönteminde elde edilen bulgular değerlendirildiğinde ise AZM, hCA I için $55.93 \mu M$ IC_{50} değeri , hCA II için $5.24 \mu M$ IC_{50} değeri göstermiştir.

İnsan CA I ve II izoenzimlerinin konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: $40 nM$; hCAII: $6 nM$) aktivatör etkisini doğrulamak için; esteraz aktivitesi tayin yönteminde hCA I ve hCA II izoenzimleri için 7 farklı konsantrasyon, hidrataz aktivitesi tayin yönteminde ise hCA I ve hCA II izoenzimleri için 8 farklı konsantrasyonda HIS çözeltisi kullanıldı ve HIS için AC_{50} değerleri belirlendi. Esteraz aktivitesi tayin yönteminde elde edilen bulgular değerlendirildiğinde HIS, hCA I için $209.8 \mu M$ AC_{50} değeri , hCA II için $22.9 \mu M$ AC_{50} değeri göstermiştir. Hidrataz aktivitesi tayin yönteminde elde edilen bulgular değerlendirildiğinde ise HIS, hCA I için $0.237 \mu M$ AC_{50} değeri , hCA II için $0.005 \mu M$ AC_{50} değeri göstermiştir.

İnsan CA I ve II izoenzimlerinin konsantrasyonları sabit tutularak (hCA I: $40 nM$; hCA II: $6 nM$) DL-Hcy'nin belirtilen izoenzimlerin aktivitesi üzerindeki etkisini belirlenmek için; esteraz aktivitesi tayin yönteminde hCA I ve hCA II izoenzimleri için 13 farklı konsantrasyon, hidrataz aktivitesi tayin yönteminde ise hCA I izoenzimi için 5 farklı konsantrasyon, hCA II izoenzimi için 13 farklı konsantrasyonda DL-Hcy çözeltisi kullanıldı. Her iki aktivite tayin yönteminden elde edilen bulgular DL-Hcy'nin hCA I ve hCA II izoenzimlerinin aktivitesini arttırdığını göstermiştir. Esteraz aktivitesi tayin yönteminde elde edilen bulgular değerlendirildiğinde DL-Hcy, hCA I için $16.65 \mu M$ AC_{50} değeri , hCA II için $23.32 \mu M$ AC_{50} değeri göstermiştir. Hidrataz aktivitesi tayin yönteminde elde edilen bulgular değerlendirildiğinde ise DL-Hcy, hCA I için $8.95 \mu M$ AC_{50} değeri , hCA II için $55.91 \mu M$ AC_{50} değeri göstermiştir. DL-Homosisteinin hCA I ve hCA II izoenzimleri için AC_{50} değerleri kendi içinde değerlendirildiğinde hem esteraz hem de hidrataz aktivitesi tayin yönteminde DL-Hcy'nin hCA II izoenzimine kıyasla hCA I izoenzimi için daha güçlü aktivatör etkisi göstermiştir. Ayrıca DL-Hcy, esteraz aktivitesi tayin yönteminde HIS ile yapılan aktivite çalışmalarından elde edilen bulgulara kıyasla da hCA I için daha güçlü aktivatör etkisi göstermiştir.

Moleküler kenetleme analizinde ise Protein Data Bank'tan alınan CA I ve CA II izoenzimlerinin kristal yapıları (CA I: 2foy, CA II: 2fou) ile DL-Hcy, HIS ve AZM'nin bağlanma simülasyonları gerçekleştirildi ve bu ligandların en iyi bağlanma afiniteleri belirlendi.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde CA I ve CA II izoenzimleri ile AZM zayıf-orta düzeyde bağlanma afinitesi göstermiştir. Asetazolamidin, CA I (2FOY) ile en iyi bağlanma afinitesinin -6.3 kcal/mol ve CA II (2FOU) ile en iyi bağlanma afinitesinin -6.8 kcal/mol olduğu görülmüştür. Asetazolamidin, CA I (2FOY) ve CA II (2FOU) izoenzimleri ile en iyi bağlanma afiniteleri kendi içinde değerlendirildiğinde AZM, CA I'e kıyasla CA II'ye daha güçlü bağlanmaktadır, ancak bu fark önemli düzeyde değildir ve genel olarak bağlanma değerlerinin optimal etkileşim için yetersiz olduğu görülmüştür.

