T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BENZOTİYAZOL GRUBU İÇEREN SÜLFONAMİDLERİN TÜMÖR İLİŞKİLİ KARBONİK ANHİDRAZ IX, XII (CA-IX, CA-XII) İZOENZİMLERİ VE SİTOZOLİK KARBONİK ANHİDRAZ I, II (CA-I, CA-II) İZOENZİMLERİ ÜZERİNE SPESİFİK İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine TERZİ

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2015

T.C.

YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BENZOTİYAZOL GRUBU İÇEREN SÜLFONAMİDLERİN TÜMÖR İLİŞKİLİ KARBONİK ANHİDRAZ IX, XII (CA-IX, CA-XII) İZOENZİMLERİ VE SİTOZOLİK KARBONİK ANHİDRAZ I, II (CA-I, CA-II) İZOENZİMLERİ ÜZERİNE SPESİFİK İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine TERZİ

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2015

T.C.

YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Benzotiyazol Grubu İçeren Sülfonamidlerin Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz IX, XII (CA-IX, CA-XII) İzoenzimleri ve Sitozolik Karbonik Anhidraz I, II (CA-I, CA-II) İzoenzimleri Üzerine Spesifik İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

Emine TERZİ

Yüksek Lisans Tezi

Tez Savunma Sınav Tarihi

13.08.2015

Danışman

Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, yabancı kaynaklardan alınan tüm bilgilerin tarafımdan çevrildiğini, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

13.08.2015



Emine TERZİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı İtalya/Floransa Üniversitesi Biyoorganik Kimya laboratuvarında tamamlanmıştır.

Tez çalışmam sırasında engin bilgisinden faydalandığım, bilgi, tecrübe ve akademik azmini kendime örnek aldığım, beni her anlamda destekleyen danışman hocam Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER'e en derin minnet ve saygılarımı arz ederim.

İtalya' daki deneysel çalışmalarım sırasında beni yönlendiren Prof. Dr. Claudiu T. SUPURAN, Prof. Dr. Andrea SCOZZAFAVA, Dr. Mariangela CERUSO ve ekibine en içten teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans süreci boyunca, beni, 2228-A Son Sınıf Öğrencileri İçin Yüksek Lisans Burs Programı ile destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı' na sonsuz teşekkür ederim.

Yurtdışında bulunduğum süre zarfınca her zaman yanımda olan, beni hiç yalnız bırakmayan, her türlü zorluğu beraber göğüslediğimiz değerli arkadaşım Arş. Gör. Beyza Ecem ÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarım süresince yanımda bulunmamalarına rağmen beni her anlamda destekleyen ve yalnız bırakmayan sayın Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN, sayın Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK, Yrd. Doç. Dr. Hilal Göktürk, Arş. Gör. İlkay PİŞKİN, Arş. Gör. Tuba ÖZDEMİR, Arş. Gör. Elif ERCAN, Arş. Gör. Tuğba Kevser ARKAN, Yeter DİLEK, Bilgesu ERSAN'a teşekkür etmek isterim.

Tez çalışmalarım sırasında hep yanımda olan, koşulsuz şartsız bana her durumda destek veren, beni her anlamıyla yetiştirmiş, bilgilendirmiş ve bu tezin ortaya çıkmasında en az benim kadar emeği geçen canım annem Tülay TERZİ'ye, hep yanımda olan sevgili babam Coşkun TERZİ'ye ve canım kardeşim Vahap TERZİ'ye bana gösterdikleri sabır ve destekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET……..iii
ABSTRACT…….. iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ…….v
ŞEKİLLER DİZİNİ…….. vi
TABLOLAR DİZİNİ……. x
1.GİRİŞ……1
2.GENEL BİLGİLER…… 3
2.1.Kanser……. 3
2.1.1. Kanserin Moleküler Biyolojisi…… 5
2.1.2. Hücre Döngüsü ve Kanser……...……..8
2.1.3. Tümör Mikroçevresi……... 9
2.2. Hipoksi…… 11
2.3. Karbonik Anhidraz Enzimi……. 12
2.3.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Tarihçesi…… 13
2.3.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı…….. 13
2.3.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması…… 15
2.3.4. Karbonik Anhidraz Enzim Ailesi……. 16
2.3.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Önemi…… 17
2.3.6. Sitozolik Karbonik Anhidraz İzoenzimleri…….. 20
2.3.7. Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz İzoenzimleri…….. 21
2.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri……. 24
2.5. Sülfonamidler…….. 27
2.6. Benzotiyazoller…… 29
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER…….. 32
3.1. Materyaller…….. 32
3.1.1. Çalışmada Kullanılan İnhibitörler…… 32
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar…….. 36
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması……. 36
3.2. Yöntemler…… 37
3.2.1. CO_2-Hidrataz Aktivitesi Tayini (Stopped-Flow Kinetik Aleti)….. 37

4. BULGULAR…… 41
4.1. AnA1…….. 41
4.2. AnA2……... 43
4.3. AnA3……... 45
4.4. AnA4……... 47
4.5. AnA5……... 49
4.6. AnA6……... 51
4.7. AnA7……... 53
4.8. AnA8……..55
4.9. AnA9……... 57
4.10. AnA10……..59
4.11. AnA11……61
4.12. AnA12……... 63
4.13. AnA13…… 65
4.14. AnA14…… 67
5. TARTIŞMA……...70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER…… 76
7. KAYNAKLAR……..78
8. EKLER…….. 93
EK-1. ÖZGEÇMİŞ FORMU……...93

ÖZET

Benzotiyazol Grubu İçeren Sülfonamidlerin Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz IX, XII (CA-IX, CA-XII) İzoenzimleri ve Sitozolik Karbonik Anhidraz I, II (CA-I, CA-II) İzoenzimleri Üzerine Spesifik İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

Karbonik anhidrazlar (CA, EC 4.2.1.1) metabolize dokular ve akciğerler arasında CO_2 /HCO_3^- transport ve respirasyonu, pH ve CO_2 homeostazisi, çeşitli doku ve organlarda elektrolit sekresyonu, biyosentetik reaksiyonlar (glukoneogenez, lipogenez, ürogenez vb.), kemik yıkımı, kalsifikasyon, tümör gelişimi gibi pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte görev alırlar.

CA-I ve CA-II memeli kırmızı kan hücrelerinde bulunan iki ana sitozolik CA izoformudur. CA-IX ve CA-XII ise tümör ilişkili-CA izoenzimleridir ve bu izoenzimler ekstrasellüler asidifikasyonu tetikleyerek tümör gelişimine katkıda bulunurlar.

Araştırmamızda yeni sentezlenmiş olan benzotiyazol grubu içeren 14 adet sekonder sülfonamid türevi CA inhibitörünün, CA-I, CA-II, CA-IX, CA-XII üzerine olan inhibisyon etkileri incelenmiştir. İnhibisyon çalışmaları SX.18MV-R Applied Photophysics Stopped-Flow Kinetik aleti ile yapılmıştır. CA-I ve CA-II için en etkin inhibisyonu gösteren bileşik AnA14 bileşiği olarak tespit edilmiştir. AnA14 bileşiğinin inhibisyon değerleri CA-I ve CA-II için sırasıyla 8,11 ve 0,19 μM olarak bulunmuştur. Diğer inhibitörler ise CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerinde CA-I ve CA-II'ye göre daha etkili bir inhibisyon etkisi göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: CA-I, CA-II, CA-IX, CA-XII, benzotiyazol, inhibisyon, sülfonamid, tümör

ABSTRACT

The Specific Inhibition Effects of Benzothiazole Sulfonamide Derivatives on Tumor-Associated Carbonic Anhydrase IX, XII (CA-IX, CA-XII) Isoenzymes and Cytosolic Carbonic Anhydrase I, II (CA-I, CA-II) Isoenzymes

Carbonic anhydrases (CAs, EC 4.2.1.1) involved in respiration and transport of CO_2/bicarbonate between metabolizing tissues and lungs, pH and CO_2 homeostasis, electrolyte secretion in various tissues, biosynthetic reactions (gluconeogenesis, lipogenesis, ureagenesis etc.), bone resorption, calcification, tumorigenicity and many other physiologic or pathologic processes.

CA-I and CAII are two major cytosolic CA isoenzymes that found in mammalian red blood cells. CA-IX and CA-XII are tumor associated isoenzymes which have contribution to tumor development by stimulating extracellular acidification.

This study deals with inhibition effects of new synthesized benzothiazole sulfonamide derivatives on CA-I, CA-II, CA-IX and CA-XII. All inhibition studies were performed with SX.18MV-R Applied Photophysics Stopped-Flow Kinetic Instrument. According to the findings of the study, AnA14 is the most potent inhibitor for CA-I and CA-II with the inhibition values 8,11 and 0,19 µM, respectively. The other benzothiazole sulfonamide derivatives have great inhibition effects for CA-IX and CA-XII isoenzymes.

Keywords: CA-I, CA-II, CA-IX, CA-XII, benzothiazole, inhibition, sulfonamide, tumor