L-Histidin için elde edilen bulgular değerlendirildiğinde ise ligand her iki enzimle de oldukça zayıf bağlanma afinitesi göstermiştir. L-Histidinin CA I (2FOY) ile en iyi bağlanma afinitesinin -5.8 kcal/mol ve CA II (2FOU) ile en iyi bağlanma afinitesinin -5.4 kcal/mol olduğu görülmüştür. Elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde HIS, her iki enzimle de oldukça zayıf bağlanma afinitesi göstermektedir. Bağlanma değerlerinin etkili bir etkileşim için çok düşük olduğu görülmüştür. Ligand, her iki enzimle de benzer düzeyde zayıf etkileşim sergilemiştir.

Karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri ile her iki ligand birlikte değerlendirildiğinde hem AZM hem de HIS enzimlerle optimal olmayan etkileşimler göstermektedir. Asetazolamid görece daha iyi bağlanma gösterse de değerlerin güçlü bir inhibitör etkisi için yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır. L-Histidinin bağlanma değerleri, etkili bir ligand olarak değerlendirilemeyeceğini göstermektedir.

Moleküler kenetleme çalışmalarında DL-Hcy, test edilen bileşikler arasında en düşük bağlanma afinitesini göstermiştir. CA I izoenzimi için -4.7 kcal/mol ve CA II izoenzimi için -4.4 kcal/mol'luk bağlanma skoru değerleri, standart CA inhibitöründen (CA I: -7.4 kcal/mol, CA II: -9.0 kcal/mol) oldukça düşük bir bağlanma potansiyeline işaret etmektedir.

Kök ortalama kare sapması, başlangıç yapısına kıyasla protein kararlılığını tahmin etmek için kullanılan temel faktörlerden biridir. Simülasyon sırasında bileşiklerin ortalama dalgalanmalarını değerlendirmek için kök ortalama kare dalgalanma analizi de yapılmıştır (109). Moleküler dinamik simülasyonlarda, DL-Hcy-CA I kompleksi 100 ns boyunca

protein yapısında minimal konformasyonel değişiklikler göstermiş ve protein yapısının kompaktlığı korunmuştur. Kök ortalama kare sapması profili, protein yapısının çoğunlukla kararlı olduğunu, yüzey döngülerinde beklenen esnekliği gösterdiğini ortaya koymuştur. Jirasyon yarıçapı analizi, kompleksin yapısal kompaktlık seviyesini yaklaşık 1.75 nm’de koruduğunu göstermiştir.