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Å : Angstrom

AZA : Asetazolamid

CA : Karbonik Anhidraz Enzimi

CA-I : Karbonik Anhidraz İzoenzimi I

CA-II : Karbonik Anhidraz İzoenzimi II

CA-IX : Karbonik Anhidraz İzoenzimi IX

CA-XII : Karbonik Anhidraz İzoenzimi XII

DMSO : Dimetilsülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik Asit

EC : Enzim Kod Numarası

ECM : Ekstrasellüler Matriks

EU : Enzim Ünitesi

hCA : İnsan Karbonik Anhidraz Enzimi

HIF : Hipoksi İndükleyici Faktör

HEPES : 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit

I_{50} :Yüzde Elli İnhibisyona Sebep Olan Enzim Konsantrasyonu

pHe : Asidik ekstrasellüler pH

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Benign ve Malign Tümör Gelişimi…….. 4
Şekil 2.2. Protoonkogenlerin Onkogenlere Dönüşümü…… 6
Şekil 2.3. Tümör Supressör p53 ve p21 Proteinleri Arasındaki Etkileşim……...7
Şekil 2.4. Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları…… 8
Şekil 2.5. HIF Sinyal Yolağı…….. 12
Şekil 2.6. CA-II Enziminde Proton Transferi…… 14
Şekil 2.7. CA Enziminin Katalitik Mekanizması……... 15
Şekil 2.8. CA İzoenzimlerinin Hücre İçindeki Yerleşimi…….. 16
Şekil 2.9. İnsan CA-II (hCA-II) İzoenziminin Üç Boyutlu Yapısı……... 21
Şekil 2.10. CA-IX İzoenziminin Domain Organizasyonu……. 22
Şekil 2.11. CA-IX İzoenziminin Üç Boyutlu Yapısı……. 23
Şekil 2.12. CA-XII İzoenziminin Üç Boyutlu Yapısı…… 24
Şekil 2.13. CA-XII İzoenziminin Domain Organizasyonu…… 24
Şekil 2.14. Klinikte Sıklıkla Kullanılan CA İnhibitörleri…….. 26
Şekil 2.15. Sülfonamidlerin Genel Yapısı……. 27
Şekil 2.16. Sülfonamidlerin CA İnhibisyon Mekanizması…… 28
Şekil 2.17. Benzotiyazollerin Genel Yapısı……... 29
Şekil 2.18. Çalışmada Kullanılan İnhibitörlerin Genel Yapısı…….. 30
Şekil 3.1. AnA1'in Kimyasal Yapısı……..32
Şekil 3.2. AnA2'nin Kimyasal Yapısı……32
Şekil 3.3. AnA3'ün Kimyasal Yapısı……33
Şekil 3.4. AnA4'ün Kimyasal Yapısı…… 33
Şekil 3.5. AnA5'in Kimyasal Yapısı……..33
Şekil 3.6. AnA6'nın Kimyasal Yapısı……33
Şekil 3.7. AnA7'nin Kimyasal Yapısı…….. 34
Şekil 3.8. AnA8'in Kimyasal Yapısı……..34
Şekil 3.9. AnA9'un Kimyasal Yapısı…… 34
Şekil 3.10. AnA10'un Kimyasal Yapısı……34
Şekil 3.11. AnA11'in Kimyasal Yapısı……..35
Şekil 3.12. AnA12'nin Kimyasal Yapısı……35
Şekil 3.13. AnA13'ün Kimyasal Yapısı……35

Şekil. 3.14. AnA14'ün Kimyasal Yapısı…… 35
Şekil 3.15. Stopped-Flow Kinetik Aleti…… 37
Şekil 3.16. Stopped Flow Kinetik Aletinin Çalışma Prensibi…… 38
Şekil 3.17. Prolin Tuzlarının Değişik Konsantrasyonlarında Meydana Gelen CO_2 Hidrasyon Reaksiyonunun Stopped-Flow Kinetik Cihazı İle İncelenmesi……..... 40
Şekil 3.18. CA-II Enziminin Tek Basına Olan Adsorpsiyon Spektrumu, ve Disülfonamid Türeviyle Beraber Olan Artışı……. 40
Şekil 4.1. Ana1 'in CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…… 41
Şekil 4.2. AnA1'in CA-II (10-7 M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……. 42
Şekil 4.3. AnA1'in CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……..... 42
Şekil 4.4. AnA1'in CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…… 42
Şekil 4.5. AnA2'nin CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……... 43
Şekil 4.6. AnA2'nin CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……..... 44
Şekil 4.7. AnA2'nin CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……. 44
Şekil 4.8. AnA2'nin CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…… 44
Şekil 4.9. AnA3'ün CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……. 45
Şekil 4.10. AnA3'ün CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……..... 46
Şekil 4.11. AnA3'ün CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…….46
Şekil 4.12. AnA3'ün CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…….. .46
Şekil 4.13. AnA4'ün CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……47
Şekil 4.14. AnA4'ün CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……..... 48
Şekil 4.15. AnA4'ün CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…….48
Şekil 4.16. AnA4'ün CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……48
Şekil 4.17. AnA5'in CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……... 49
Şekil 4.18. AnA5'in CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……...50
Şekil 4.19. AnA5' in CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…… 50
Şekil 4.20. AnA5' in CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……... 50
Şekil 4.21. AnA6'nın CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……..... 51
Şekil 4.22. AnA6'nın CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……. 52
Şekil 4.23. AnA6'nın CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……...52
Şekil 4.24. AnA6'nın CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…..... 52
Şekil 4.25. AnA7'nin CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……..... 53
Şekil 4.26. AnA7'nin CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…….54

Şekil 4.27. AnA7'nin CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……54
Şekil 4.28. AnA7'nin CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…..... 54
Şekil 4.29. AnA8'in CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……... 55
Şekil 4.30. AnA8'in CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……...56
Şekil 4.31. AnA8'in CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……. 56
Şekil 4.32. AnA8'in CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……... 56
Şekil 4.33. AnA9'un CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……57
Şekil 4.34. AnA9'un CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……..... 58
Şekil 4.35. AnA9'un CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…….58
Şekil 4.36. AnA9'un CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……58
Şekil 4.37. AnA10'un CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……. 59
Şekil 4.38. AnA10'un CA-II (10-7 M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……...60
Şekil 4.39. AnA10'un CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…..... 60
Şekil 4.40. AnA10'un CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……. 60
Şekil 4.41. AnA11'in CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…….. 61
Şekil 4.42. AnA11'in CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……. 62
Şekil 4.43. AnA11'in CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……....62
Şekil 4.44. AnA11'in CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…..... 62
Şekil 4.45. AnA12'nin CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……... 63
Şekil 4.46 AnA12'nin CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…… 64
Şekil 4.47. AnA12'nin CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……..64
Şekil 4.48. AnA12'nin CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…….64
Şekil 4.49. AnA13' ün CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…… 65
Şekil 4.50. AnA13'ün CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……... 66
Şekil 4.51. AnA13'ün CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…..... 66
Şekil 4.52. AnA13'ün CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…… 66
Şekil 4.53. AnA14'ün CA-I (10^{-6} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……. 67
Şekil 4.54. AnA14'ün CA-II (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi……... 68
Şekil 4.55. AnA14'ün CA-IX (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…..... 68
Şekil 4.56. AnA14' ün CA-XII (10^{-7} M) Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi…… 68
Şekil 5.1. Benzotiyazol Grubu İçeren Sülfonamidlerin (AnA1-AnA6), CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri……75

Şekil 5.2. Benzotiyazol Grubu İçeren Sülfonamidlerin (AnA7-AnA14), CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri……75

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. CA İzoenzimlerinin Doku Ve Organlardaki Dağılımı, Fonksiyonları ve Amino Asit Sayıları..... 19
Tablo 2.2. Çalışmada Kullanılan İnhibitörlerin Kimyasal Olarak Adlandırılması……...31
Tablo 4.1. AnA1'in CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri……....43
Tablo 4.2. AnA2'nin CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri…….. 45
Tablo 4.3. AnA3'ün CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri……47
Tablo 4.4. AnA4'ün CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri…….. 49
Tablo 4.5. AnA5'in CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri…… 51
Tablo 4.6. AnA6'nın CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri…….. 53
Tablo 4.7. AnA7'nin CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri…….. 55
Tablo 4.8. AnA8'in CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri……..57
Tablo 4.9. AnA9'un CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri……59
Tablo 4.10. AnA10'un CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri……61
Tablo 4.11. AnA11'in CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri……63
Tablo 4.12. AnA12'nin CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri……. 65
Tablo 4.13. AnA13'ün CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri…….. 67
Tablo 4.14. AnA14'ün CA İzoenzimleri Üzerindeki I_{50} Değerleri…….. 69
Tablo 5.1. Benzotiyazol Grubu İçeren Sülfonamid Örneklerinin CA-I, CA-II, CA-IX, CA- XII İzoenzimleri Üzerinde Gözlenen İnhibisyon Değerleri…….. 73

1. GİRİŞ

Kanser, anormal hücrelerin kontrol dışında bölündüğü ve vücudun diğer dokularını istila ettiği hastalıkları tanımlamak için kullanılan bir terimdir (1). Klasik kanser tedavi yöntemleri, antitümör ajanların nonspesifik sistemik dağılımları, tümör bölgesine ilacın yetersiz miktarda ulaşması, tolore edilemeyen sitotoksisite, terapötik cevapları görüntüleyebilme yeteneğinin sınırlı olması ve çoklu ilaç direncinin gelişmesi gibi sorunlarla karşı karşıyadır (2). Tüm bu engelleri aşmak için günümüzde hedefe yönelik terapiler oldukça önem kazanmıştır.

Karbonik anhidrazlar (CA, E.C.4.2.1.1), karbondioksitin (CO_2) hidratasyonunu geri dönüşümlü olarak katalizleyen çinko (Zn^{+2}) metalloenzim ailesinin üyelerinden biridir (3). Karbonik anhidraz enzimi biyolojik sistemler için oldukça önemlidir ve bir çok önemli fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonda görev alır. CA-IX ve XII izoenzimleri 'nin tümörlerdeki yüksek ekspresyonu, ekstrasellüler alanın asidifikasyonu kolaylaştırması ile invazyon sürecinde rol almasından dolayı potansiyel birer antikanser hedefidir ve bu izoformlar ilaç dizaynında hedef olarak kullanılmaktadırlar (4). Tümör ilerlemesindeki rollerinden dolayı, CA-IX ve CA-XII'ye bağlanıp katalitik aktivitelerini inhibe eden moleküller geliştirmek birçok çalışmada amaçlanmıştır (5).

Sülfonamid grubu, CA inhibisyonu Zn^{+2} bağlayıcı fonksiyonu için kullanılan en önemli ve en geniş yapıdır (6). Bir çok sülfonamid bileşiği , CA-IX ve CA-XII izoenzimleri ile ilgili olan seçici CA inhibisyon aktivitesini bulmak için araştırılmaktadır (7). CA-IX ve CA-XII izoenzimlerine karşı seçici inhibisyon etkisi gösteren ve kanser tedavisinde onları hedefleyen sülfonamid türevleri geliştirmeye yönelik çalışmalar devam etmekte ve bu inhibitörlerin klinikte kullanımının uygun hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

Araştırmamızda yeni bir inhibitör serisi olan benzotiyazol grubu içeren sülfonamidlerin sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerine olan inhibisyon etkileri incelenmiş ve

bunların kanser tedavisine yönelik olarak CA-IX ve CA-XII'yi hedeflemede aday molekül olup olamayacakları belirlenmeye çalışılmıştır.

Elde edilecek sonuçların kanser tedavisinde kullanılacak yeni ilaçların dizaynı ve farmakolojik uygulamaları için son derece önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, tek bir hastalık olmayıp ortak özellikler paylaşan iki yüzden fazla hastalığı kapsayan genel bir tabirdir (8). Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü' nün 2012 verilerine göre dünyada 14,1 milyon yeni kanser vakası, 8,2 milyon kansere bağlı ölüm vakası, 32,6 milyon kanser hastası bulunmaktadır (9). Hücreler DNA'da meydana gelen hasarlar yüzünden kanser hücresi olurlar. Normal hücrelerde DNA hasar gördüğü zaman hücre ya onarılır ya da ölür. Kanser hücrelerinde ise DNA onarılmaz ve hücre ölümü görülmez. Bunun yerine vücudun ihtiyacı olmayan yeni hücreler yapılır.

Kanserler, başlangıç yaşlarına, büyüme oranlarına, yayılımlarına, evrelerine ve tedaviye verdikleri tepkilere göre çeşitlilik göstermektedirler. Buna rağmen tüm kanserler moleküler seviyede ortak karakteristik özellikler gösterirler.

Tüm kanser hücreleri iki ortak temel özelliği paylaşırlar:

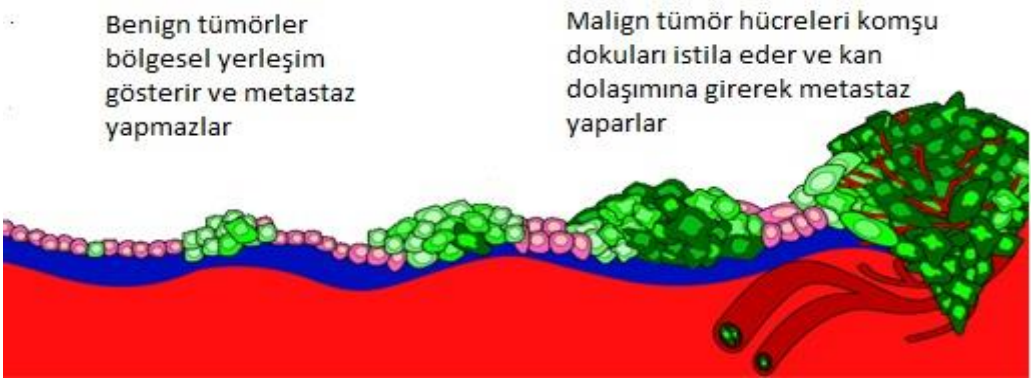
1.Anormal hücre büyümesi yada bölünmesi (hücre çoğalması)

2.Hücrelerin vücudun diğer bölümlerine yayılmasını ve istilasını (metastaz) engelleyen normal sınırlardaki anormallikler.

Bu işlevler, normal hücrelerde uygun bir şekilde, zamanında ve yerinde ifade edilen genler tarafından sıkıca denetlenmektedirler. Kanser hücrelerinde bu genler ya mutasyona uğrar ya da uygun olmayan bir şekilde ifade edilirler (10).

Kanser hücrelerini tehlikeli yapan, denetlenemeyen hücre çoğalması ve metastatik yayılmanın kombinasyonudur. Bir hücre, hücre büyümesi üzerindeki genetik kontrolünü kaybederse, çok hücreli bir yığın, iyi huylu tümör (benign tümör) olabilir. Bu tip tümörler ameliyatla alınabilir ve genellikle ciddi bir hasara yol açmazlar. Buna rağmen, eğer tümördeki hücreler bu yapıdan kurtulabilme, kan dolaşımına girebilme, diğer dokuları istila edebilme ve ikincil tümörler

biçimlendirebilme yetisini ele geçirmişse kötü huylu tümör (malignant tümör) olurlar. Malignant tümörlerin tedavileri zordur ve hayati tehlike oluşturabilirler (10) (Şekil 2.1) .



Şekil 2.1. Benign ve malign tümör gelişimi (11)

Tümörlerin tipi köken aldığı hücreye göre değişmektedir. 5 tip tümör vardır.

- Karsinomlar: Epitel hücrelerin değişimi sonucu oluşurlar. Kanserlerin çoğunu karsinomlar oluşturmaktadır.
- Sarkomlar: Kas, kemik, yağ ve bağ doku hücrelerinin değişimi sonucu oluşurlar.
- Lösemi: Beyaz kan hücrelerinin malignite kazanması sonucu ortaya çıkar.
- Lenfoma: Kemik iliği kökenli lenfatik sistem hücreleri kaynaklı kanser türüdür.
- Myelomalar: Antikor üreten özelleşmiş beyaz kan hücrelerinden kaynaklanan kanser türüdür (12).

Kanserin, hücre sinyali ve apoptozis gibi sayısız hücresel fizyolojik sistemi etkileyerek çok basamaklı bir karsinogenez süreci oluşturduğu bilinir, bu onu daha anlaşılmaz ve kompleks bir hastalık yapar (13).

2.1.1 Kanserin Moleküler Biyolojisi

Kanserde 3 gen kategorisi ya mutasyona uğrar ya da yanlış ifade edilir. İlk grup protoonkogenler olarak bilinir. Protoonkogenler, hücre bölünmesini arttıran ve hücre ölümünü engelleyen proteinleri üretirler. Bu genler mutasyon geçirdiklerinde onkogenler adını alırlar. İkinci grup tümör supressör genler olarak bilinirler. Tümör supressör genler hücre bölünmesini engelleyen ve hücre ölümüne neden olan proteinleri üretirler. Üçüncü grup DNA tamir genlerini içerir. DNA tamir genleri kansere neden olan mutasyonların engellenmesine yardımcı olur (12).

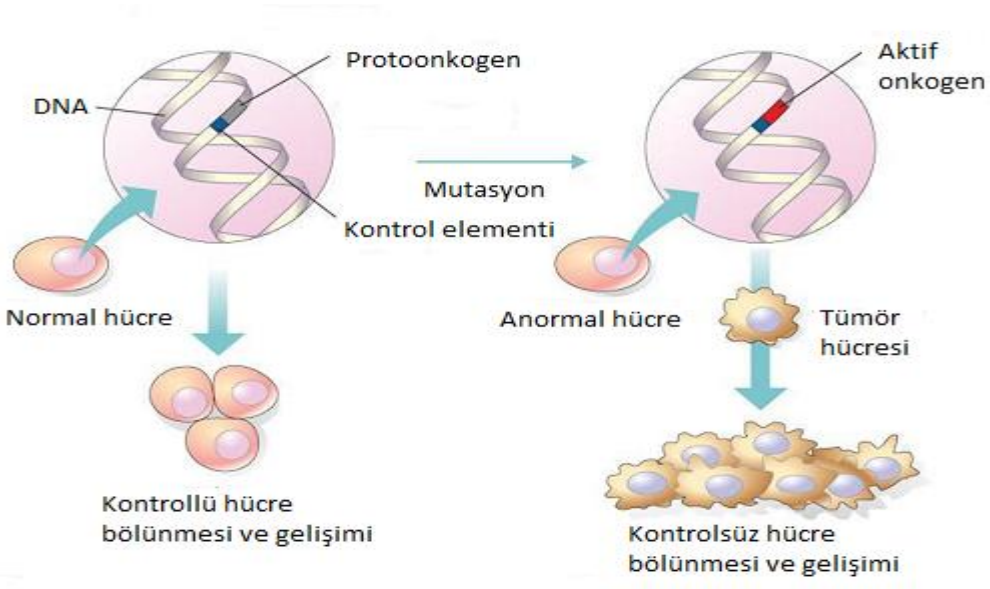
2.1.1.1. Protoonkogenler

Protoonkogenler, ürünleri hücre büyümesi ve bölünmesini ilerleten genlerdir. Protoonkogenler, diğer genlerin ifadelerini uyaran transkripsiyon faktörlerini ya da hücre bölünmesini uyaran sinyal iletim moleküllerini ve hücrenin, hücre döngüsü boyunca ilerlemesini sağlayan hücre döngüsü düzenleyicilerini kodlarlar. Protoonkogen ürünleri plazma zarında, sitoplazmada ya da çekirdekte bulunabilirler .

Bir protoonkogen mutasyona uğradığında veya hatalı ifade edildiğinde aktivitesi normal şekilde kontrol edilemez. Böyle bir durumda protoonkogen ürünleri hücreyi devamlı olarak bölünmesi için uyarırlar. Bir protoonkogen mutasyona uğradığında veya hatalı ifade edildiğinde kanser gelişimine katkıda bulunduğunda onkogen adını alır (10). Bir protoonkogenin onkogene dönüşümü; protonkogenlerde meydana gelen mutasyonlar, genlerin yeniden düzenlenmesi, protoonkogenlerin yeni bir konuma hareket etmesi ve protoonkogenlerin kopya sayılarındaki artışla olabilir. Bazen bir virüs DNA'sı protoonkogene yakın bir yere veya içine yerleşerek onkogen olmasına neden olur. Bu olayların hepsi genlerde değişime neden olarak kansere katkıda bulunur (Şekil 2.2) (12).

Onkogenler sinyal kaskadlarını sürekli bir şekilde aktive eder. Bunun sonucunda da hücre gelişimini uyaran faktörlerin üretimi artar. Örneğin; Ras proteini bir protoonkogen ürünüdür. RAS sinyal kaskadlarında, kaskadın açılma-kapanma anahtarı olarak görev görür. RAS'ta meydana gelen mutasyonlar kaskadın sürekli açık bir durumda bulunmasını ve bu yüzden kontrol edilemeyen hücre gelişimini

sağlar. Akciğer, kolon, tiroid, pankreatik karsinomları içeren tümörlerin %30'u RAS mutasyonlarına sahiptir (12).

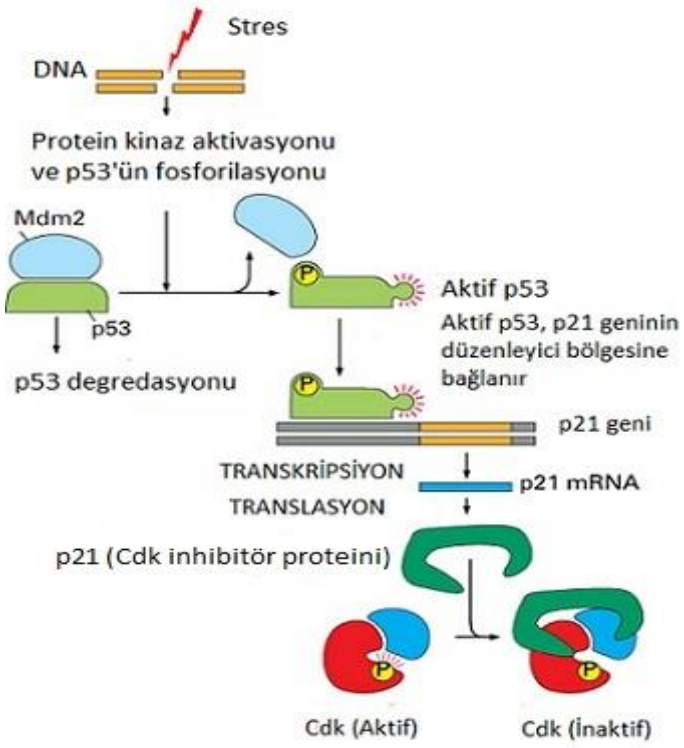


Şekil 2.2. Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü (14)

2.1.1.2. Tümör Supressör Genler

Tümör supressör genler, ürünleri hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen ve apoptozis sürecini başlatan genlerdir. Normal hücrelerde tümör supressör genler tarafından kodlanan proteinler DNA hasarına ya da dış çevreden gelen büyümeyi baskılayıcı sinyallere yanıt olarak hücre döngüsünü durdururlar. Ancak bu genler mutasyona uğradıklarında hücre döngüsü kontrol noktalarına yanıt verme ya da DNA hasarı arttığında hücreyi ölüm programına geçirme yeteneklerini kaybederler (10).

p53 proteini, tümör supressör genler tarafından kodlanmaktadır ve hücre bölünmesinde çok önemli bir yeri vardır. p53, DNA'ya bağlanarak p21 proteinin transkripsiyonunu aktive eder. p21, hücre döngüsünün G1 evresine giriş noktasında bulunan siklin bağımlı kinazın aktivitesini engeller (Şekil 2.3). Bu engel replikasyondan önce DNA' da hata varsa tamir edilmesine olanak sağlar. Eğer DNA hasarı onarılamayacak kadar büyükse p53 hücre ölümünü tetikler. Kanserle ilişkili mutasyonlardan en sık görüleni p53 geni ile ilgilidir.