Karbonik anhidraz II izoenzimi ile etkileşiminde ise önemli farklılıklar gözlenmiştir. Protein RMSD değerleri diğer ligandlara kıyasla daha yüksek (0.3 nm) seyretmiş ve ligand RMSD’si 3 nm’ye kadar yükselmiştir. Bu yüksek RMSD değeri, DL-Hcy’nin simülasyon süresi içinde bağlanma cebinden ayrıldığını göstermektedir. Protein yapısında zamanla artan bir genişleme (jirasyon yarıçapı 1.80 nm’ye kadar) gözlenmiştir. Kök ortalama kare dalgalanma profili, bazı spesifik bölgelerde diğer ligandlara kıyasla daha yüksek amino asit esnekliği olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, DL-Hcy’nin özellikle CA II enzimi için zayıf bir inhibitör adayı olduğunu ve bağlanma kararlılığının düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle DL-Hcy’nin özellikle CA II izoenzimi için oldukça zayıf bir inhibitör adayı olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak *in vitro* analizlerden elde edilen bulgular DL-Hcy’nin CA II izoenzimine kıyasla özellikle CA I izoenzimi için daha güçlü aktivatör adayı olduğunu göstermektedir. Moleküler kenetleme analizlerinden elde edilen bulgular ise DL-Hcy, CA I ve II izoenzimleri için sırasıya -4.7 ve -4.4 bağlanma skoru değerleri ile AZM ve HIS’ye göre nispeten daha düşük bir bağlanma skoru değeri göstermiştir. Elde edilen veriler, Hcy’nin her iki izoenzimin aktivitesini artırdığını göstermiştir. Ancak bu çalışma hasta örneklerine dayanmamaktadır. Bu nedenle, Hcy’nin CA izoenzim aktivitesi üzerindeki etkisinin klinik bağlamda değerlendirilmesi ve hastalık süreçleriyle olan ilişkilerinin daha net ortaya konması amacıyla ileri düzey hücre kültürü, hayvan modeli ve hasta örneği temelli araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, CA inhibitörlerinin sınırlılıkları göz önünde bulundurulduğunda, Hcy düzeylerinin kontrol altına alınması yeni bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Shen W, Gao C, Cueto R, Liu L, Fu H, Shao Y, Yang WY, Fang P, Choi ET, Wu Q, Yang X, Wang H (2020). Homocysteine-methionine cycle is a metabolic sensor system controlling methylation-regulated pathological signaling. *Redox Biology* 28: 101322.
2. Hermann A, Sitdikova G (2021). Homocysteine: biochemistry, molecular biology and role in disease. *Biomolecules* 11(5): 737.
3. Koklesova L, Mazurakova A, Samec M, Biringer K, Samuel SM, Büsselberg D, Kubatka P, Golubnitschaja O (2021). Homocysteine metabolism as the target for predictive medical approach, disease prevention, prognosis, and treatments tailored to the person. *The EPMA Journal* 12(4): 477–505.
4. Chubarov AS (2021). Homocysteine thiolactone: biology and chemistry. *Encyclopedia* 1(2): 445-459.
5. Ostrakhovitch EA, Tabibzadeh S (2019). Homocysteine and age-associated disorders. *Ageing Research Reviews* 49: 144–164.
6. Yuan D, Chu J, Lin H, Zhu G, Qian J, Yu Y, Yao T, Ping F, Chen F, Liu X (2023). Mechanism of homocysteine-mediated endothelial injury and its consequences for atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 9: 1109445.
7. Zhou L (2024). Homocysteine and Parkinson's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 30(2): e14420.
8. Washington J, Ritch R, Liu Y (2023). Homocysteine and glaucoma. *International Journal of Molecular Sciences* 24(13): 10790.
9. Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Halašová E, Lehotský J (2016). The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *International Journal of Molecular Sciences* 17(10): 1733.
10. Filip A, Veliceasa B, Bordeianu G, Iancu C, Cuciureanu M, Viola BO (2024). The relationship between cysteine, homocysteine, and osteoporosis. *IntechOpen*.
11. Ahmed RF, Mahmoud WR, Abdelgawad NM, Fouad MA, Said MF (2023). Exploring novel anticancer pyrazole benzenesulfonamides featuring tail approach strategy as carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 261: 115805.

12. Mishra CB, Tiwari M, Supuran CT (2020). Progress in the development of human carbonic anhydrase inhibitors and their pharmacological applications: where are we today?. *Medicinal Research Reviews* 40(6): 2485–2565.
13. Ciccone L, Cerri C, Nencetti S, Orlandini E (2021). Carbonic anhydrase inhibitors and epilepsy: state of the art and future perspectives. *Molecules* 26(21): 6380.
14. Lemon N, Canepa E, Ilies MA, Fossati S (2021). Carbonic anhydrases as potential targets against neurovascular unit dysfunction in Alzheimer's disease and stroke. *Frontiers in Aging Neuroscience* 13: 772278.
15. Lionetto MG, Caricato R, Giordano M. (2020). Carbonic anhydrase sensitivity to pesticides: perspectives for biomarker development. *International Journal of Molecular Sciences* 21(10): 3562.
16. Zamanova S, Shabana AM, Mondal UK, Ilies MA (2019). Carbonic anhydrases as disease markers. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 29(7): 509–533.
17. Xiao-Qun Z, Xian-Li M, Ariffin NS (2024). The potential of carbonic anhydrase enzymes as a novel target for anti-cancer treatment. *European Journal of Pharmacology* 976: 176677.
18. Supuran CT (2025). Multi- and polypharmacology of carbonic anhydrase inhibitors. *Pharmacological Reviews* 77(1): 100004.
19. Haapasalo J, Nordfors K, Haapasalo H, Parkkila S. (2020). The expression of carbonic anhydrases II, IX and XII in brain tumors. *Cancers* 12(7): 1723.
20. Kumar S, Rulhania S, Jaswal S, Monga V (2021). Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 209: 112923.
21. Marroncini G, Martinelli S, Menchetti S, Bombardiere F, Martelli FS (2024). Hyperhomocysteinemia and disease—is 10 $\mu\text{mol/L}$ a suitable new threshold limit? *International Journal of Molecular Sciences* 25(22): 12295.
22. Jang BG, Yun SM, Ahn K, Song JH, Jo SA, Kim YY, Kim DK, Park MH, Han C, Koh YH (2010). Plasma carbonic anhydrase II protein is elevated in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 21(3): 939–945.