Şekil 2.3. Tümör supressör p53 ve p21 proteinleri arasındaki etkileşim (15)

Siklin bağımlı kinazları inhibe ederek hücre döngüsünü durduran diğer tümör supressör proteinler p16 ve retinoblastoma (Rb) proteinleridir (12).

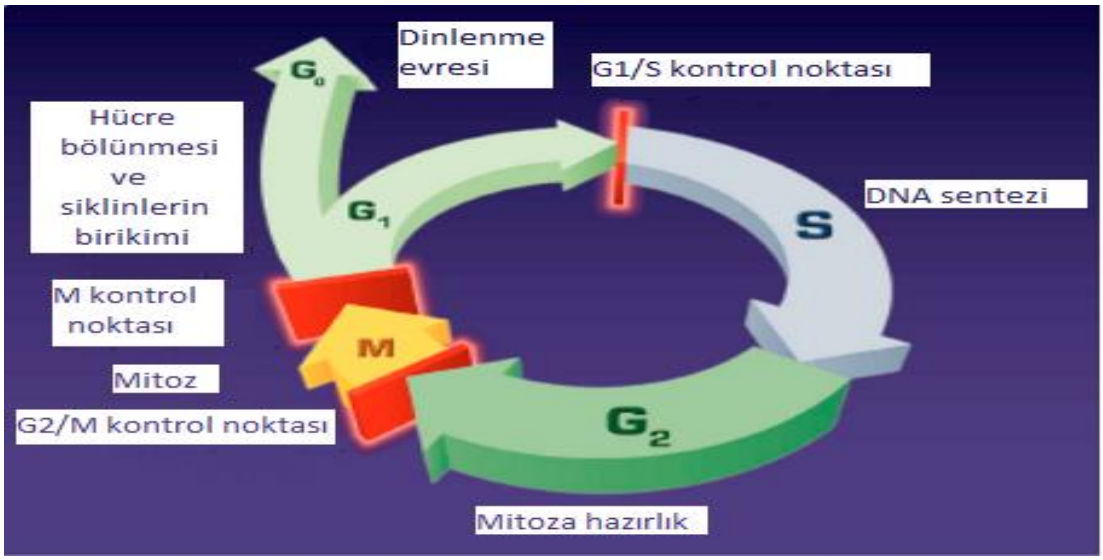
2.1.1.3. DNA Tamir Genleri

Kanser ile ilgili üçüncü gen grubu DNA'nın tamir edilmesini ve kromozom yapısının devamlılığını sağlamaya yarayan genlerdir. İyonize radyasyon, UV ışınları ve kimyasallar gibi çevresel faktörler DNA'ya zarar verebilir. Aynı zamanda DNA replikasyonunda meydana gelen hatalar mutasyonlara neden olabilir. Bazı özel gen ürünleri hücredeki kromozom hasarlarını tamir ederek mutasyonların minimum seviyeye inmesine yardımcı olurlar. Bir DNA tamir geni mutasyona uğradığı zaman ürün yapımı durdurulur. Bu yüzden DNA tamiri engellenir ve mutasyonlar hücrede birikir. Bu mutasyonlar hücrede kanseröz özelliklerin artmasına neden olurlar. Böylelikle kanser oluşumu tetiklenir (12).

2.1.2. Hücre Döngüsü ve Kanser

Tüm kanser hücrelerindeki temel sapmalardan birisi hücre çoğalması üzerindeki kontrolün kaybıdır (10). Normal hücreler hücre döngüsü ile uyumlu bir şekilde bölünür ve gelişirler (Şekil 2.4). Protoonkogen veya tümör supressör genlerde meydana gelen mutasyonlar hücre döngüsü tarafından düzenlenen hücre büyümesi ve gelişiminin dışına çıkılmasına neden olur. Böylelikle kanseröz hücre gelişir (12).

Birçok protein hücre döngüsündeki olayların zamanlamasını kontrol eder. Bu sayede hücrelerin sadece ihtiyaç duyulduğu zaman bölünmesi sağlanır. Bu düzenlenmenin kaybı kanserin ayırıcı özelliğidir. Hücre bölünmesini kontrol eden ana yapılar siklin-bağımlı kinazlardır. Her siklin-bağımlı kinaz , kendisine bağlanıp aktive eden özel bir siklinle kompleks oluşturur. Bu kompleksin kinaz kısmı hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli olan çeşitli proteinlere fosfat grubu ekler. Eklenen bu fosfatlar proteinin yapısını değiştirerek proteinin fonksiyonuna bağlı olarak aktivasyon veya inaktivasyona neden olur. Hücre döngüsünün G1, S ve M döngüsüne giriş noktalarında özel siklin-bağımlı, kinaz/siklin kompleksleri bulunmaktadır (12). Birçok siklin geninin kanser gelişimiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Örneğin; Siklin D1 geni kodlayan gen; meme, mesane, akciğer ve yemek borusu kanserlerinde; Siklin E geni ise bazı lösemilerde, meme ve kolon kanserinde aşırı derecede ifade edilmektedir (10).



Şekil 2.4. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları (12)

Normal hücrelerde hücre bölünmesi kanser hücrelerinden en az 4 yolla farklılık gösterir.

- Normal hücreler, bölünmek için dış çevredeki büyüme faktörlerine gereksinim duyarlar. Bu büyüme faktörlerinin sentezi inhibe edildiği zaman hücre bölünmesi durur. Kanser hücreleri bu faktörlere olan gereksinimini kaybetmiştir. Bu faktörler olsa da olmasa da bölünebilirler. Bunun bir sonucu olarak dokunun bir parçası gibi değil, bağımsız hücreler gibi davranırlar (12).

- Normal hücreler, kontakt inhibisyon gösterirler. Diğer hücrelerle temas ettiklerinde hücre bölünmesini durdurabilirler. Bu özellik kanser hücrelerinde kaybolmuştur. Kanser hücreleri diğer hücrelerle temas halinde olsa bile bölünmeye devam eder. Bunun sonucunda da geniş bir hücre yığını oluşur (12).

- Normal hücreler, her replikasyon sırasında kromozom uçlarını (telomerler) kısaltırlar. Gelişmekte olan hücreler telomeraz enzimi ile bu boşlukları doldururlar. Erişkin hücrelerde ise telomeraz eksiktir. Bu yüzden bu hücrelerin bölünme sayıları sınırlanmıştır. Kanser hücrelerinde telomeraz aktif halde bulunur. Bu da kanser hücrelerinde limitsiz sayıda hücre bölünmesi gerçekleşmesini sağlar (12).

- Normal hücreler, DNA hasarı olduğu zaman veya hücre bölünmesi anormal olduğu zaman hücre bölünmesini durdurur ve ölürler. Kanser hücreleri ise bölünmeye devam ederler. Bu hücreler hasarlı DNA içerir ve bölünmeye devam ettikçe hasar görmüş DNA organizmada birikir (12).

2.1.3. Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi tümör anjiyogenezini, tümör invazyonunu ve metastazı düzenleyen en önemli faktörlerden biridir (16). Mikroçevre tümör ilerlemesinde çok önemli rol oynadığı bilinen bir sistemdir ve tümör parankima hücreleri, fibroblastlar, mezenşimal hücreler, kan ve lenf damarları, tümör infiltre eden immün hücreler, kemokinler ve sitokinleri de içine alan pek çok önemli bileşikten oluşmuştur (17).

Tümör mikroçevresi malignant hücreler dışında, immün sistem hücreleri, tümör damarlanması ve lenf damarlarını içerir (18).

Tümör mikroçevresinde özellikle vasküler endotelyal hücrelerin proliferasyonu ve yeni kan damarlarının oluşumu tümöre besin sağlayarak, tümör gelişmesi ve metastazı tetikler. Kanser ilişkili fibroblastlar da, anjiyogenezi stimüle ederek , tümör gelişmesi ve metastazı tetikler. İmmün hücreler özelliklede makrofajlar mikroçevredeki toksik hasarlara karşı koyar ve tümör gelişimine yardımcı olurlar. Lenf endotelyal hücrelerinin proliferasyonu ve lenfatik damar yoğunluğunun artması da tümör metastazına yardımcı olur (16).

Tümör mikroçevresinde bulunan ekstrasellüler matriks (ECM), tümör mikroçevresindeki hücreler için yalnızca fiziksel bir iskelet sağlamaz aynı zamanda kanser hücrelerinin yayılması ve gelişiminde dinamik bir role sahiptir. Özellikle hücrelerin ECM'e adezyonu hücrelerin tümör mikroçevresine göçünde ya da tümör mikroçevresinin dışına çıkmasında anahtar rol oynar. ECM aynı zamanda anjiyogenik faktörler ve kemokinler gibi hücre yüzey reseptörleri ile etkileşim halinde olan ve hücrenin direnç-elastiklik elde etmesini sağlayan büyüme faktörlerini içerir (19).

Asidik ekstrasellüler pH'da tümör mikroçevresinin diğer bir önemli özelliğidir. Asidik ekstrasellüler pH'ın kanser hücrelerinin anaerobik glikoliz sonucu olarak görülen laktat üretimi sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Na^+/H^+ değiştiricisi, H^+-laktat taşınımını yapan H^+-laktat ko-transporter, monokarboksilat taşıyıcıları, proton pompası (H^+-ATPaz) gibi taşıyıcılar ekstrasellüler hidrojen salınımı sağlayarak asidik ekstrasellüler pH' a katkıda bulunurlar (20).

Tümör hücrelerinde pentoz fosfat yolu ile aşırı derecede karbondioksit (CO_2) üretimi görüldüğü için karbonik anhidraz enzimide asidik ekstrasellüler pH'a katkıda bulunur. Asidik ekstrasellüler pH, çeşitli lizozomal enzimleri aktif hale getirir. Aynı zamanda çeşitli pro-metastatik faktör genlerinin ekspresyonunu indükler (21).

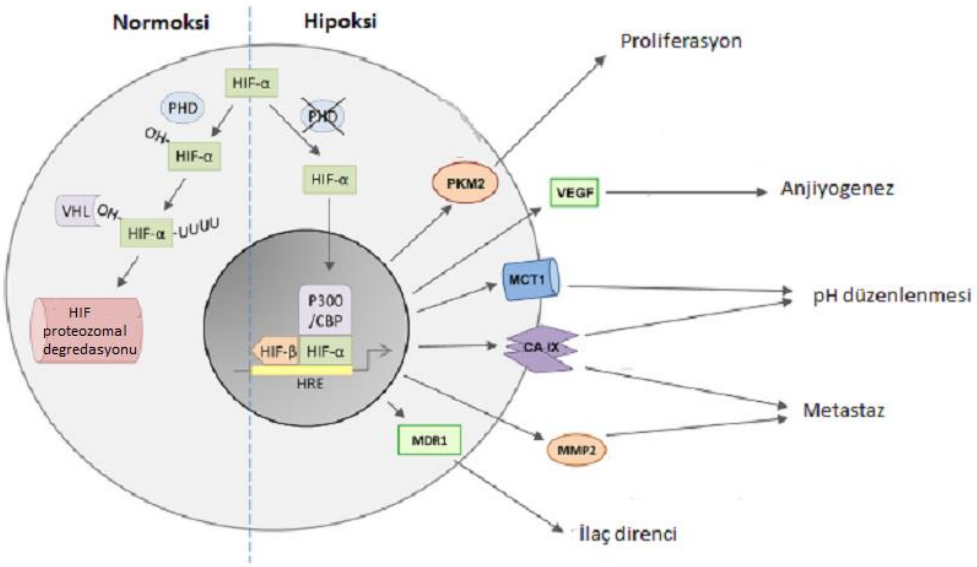
2.2. Hipoksi

Hipoksi, vücut içinde veya dışında herhangi bir yerde oksijen basıncının azalması anlamına gelir ve solid tümörlerin çoğunda görülen önemli mikroçevresel bir baskıdır (22, 23). Hipoksik hücreler oksidatif DNA hasarı, DNA zincir kırıkları, genetik hatalar gibi stres indüklü hasarlara maruz kalırlar. Bu olaylar hücrenin büyümesini kısıtlar ve hücre ölümüne neden olur. Ancak kanser hücreleri hipoksik şartlara adapte olmaları ve hayatta kalmalarını sağlayacak genetik değişiklikler geçirirler. Bunun sonucunda da hayatta kalmaya devam eder, daha invaziv, metastatik bir fenotip kazanır, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi yöntemlerine karşı direnç geliştirirler (24).

Tümör hücreleri düşük oksijen konsantrasyonlarına maruz kaldığı zaman çoğu faktörü kontrol eden hipoksi indükleyici faktör-1'in (HIF-1) ekspresyonunu artırırlar. HIF-1 sinyalinin aktivasyonu düşük oksijen koşullarında yaşayabilmek için önemli bir adaptasyondur (23).

HIF'ler, DNA'ya heterodimer olarak bağlanan temel helix-loop-helix yapısındaki transkripsiyon faktörlerinden PAS (Per-ARNT-Sim) ailesi ile ilişkilidir (25). Oksijen bağımlı HIF-1α altünitesi ve oksijen bağımsız HIF-1β altünitesi bulundurur. HIF-1β alt birimi aril hidrokarbon nükleer reseptörü (ARNT) olarak da bilinir (26).

Normoksik koşullar altında α alt biriminin Pro 402 ve Pro 504 rezidüleri prolil hidroksilaz domain proteini (PHD2) ile O_2 bağımlı hidroksilasyona mağruz kalır. Bu modifikasyon α alt biriminin von-Hippel Lindau (VHL) tümör supressör proteini ile etkileşim kurmasına neden olur. Bu sayede α alt biriminin proteozomal degredasyonu sağlanır (24). α alt birimi hipoksik ortamda degrede olmaz. Çekirdeğe taşınır ve β altbirimi ile dimerize olur. Bu kompleks HIF hedef genlerinin enhensır promotor bölgesininde içinde bulunduğu hipoksi duyarlı elementin 5-RCGTG-3 konsensus sekansına bağlanır (Şekil 2.5) (26). Hipoksi duyarlı element tümörlerin hipoksik ortama adaptasyonda, anjiyogenez, anaerobik enerji sağlanması, metabolik regülasyon, pH dengesi ve apoptozisde görev alan genlerin transkripsiyonuna yardımcı olur (27). HIF-1'in yüzlerce hedefi arasında en çok çalışılanlar vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve karbonik anhidrazlardır (24).



Şekil 2.5. HIF sinyal yolağı (24)

2.3. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz enzimleri (CAs, EC 4.2.1.1) CO_2'in bikarbonata (HCO_3^-) çevirimini ve proton (H^+) salınımını geri dönüşümlü olarak katalizleyen, çinko (Zn^{+2}) içeren metalloproteinlerdir.

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

CO_2 tüm yaşayan organizmalarda bulunur, tüm yaşayan hücrelerde anahtar molekül olduğu düşünülür ve HCO_3^- ile denge halinde bulunur (28). Doğada, CO_2, $CO_2+H_2O \leftrightarrow HCO_3^-+H^+$ reaksiyonu ile geri dönüşümlü olarak hidrate olur (29). Bu geri dönüşümü sağlayan enzim CAdır.

CA'lar, Zn^{+2} bağımlı metalloenzimler olarak bilinirler ancak kadmiyum (Cd^{+2}) veya demir (Fe^{+2}) iyonlarını içermesi ile de tanımlanabilirler (30). CA ilk olarak memeli eritrositlerinden daha sonraları ise insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteri ve bitki türleri dahil olmak üzere pek çok kaynaktan saflaştırılmıştır (31).

2.3.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Tarihçesi

CA aktivitesi ile ilgili ilk çalışmalar 1920'li yıllarda hemolize edilmiş kan ve serum örnekleriyle CO_2 salınım çalışmaları yapılırken bulunmuştur. CO_2 salınımının çok yüksek bir miktarda olduğu görülmüş ve bu reaksiyona bir katalistin neden olabileceği ileri sürülmüştür. Bir kaç yıl sonra bu katalistin bir enzim olduğu bulunmuş ve bu enzime karbonik anhidraz (CA) adı verilmiştir (32). CA ilk defa 1939 yılında Meldrum ve Roughton tarafından insan akciğerlerinin yüzeyinde ve kanın transport sisteminde CO_2 taşınmasını çalışırken izole edilmiştir. 1939 yılında CA'ın aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içerdiği ve moleküler ağırlığının yaklaşık 30 kDA olduğu Keilin ve Mann tarafından rapor edilmiştir. CA'ın geniş anlamda saflaştırılması ve karakterizasyonu Lindskog tarafından 1960 yılında sığır eritrositlerinden yapılmıştır (33). Şimdiye kadar keşfedilen tüm CA izoenzimlerinin sayısı 16' dır. Bu izoenzimler katalitik aktivite, subsellüler lokalizasyon ve inhibitörlere duyarlılık bakımından farklılık göstermektedirler. 1970' li yıllarda sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I ve CA-II'nin aminoasit sekansları ve X-ray kristal yapıları ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (34). 1990' lı yıllarda ise tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX Pastorekova ve arkadaşları tarafından, CA-XII ise Türeci ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (35, 36).

2.3.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı

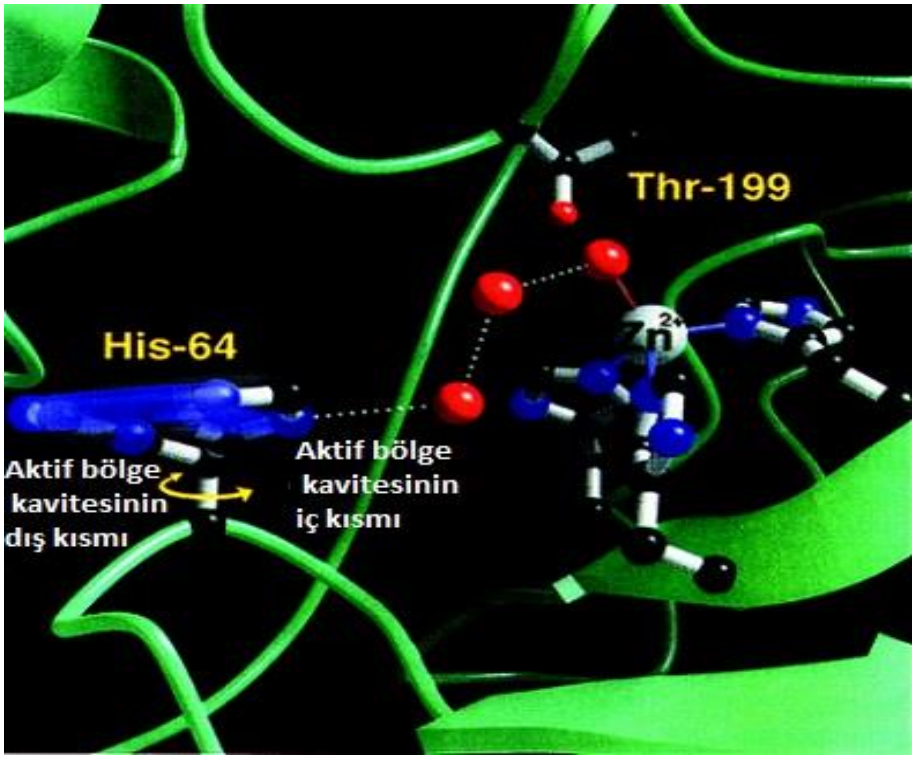
CA üç adet histidin (His) rezidüsü, su (H_2O) molekülü veya hidroksit (OH^-) iyonu tarafından koordine edilir. Bu moleküller CA'ın Zn^{+2} iyonu üzerine etki ederek, katalitik aktivitenin ve inhibisyonun düzenlenmesinde rol oynarlar (37).