23. Pollard A, Shephard F, Freed J, Liddell S, Chakrabarti L (2016). Mitochondrial proteomic profiling reveals increased carbonic anhydrase II in aging and neurodegeneration. *Aging* 8(10): 2425–2436.
24. Sikora M, Skrzydlewski P, Perła-Kaján J, Jakubowski H (2022). Homocysteine thiolactone contributes to the prognostic value of fibrin clot structure/function in coronary artery disease. *PloS One*, 17(10): e0275956.
25. Jakubowski H (2019). Homocysteine modification in protein structure/function and human disease. *Physiological Reviews* 99(1): 555–604.
26. Song IH, Yeom GS, Kuwar A, Nimse SB (2022). Elimination reaction-based benzimidazole probe for cysteine detection and its application in serum sample analysis. *Biosensors* 12(4): 224.
27. Temel İ, Özerol E (2002). Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. *Journal of Turgut Ozal Medical Center* 9(2).
28. Bajic Z, Sobot T, Skrbic R, Stojiljkovic MP, Ponorac N, Matavulj A, Djuric DM (2022). Homocysteine, vitamins B6 and folic acid in experimental models of myocardial infarction and heart failure—how strong is that link? *Biomolecules* 12(4): 536.
29. Barroso M, Handy DE, Castro R (2017). The link between hyperhomocysteinemia and hypomethylation: implications for cardiovascular disease. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening* 5.
30. Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, Kadowitz PJ, Gettys TW, & Murthy SN (2017). The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutrition & Metabolism* 14: 78.
31. Malinowska A, Chmurzynska A (2009). Polymorphism of genes encoding homocysteine metabolism-related enzymes and risk for cardiovascular disease. *Nutrition Research (New York, N.Y.)* 29(10): 685–695.
32. Agarwal PK (2006). Enzymes: an integrated view of structure, dynamics and function. *Microbial Cell Factories* 5: 2.
33. Lewis T, Stone WL (2023). Biochemistry, proteins enzymes. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

34. Robinson PK (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry* 59: 1–41.
35. Talens-Perales D, Marín-Navarro J, Polaina J (2016). Enzymes: functions and characteristics.
36. El-Gendi H, Saleh AK, Badierah R, Redwan EM, El-Maradny YA, El-Fakharany EM (2021). A comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification, and their role in mankind's challenges. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)* 8(1): 23.
37. Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR (2019). Protein structure and function. *Molecular Biology* 445-483.
38. Concu R, Cordeiro MNDS (2019). Alignment-free method to predict enzyme classes and subclasses. *International Journal of Molecular Sciences* 20(21): 5389.
39. McDonald AG, Tipton KF (2023). Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. *The FEBS Journal* 290(9): 2214–2231.
40. Blanco A, Blanco G (2017). Chapter 8—Enzymes. *Medical Biochemistry* 8: 153-175.
41. Kabir MF, Ju LK (2023). On optimization of enzymatic processes: temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochemistry* 130: 734-746.
42. Buzás GM, Supuran CT (2016). The history and rationale of using carbonic anhydrase inhibitors in the treatment of peptic ulcers. In *memoriam Ioan Pușcaș (1932-2015)*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31(4): 527–533.
43. Aspatwar A, Tolvanen MEE, Barker H, Syrjänen L, Valanne S, Purmonen S, Waheed A, Sly WS, Parkkila S (2022). Carbonic anhydrases in metazoan model organisms: molecules, mechanisms, and physiology. *Physiological Reviews* 102(3): 1327–1383.
44. Meldrum NU, Roughton FJ (1933). Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *The Journal of Physiology* 80(2): 113–142.
45. Imtaiyaz Hassan M, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS (2013). Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21(6): 1570–1582.
46. Chiaramonte N, Romanelli MN, Teodori E, Supuran CT (2018). Amino acids as building blocks for carbonic anhydrase inhibitors. *Metabolites* 8(2): 36.