Zn^{+2} iyonu, aktif bölgedeki koni şeklinde yaklaşık 15 Å genişliğinde ve 15 Å derinliğinde bir yarığın dip kısmında bulunur (38).

CA'ın moleküler yapısında, katalitik fonksiyonu için gerekli 4 önemli bileşen vardır. Bunlar; Zn^{+2} bağlayıcı bölge, substrat ilişkili oyuk, threonin (Thr) 199 ilmek yapısı ve protein mekik mekanizmasıdır. Zn^{+2} bağlayıcı bölge üç adet His rezidüsü içerir (His94, His96, His119). Bu His rezidüleri direkt olarak Zn^{+2} iyonuna bağlanır. Glutamin 92 (Gln92), Asparajin 244 (Asn244), Glutamat 117 (Glu 117) rezidüleride

Zn^{+2} iyonunu indirekt olarak etkileyip stabilizasyonuna yardımcı olurlar. Substrat ilişkili oyuk 6 adet non-polar aminoasitten oluşur. Bu aminoasitler hidrofobik bir cep oluşturur. Bu hidrofobik cep Zn^{+2} bağlayıcı bölgeye komşudur. CO_2'in izole edilmesi ve Zn^{+2} bağlayıcı OH^-'e yönlendirilmesinden sorumludur. Thr 199 loop yapısının temel fonksiyonu Zn^{+2} bağlı OH^-'i kataliz için yönlendirmektir. Zn^{+2} bağlı OH^-, Thr 199 ile hidrojen bağı oluşturur. Bunun sonucunda da molekül nükleofilik atak için hazır hale gelir (39). Proton mekik sistemi ise Zn^{+2} iyonu bağlı H_2O molekülünden bir proton alır ve sitoplazmadaki tampon moleküllere iletir. Aktivitesi yüksek olan CA izoenzimlerinde His64 rezidüsü proton transferini sağlamaktadır (40).

Şekil 2.6'da CA-II enziminde proton transferi görülmektedir. Aktif merkezde üç His rezidüsü ile koordineli Zn^{+2} bulunur. H_2O moleküllerinden oluşan zincir, Zn^{+2} bağlı OH^- iyonundan His 64 rezidüsüne bir proton aktarır. Yüksek pH'da His 64 rezidüsü aktif bölge kavitesinin iç kısmına dönüktür. Ancak protonasyon olayı gerçekleştiği zaman ortamın pH'ı düşer ve His 64 rezidüsünün imidazol halkası konformasyon değiştirerek aktif bölge kavitesinin dış kısmına yönelir. Bu olay sayesinde protonun dış ortama aktarılması sağlanır (6).



Şekil 2.6. CA-II enziminde proton transferi (6)

2.3.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

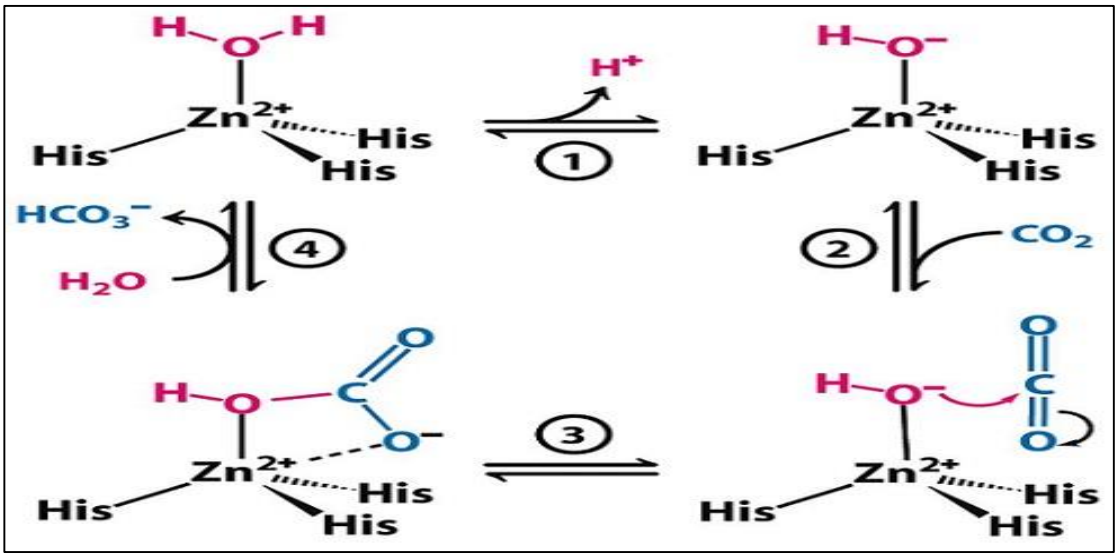
CA'ın katalitik mekanizması iki ana basamaktan oluşur.

Basamak 1: Zn^{+2} bağlı OH^- iyonu ile enzim, nükleofilik atak tarafından CO_2'i kabul eder. Bu sayede HCO_3^- üretimi gerçekleşir. Daha sonra H_2O, Zn^{+2}'ya bağlanarak HCO_3^- ile yer değiştirir (41,42).

$$CO_2 + EZnOH^- \rightleftharpoons EZnHCO_3^- \underset{H_2O}{\overset{H_2O}{\rightleftharpoons}} EZnH_2O + HCO_3^-$$

Basamak 2: Bu basamak ortama proton salarak enzimin aktif bölgesinin rejenerasyonunu yapar. Zn^{+2} bağlı OH^-, aktif bölgeden proton transferi ile temel formda yeniden üretilir. Bu durum, His64 rezidusunun aktifleşmesi ya da reaksiyon ortamındaki tampon çözeltiler ile olur. Bu da katalizin sınırlayıcı basamağını oluşturur (41,42).

$$EZnH_2O + B \rightleftharpoons EZnOH^- + BH^+$$

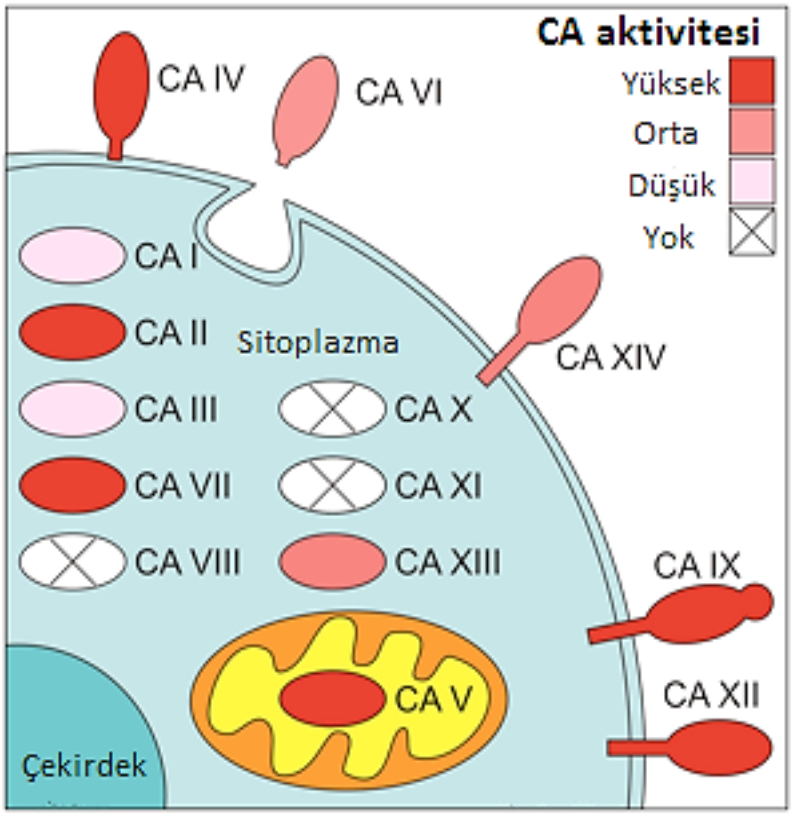


Şekil 2.7. CA enziminin katalitik mekanizması (43)

2.3.4. Karbonik Anhidraz Enzim Ailesi

CA'lar, arkea, prokaryotik, ökaryotik hücrelerde bulunur ve α-, β-, γ-, δ-, ve ζ-CA'lardan oluşan beş ayrı gen ailesi tarafından kodlanırlar. Bu aileler arasında önemli aminoasit sekans benzerlikleri bulunmaz (44, 45). Bu beş ailenin yanında yapılan son çalışmalarla Malaria patojeni olan *Plasmodium falciparum*'da yeni bir CA ailesi olan η-CA ailesinin varlığı gösterilmiş ve literatürde altıncı CA ailesi olarak yerini almıştır (46, 47).

Memeliler CA'ın ilk ailesi olan α-CA'ları kodlarlar. Şimdiye kadar 16 CA izoenzimi karakterize edilmiştir. Bunlardan, CA I, II, III, VII ve XIII sitozolik izoenzimler, CA IV, IX, XII ve XIV hücre membranına bağlı izoenzimlerdir. CA VA ve VB mitokondriyal izoenzimler, CA VI ise sekrete edilen tek izoenzimdir. Bunların yanında CA ilgili proteinler adı verilen üç akatalitik form bulunmaktadır (Şekil 2.8). Bu proteinlerin inaktif halde bulunmaları Zn^{+2}-bağlı His rezidularını kaybetmelerinden kaynaklanmaktadır (44, 48, 49).



Şekil 2.8. CA izoenzimlerinin hücre içindeki yerleşimi (50)

2.3.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Önemi

CA enzim ailesi katalitik aktivite, subselüler lokalizasyon ve inhibitörlere duyarlılık bakımından farklılık gösterirler ve bir çok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol oynarlar (51). CA'lar CO_2 ve HCO_3^- iyonları arasındaki dönüşümü sağlarlar. Bu yüzden metabolize dokular ve akciğerler arasında CO_2 / HCO_3^- transport ve respirasyonu, pH ve CO_2 homeostazisi, çeşitli doku ve organlarda elektrolit sekresyonu, biyosentetik reaksiyonlar (glukoneogenez, lipogenez, ürogenez vb.), kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon, tümörojenisite bunun yanı sıra pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte görevlidirler (52).

CA-I ve CA-II sitozolik CA izoenzimleridir. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonu metabolizma ürünü olan CO_2 molekülünü, doku kılcal damarlarında HCO_3^- bileşiğine akciğer pulmoner kapillerde ise HCO_3^-'ın CO_2'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almaktadır (38). CA II izoenzimi en çok çalışılan izoenzim olup CA'lar içinde en yüksek turnover sayısına sahip olan izoenzimdir (42). Ayrıca sodyumun göze taşınmasının primer transportunda rol oynar ve intraoküler basıncın düzenlenmesine yardımcı olur (53).