47. Nerella, S. G., Thacker, P. S., Arifuddin, M., & Supuran, C. T. (2024). Tumor associated carbonic anhydrase inhibitors: rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* 10: 100131.
48. Nishimori I, Onishi S, Vullo D, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT (2007). "Carbonic anhydrase activators: the first activation study of the human secretory isoform VI with amino acids and amines", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(15): 5351–5357.
49. Fierke CA, Thompson RB (2001). Fluorescence-based biosensing of zinc using carbonic anhydrase. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 14(3-4): 205–222.
50. Angeli A, Paoletti N, Supuran CT (2023). Five-membered heterocyclic sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)* 28(7): 3220.
51. Poggetti V, Salerno S, Baglini E, Barresi E, Da Settimo F, Taliani S (2022). Carbonic anhydrase activators for neurodegeneration: an overview. *Molecules* 27(8): 2544.
52. Frost SC (2014). Physiological functions of the alpha class of carbonic anhydrases. *Sub-cellular Biochemistry* 75: 9–30.
53. Singh S, Lomelino CL, Mboge MY, Frost SC, McKenna R (2018). Cancer drug development of carbonic anhydrase inhibitors beyond the active site. *Molecules* 23(5): 1045.
54. 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.
55. Supuran CT (2023). A simple yet multifaceted 90 years old, evergreen enzyme: carbonic anhydrase, its inhibition and activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 93: 129411.
56. Supuran CT (2016). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist?. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31(3): 345–360.

57. Blandina P, Provensi G, Passsani MB, Capasso C, Supuran CT (2020). Carbonic anhydrase modulation of emotional memory. Implications for the treatment of cognitive disorders. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35(1): 1206–1214.
58. Nocentini A, Supuran CT (2019). Advances in the structural annotation of human carbonic anhydrases and impact on future drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 14(11): 1175–1197.
59. Vullo D, Carta F (2019). Mechanisms of action of carbonic anhydrase inhibitors. *Carbonic Anhydrases* 187–222.
60. Andreucci E, Biagioni A, Peri S, Versienti G, Cianchi F, Staderini F, Antonuzzo L, Supuran CT, Olivo E, Pasqualini E, Messerini L, Massi D, Lulli M, Ruzzolini J, Peppicelli S, Bianchini F, Schiavone N, Calorini L, Magnelli L, Papucci L (2023). The CAIX inhibitor SLC-0111 exerts anti-cancer activity on gastric cancer cell lines and resensitizes resistant cells to 5-Fluorouracil, taxane-derived, and platinum-based drugs. *Cancer Letters* 571: 216338.
61. Nocentini A, Cuffaro D, Ciccone L, Orlandini E, Nencetti S, Nuti E, Rossello A, Supuran CT (2021). Activation of carbonic anhydrases from human brain by amino alcohol oxime ethers: towards human carbonic anhydrase VII selective activators. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36(1): 48–57.
62. Angeli A, Berrino E, Carradori S, Supuran CT, Cirri M, Carta F, Costantino G (2021). Amine- and amino acid-based compounds as carbonic anhydrase activators. *Molecules* 26(23): 7331.
63. Briganti F, Mangani S, Orioli P, Scozzafava A, Vernaglione G, Supuran CT (1997). Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with histamine. *Biochemistry* 36(34): 10384–10392.
64. Blandina P, Supuran CT (2019). Carbonic anhydrase activators and their potential in the pharmaceutical field. In: *carbonic anhydrases*. Academic Press p: 477-492.