CA-III birçok inflamatuvar hastalıkla karakterize olan oksidatif streste rol oynamaktadır ve iskelet kasında bol şekilde eksprese olmaktadır (54). CA izoenzimlerinden bu üçü yakından ilişkili ve polimorfiktir. CA-II ve CA-I'in genleri aynı kromozom üzerinde lokalize olmuşlardır ve doku ekspresyonları bağımsız olarak düzenlenebilir (55).

CA-IV, CA izoenzimleri içinde membran bağımlı olarak tanımlanan ilk izoenzimdir. Epitelyal ve endotelyal hücrelerin plazma membranlarında eksprese olmaktadır. CA-IV izoenzimi pH düzenlenmesi ve CO_2-HCO_3^- transportunu sağlamaktadır. Ayrıca CA-IV geninde meydana gelen mutasyonlar Retinitis pigmentosa ile ilişkidir (56, 57).

Mitokondriyal izoenzimler olan CA-VA ve CA-VB antiobezite ajanları olarak hedeftirler (58). CA-VI salgısal bir izoenzimdir. Tükürük ve süt bezlerinde yüksek oranda eksprese olmaktadır. CA-VI'nın oral kavite ve yemek borusunun üst kısmında pH dengesinin sağlanmasında görevli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca

yapılan çeşitli çalışmalarla CA-VI'nın diş çürüklerine karşı koruyucu bir role sahip olduğu ve tat almada görev aldığı ileri sürülmüştür (59, 60).

CA-VII sitozolik bir izoenzimdir. Korteks, hippokampüs ve talamusta yüksek oranda eksprese olmakta, epilepsi ve malignant beyin tümörleri ile ilişkisi bulunmaktadır (61). CA-VIII, CA ilişkili bir proteindir, CO_2 hidratasyonunu gerçekleştiremez. CA-VIII nörodejeneratif hastalıklarda, kolorektal ve akciğer kanserlerinde rol oynar (49).

CA-IX ve CA-XII izoenzimleri transmembran proteinleridir ve kanserde tedaviye yönelik olarak hedeftirler. Hipoksiye cevap olarak ekspresyonları artar. Ekstrasellüler asidifikasyonu tetikleyerek tümör gelişimine katkıda bulunurlar (62).

CA-X ve CA-XI, CA ilişkili proteinlerdir. CA-X epifiz bezinde yüksek derecede eksprese olur. CA-X'un uyku düzeninin sağlanmasında işlev gördüğü düşünülmektedir. Filogeni çalışmaları CA-XI'in CA-X'dan köken aldığını göstermiştir. CA-XI merkezi sinir sisteminde eksprese olur ve birçok kanser türüyle ilişkilidir (63).

CA-XIII üreme organlarında diğer dokulardan daha yüksek bir şekilde eksprese olur. Burada pH ve iyon dengesinin düzenlenmesini sağlayarak döllenme için uygun koşulların düzenlenmesine yardımcı olur (64). CA-XIV membran bağımlı bir izoenzimdir ve merkezi sinir sisteminde yüksek derecede eksprese olur. Asit-baz dengesinin düzenlenmesinde rol oynar. CA-XV'de membran bağımlı bir izoenzimdir. Pek çok türde ekspresyonu görülmesine rağmen, insan ve şempanzelerde ekspresyonu görülmez (65, 66) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. CA izoenzimlerinin doku ve organlardaki dağılımı, fonksiyon ve amino asit sayıları (Parantez içindeki sayılar matür polipeptid zincirindeki aminoasit sayısını göstermektedir) (28)

İzoenzim	Aminoasit sayısı	Fonksiyon	Bulunduğu doku/organ
CA-I	261 (260)	Antireflü cevabı, gaz değişimi ve iyon transportu	Eritrositler Gastrointestinal sistem
CA-II	260 (259)	Antireflü cevabı, kemik rezorpsiyonu, aköz hümör üretimi, sperm hareketliliği, üre asidifikasyonu, serebrospinal sıvı salgılanması, gaz değişimi ve CO_2 nazal kemosensitivitesi	Hemen hemen tüm hücrelerde
CA- III	260 (259)	Antireflü cevabı, yağ asidi metabolizması, oküler sıvı taşınımı ve homeostazı	İnsan embriyo notokordu ve iskelet kası Tip I kas çözünebilir proteinlerinin % 8'inde
CA-IV	312 (266)	CO_2 nazal kemosensitivitesi, antireflü cevabı, HCO_3^- reabsorbsiyonu, NH_4 çıkışı, pH düzenlenmesi,oküler sıvı üretimi, gaz değişimi, serebral kan akışı	Gastrointestinal sistem Böbrek Endotelyum Pankreas Tükürük bezleri Kalp kası Göz Kolon
CA-VA	305 (267)	Adipositler ve biyosentetik reaksiyonlarda piruvat karboksilaz için HCO_3^- sağlamak	Akciğer Böbrek Pankreas adacıkları ve beta hücreleri
CA-VB	317 (284)	Biyosentetik reaksiyonlar, amonyak detoksifikasyonu	Pankreas Böbrek Tükürük bezleri Kalp ve iskelet kası Gastrointestinal mukoza Omurilik
CA-VI	308 (291)	pH düzenlenmesi, antireflü cevabı, karsinojenlere karşı koruma, tat duyusu	Tükürük Gözyaşı ve süt Nazal bezler Gözyaşı, meme,minör tükürük bezleri
CA-VII	264	Serebrospinal sıvı üretimi	Merkezi sinir sistemi
CA-VIII	290 (289)	Fonksiyonsuz	Purkinj hücreleri
CA-IX	459 (422)	pH düzenlenmesi, hücre adezyonu, proliferasyonu ve farklılaşması, iyon transportu	Gastrointestinal sistem Çoğu kanser türü
CA-X	328	Fonksiyonsuz	Beyin ve merkezi sinir sistemi Miyelin kılıflar Kolorektal tümörler ve yüzey mikrovillusları
CA-XI	328	Fonksiyonsuz	Beyin ve merkezi sinir sistemi Omurilik Tiroid bezi
CA-XII	354 (330)	pH düzenlenmesi, aköz hümör üretimi, HCO_3^- absorbsiyonu	Kolon Böbrek Prostat Kanser türleri
CA-XIII	262	Böbrek, gastrointestinal kanallar ve üreme sisteminde asit baz dengesinin sağlanması	Timus İnce bağırsak Kolon Dalak Prostat bezi Ovaryum Testisler
CA-XIV	334 (322)	HCO_3^- absorbsiyonu, sinirlerde sinyal iletilmesi	Merkezi sinir sistemi Yetişkinlerde; Kolon, Böbrek İskelet kası, Mesane

2.3.6. Sitozolik Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

CA-I ve CA-II memeli kırmızı kan hücrelerinde bulunan iki ana CA izoformudur (67).

2.3.6.1. Karbonik Anhidraz I

CA-I'in moleküler ağırlığı 29 kDA'dur ve memeli kırmızı kan hücrelerinde en bol bulunan proteinlerden biridir.

CA-I başlıca solunum ve asit-baz dengesinin düzenlenmesinde görev alır. CA-I gastrointestinal kanal, miyoepitel hücreleri, adipoz doku, ter bezleri, silier vücut epiteli, lens, korneal epitel, langerhans adacıklarının alfa hücreleri gibi farklı hücre ve dokularda eksprese olur (68).

CA-I, CA-II'nin sahip olduğu katalitik aktivitenin beşte birine sahiptir ve His64 rezidüsünün pKa değeri proton transferi için çok düşüktür (69).

CA-I omurilik ve sakroiliak eklemlerde anormal kemik oluşumu ile karakterize olan Ankilozan spondilit hastalığında in vitroda kalsiyum presipitasyonuna neden olmaktadır. Chang ve grubu CA-I'in biyomineralizasyon ve yeni kemik formasyonunda önemli rolü olabileceğini söylemişlerdir (70). Ayrıca CA-I'in prostat kanserinde prostat spesifik antijen gibi tanıda görev görebileceği Takakura ve ark. tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir (71).

2.3.6.2. Karbonik Anhidraz II

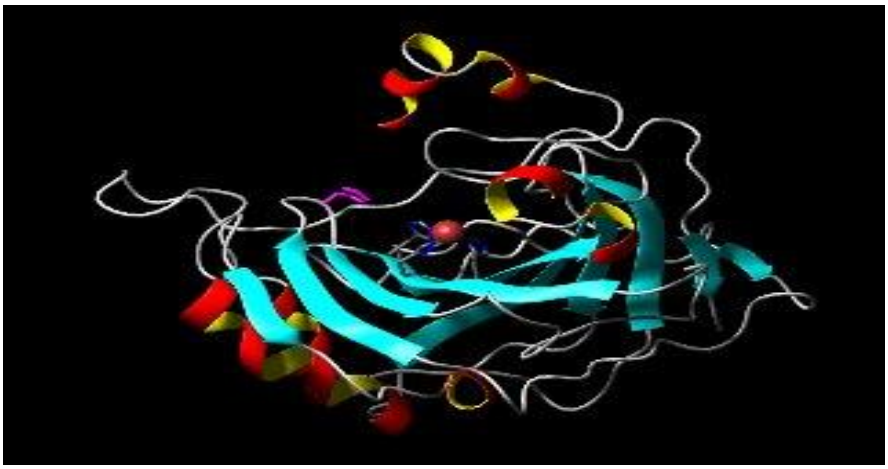
CA-II tüm CA'ların içinde en yüksek turnover oranına sahip ve en çok çalışılan 29 kDA ağırlığında monomerik bir proteindir ($k_{cat} = 10^6\ s^{-1}$) (Şekil 2.9) (42, 73). His64 rezidüsü aktif bölgeye yakın bulunmaktadır ve hızlı proton transferinden sorumludur (74).

CA-II eksikliği , kemik rezorpsiyonu, renal asidifikasyon ve serebral kalsifikasyonda temel rol oynamaktadır (75). Ayrıca CA-II osteoklastlar, parietal hücreler ve böbrek interkalat hücrelerinin aktivitesinin ve asit-baz dengesinin

sağlanmasında etkindir (76). CA-II göze sodyumun primer transport mekanizmasında yer alır ve sonuç olarak, intraoküler basıncın düzenlenmesinden sorumludur (53).

Fizyolojik fonksiyonlarına ek olarak, literatürde CA-II'nin kanser ile ilişkili olduğundan da söz edilmiştir. CA-II, kanser hücreleri ve mikroçevre arasında pH dengesinin düzenlenmesinde ana rol oynamaktadır (77).