65. Wang X, Schröder HC, Schlossmacher U, Neufurth M, Feng Q, Diehl-Seifert B, Müller WE (2014). Modulation of the initial mineralization process of SaOS-2 cells by carbonic anhydrase activators and polyphosphate. *Calcified Tissue International* 94(5): 495–509.
66. Müller WE, Schröder HC, Schlossmacher U, Grebenjuk VA, Ushijima H, Wang X (2013). Induction of carbonic anhydrase in SaOS-2 cells, exposed to bicarbonate and consequences for calcium phosphate crystal formation. *Biomaterials* 34(34): 8671–8680.
67. Sun MK, Alkon DL (2001). Pharmacological enhancement of synaptic efficacy, spatial learning, and memory through carbonic anhydrase activation in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297(3): 961–967.
68. Sun MK, Alkon DL (2002). Carbonic anhydrase gating of attention: memory therapy and enhancement. *Trends in Pharmacological Sciences* 23(2): 83–89.
69. Provensi G, Carta F, Nocentini A, Supuran CT, Casamenti F, Passani MB, Fossati S (2019). A new kid on the block? Carbonic anhydrases as possible new targets in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences* 20(19): 4724.
70. Yildirmis S, Alver A, Yandi YE, Demir S, Senturk A, Bodur A, Mentese A (2016). "The effect of erythrocyte membranes from diabetic and hypercholesterolemic individuals on human carbonic anhydrase II activity", *Archives of Physiology and Biochemistry* 122(1): 14–18.
71. Lowe N, Brady HJ, Barlow JH, Sowden JC, Edwards M, Butterworth PH (1990). Structure and methylation patterns of the gene encoding human carbonic anhydrase I. *Gene* 93(2): 277–283.
72. Deutsch HF (1987). Carbonic anhydrases. *International Journal of Biochemistry* 19(2): 101–113.
73. Andersson B, Nyman PO, Strid L (1972). Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 48(3): 670–677.
74. Chegwiddden WR (2021). The carbonic anhydrases in health and disease. *The Carbonic Anhydrases: Current and Emerging Therapeutic Targets* 1-12.

75. Türkeş C (2023). Carbonic anhydrase inhibition by antiviral drugs *in vitro* and *in silico*. Journal of Molecular Recognition: JMR 36(12): e3063.
76. Kuo WH, Yang SF, Hsieh YS, Tsai CS, Hwang WL, Chu SC (2005). Differential expression of carbonic anhydrase isoenzymes in various types of anemia. Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry 351(1-2): 79–86.
77. Yuan L, Wang M, Liu T, Lei Y, Miao Q, Li Q, Wang H, Zhang G, Hou Y, Chang X (2019). Carbonic anhydrase 1-mediated calcification is associated with atherosclerosis, and methazolamide alleviates its pathogenesis. Frontiers in Pharmacology 10: 766.
78. Wang DB, Lu XK, Zhang X, Li ZG, Li CX (2016). Carbonic anhydrase 1 is a promising biomarker for early detection of non-small cell lung cancer. Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 37(1): 553–559.
79. Adeva-Andany MM, Fernández-Fernández C, Sánchez-Bello R, Donapetry-García C, Martínez-Rodríguez J (2015). The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans. Atherosclerosis 241(1): 183–191.
80. Andring JT, Kim CU, McKenna R (2020). Structure and mechanism of copper-carbonic anhydrase II: a nitrite reductase. IUCrJ 7(Pt 2): 287–293.
81. Henderson LE, Henriksson D, Nyman PO (1976). Primary structure of human carbonic anhydrase C. The Journal of Biological Chemistry 251(18): 5457–5463.
82. Lomelino CL, Andring JT, McKenna R (2018). Crystallography and its impact on carbonic anhydrase research. International Journal of Medicinal Chemistry 2018: 9419521.
83. Annan DA, Maishi N, Soga T, Dawood R, Li C, Kikuchi H, Hojo T, Morimoto M, Kitamura T, Alam MT, Minowa K, Shinohara N, Nam JM, Hida Y, Hida K (2019). Carbonic anhydrase 2 (CAII) supports tumor blood endothelial cell survival under lactic acidosis in the tumor microenvironment. Cell Communication and Signaling: CCS 17(1): 169.
84. Whyte MP (2023). Carbonic anhydrase II deficiency. Bone 169: 116684.

85. Gupta P, Mahlawat P, Deep S (2020). Effect of disease-linked mutations on the structure, function, stability and aggregation of human carbonic anhydrase II. *International Journal of Biological Macromolecules* 143: 472–482.
86. Jakubowski M, Szahidewicz-Krupska E, Doroszko A (2018). The human carbonic anhydrase II in platelets: an underestimated field of its activity. *BioMed Research International* 2018: 4548353.
87. Parkkila S, Lasota J, Fletcher JA, Ou WB, Kivelä AJ, Nuorva K, Parkkila AK, Ollikainen J, Sly WS, Waheed A, Pastorekova S, Pastorek J, Isola J, Miettinen M (2010). Carbonic anhydrase II. A novel biomarker for gastrointestinal stromal tumors. *Modern Pathology: an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc* 23(5): 743–750.
88. Armstrong JM, Myers DV, Verpoorte JA, Edsall JT (1966). Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *The Journal of Biological Chemistry* 241(21): 5137–5149.
89. Wilbur KM, Anderson NG (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry* 176(1): 147–154.
90. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28(1): 235–242.
91. Jude KM, Banerjee AL, Haldar MK, Manokaran S, Roy B, Mallik S, Srivastava DK, Christianson DW (2006). Ultrahigh resolution crystal structures of human carbonic anhydrases I and II complexed with “two-prong” inhibitors reveal the molecular basis of high affinity. *Journal of the American Chemical Society* 128(9): 3011–3018.
92. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE (2021). PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research* 49(D1): D1388–D1395.
93. Trott O, Olson AJ (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31(2): 455–461.
94. Dallakyan S, Olson AJ (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1263: 243–250.

95. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E (2015). GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1: 19-25.
96. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13): 1605–1612.
97. Eastman P, Swails J, Chodera JD, McGibbon RT, Zhao Y, Beauchamp KA, Wang LP, Simmonett AC, Harrigan MP, Stern CD, Wiewiora RP, Brooks BR, Pande VS (2017). OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. *PLoS Computational Biology* 13(7): e1005659.
98. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78(8): 1950–1958.
99. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* 79(2): 926-935.
100. Sousa da Silva AW, Vranken WF (2012). ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Research Notes* 5: 367.
101. Jakalian A, Jack DB, Bayly CI (2002). Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. parameterization and validation. *Journal of Computational Chemistry* 23(16): 1623–1641.
102. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry* 25(9): 1157–1174.
103. Cordaro M, Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S, Di Paola R, Impellizzeri D (2021). Involvements of hyperhomocysteinemia in neurological disorders. *Metabolites* 11(1): 37.
104. Esse R, Barroso M, Tavares de Almeida I, Castro R (2019). The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: state-of-the-art. *International Journal of Molecular Sciences* 20(4): 867.

105. Ganguly P, Alam SF (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition Journal* 14: 6.
106. Kim J, Kim H, Roh H, Kwon Y (2018). Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Archives of Pharmacal Research* 41(4): 372–383.
107. Koc H, Kaya F (2020). Relationship between homocysteine levels, anterior chamber depth, and pseudoexfoliation glaucoma in patients with pseudoexfoliation. *International Ophthalmology* 40(7): 1731–1737.
108. Magheru C, Magheru S, Coltau M, Hoza A, Moldovan C, Sachelarie L, Gradinaru I, Hurjui LL, Marc F, Farcas DM (2022). Antiepileptic drugs and their dual mechanism of action on carbonic anhydrase. *Journal of Clinical Medicine* 11(9): 2614.
109. Mahadevaswamy M, Suchitha GP, Pavan SR, Vivek HK, Nithya SD, Chandan S, Prasad SK, Keshava Prasad TS, Ahmad SF, Attia SM, Dagamajalu S, Siddesha JM (2025). Author correction: naringin attenuates angiotensin II induced cardiac hypertrophy by inhibiting carbonic anhydrase II. *Scientific Reports* 15(1): 18708.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sera ŞAHİN
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Tarihi ve Yeri :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2025
Lisans	Avrasya Üniversitesi	2020
Lise	Yıldızkent Borsa İstanbul Anadolu Lisesi	2015

HOBİLER

Müzik dinlemek