Kanser hücre mikroçevresinin koşullarını andıran *in vitro* hücre kültüründe endoteliyal hücrelerde CA-II ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (78). Yoshiura ve arkadaşları CA-II'nin akciğer, renal, özofagal ve melanom kanserlerinin tümör damar endotelinde eksprese olduğunu göstermiştir (79). Parkkila ve arkadaşları ise CA-II'nin gastrointestinal stromal tümörlerde biyomarker olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (80).



Şekil 2.9. CA-II izoenziminin üç boyutlu yapısı (81)

2.3.7. Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

CA-IX ve CA-XII hipoksi ile indüklenebilir, insan α-CA ailesinin tümör ilişkili üyeleridir (82). Ivanov ve ark. tarafından Hippel-Lindau (VHL) hedef genleri olarak tanımlanmıştır (83). Yabanıl tip VHL proteinin CA-IX ve CA-XII transkripsiyonunu baskıladığı görülmüş ve bu izozimlerin VHL-aracılı kanser gelişiminde potansiyel rol oynayabileceği belirtilmiştir (84).

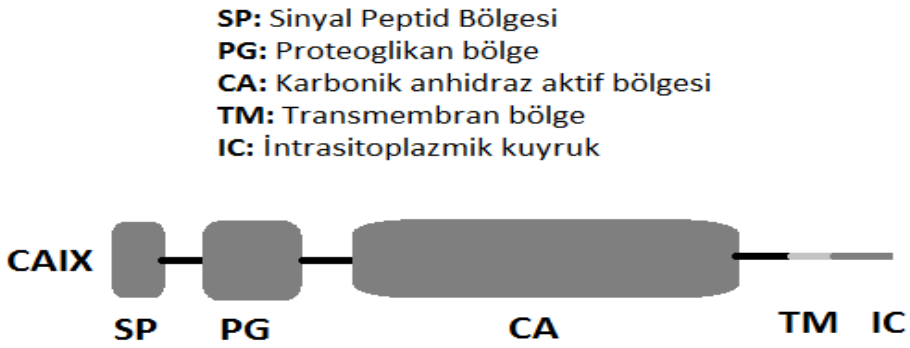
CA-IX ve CA-XII pH düzenleyen enzimlerdir ve her ikiside potansiyel antikanser hedefleri olarak kullanılabilirler. Bu izoenzimlerin yüksek katalitik aktiviteleri sayesinde tümör mikroçevresinde asidifikasyonu sağlamaları ile tümör hücrelerinin ekstrasellüler matrix boyunca ilerlemesi kolaylaşmaktadır (85, 86).

2.3.7.1. Karbonik Anhidraz IX

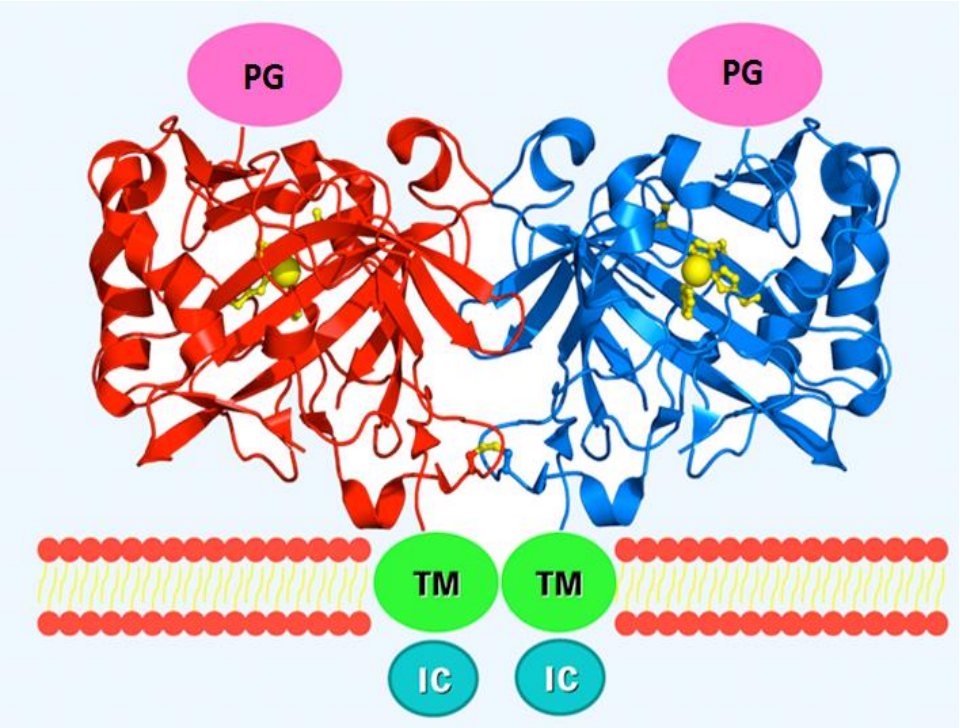
CA-IX proteini 9p12-13 kromozomal lokusunda bulunan CA9 geninin ürünüdür ve CA-IX proteininin yapısal domeynlerini kodlayan 11 ekzondan oluşur (87). CA-IX, N-terminal proteoglikan benzeri domaini (PG), CA katalitik domaini, transmembran segmenti (TM) ve intrasitoplazmik kısmı (IC) ile tanınır (88) (Şekil 2.10-2.11).

CA-IX ilk olarak Pastorek ve ark. tarafından HeLa hücrelerinde keşfedilmiş ve tümör-ilişkili integral plazma membran antijeni (MN) olarak tanımlanmıştır (5). CA-IX'un , kanser proliferasyonunda kritik rol oynadığı gösterilmektedir. Kanserlerin belli tiplerinde CA-IX overekspresyonu , kanser diyagnozu ve prognozu için CA-IX'un biyobelirteç olarak kullanılmasını sağlamıştır (73).

CA-IX yüksek bir oranda özofagus, böbrek, akciğer ve meme gibi bazı tümör dokularında eksprese olur. Diğer yandan normalde yüksek miktarda CA-IX ekprese eden mide ve safra kesesi gibi dokular tümör oluşumunda bu ekspresyonlarını kaybederler (86).



Şekil 2.10. CA-IX izoenziminin domain organizasyonu (38)

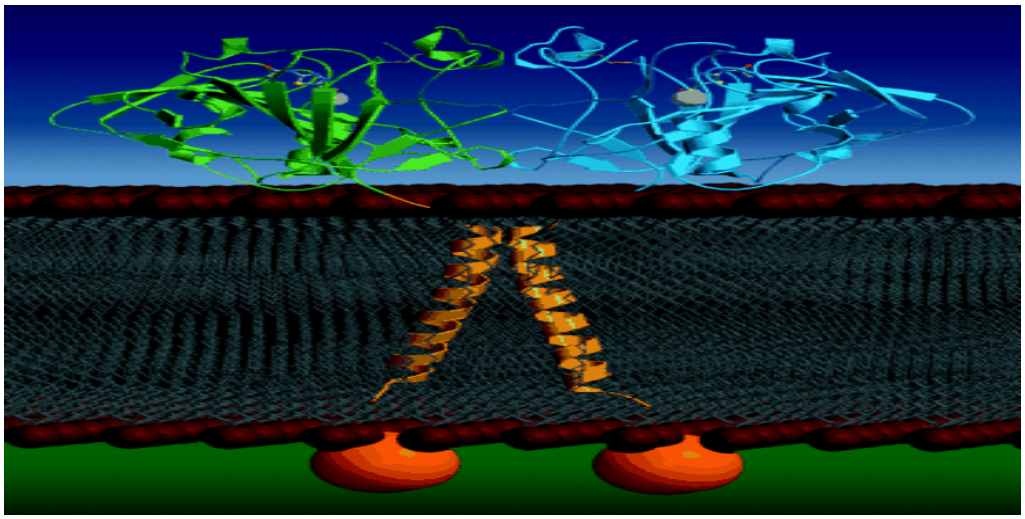


Şekil 2.11. CA-IX izoenziminin üç boyutlu yapısı (PG: Proteoglikan bölge, TM: Transmembran bölge, IC: İntrasitoplazmik kuyruk) (89)

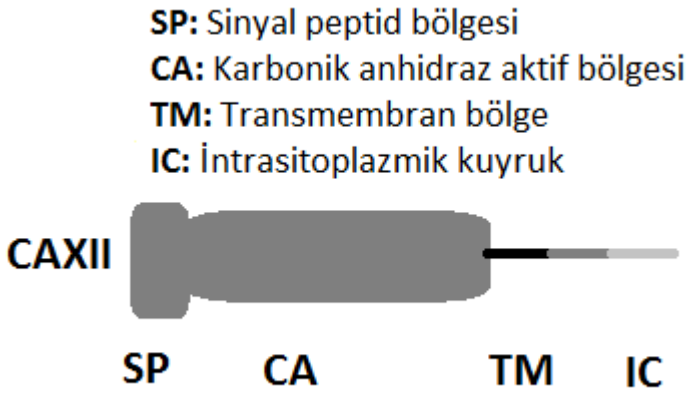
2.3.7.2. Karbonik Anhidraz XII

CA-XII tümör-ilişkili başka bir transmembran CA izoenzimidir (35). 15q22 kromozomal lokusunda bulunmaktadır ve ekzon sayısı 11'dir (90). CA-XII, 1998 yılında iki araştırma grubu tarafından bağımsız olarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. CA-XII, CA katalitik domaini, ek kısa ekstrasellüler bölüm, hidrofobik transmembran domaini (TM) ve C-terminal sitoplazmik kuyruk (IC) içerir. CA IX' dan farklı olarak proteoglikan domaini (PG) bulundurmaz (Şekil 2.12-2.13).

CA-XII renal hücre karsinomu, küçük hücreli akciğer kanseri, astrositoma, meme, yumurtalık, pankreatik, kolorektal, gastrointestinal tümörler gibi bazı tümörlerde eksprese olmaktadır. Bunun yanında CA-XII'nin endometriyum, kolon, böbrek ve göz gibi bazı normal doku ve organlarda da ekspresyonu görülmektedir. CA-XII'nin katalitik aktivitesi CA-IX'a göre daha düşüktür. Ancak yine de tümör mikroçevresinde pH düzenlenmesinde ve kanser tedavisinde hedef olarak önemli bir enzim olduğu düşünülmektedir (4).



Şekil 2.12. CA-XII izoenziminin üç boyutlu yapısı (yeşil ve mavi kısımlar CA katalitik bölgesini, beyaz kısımlar Zn^{+2} metalini, sarı kısımlar C-terminal uçları,turuncu kısımlar ise intersellüler membran uçları göstermektedir) (91)



Şekil.2.13. CA-XII izoenziminin domain organizasyonu (38)

2.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Son yıllarda çoğu CA izoformunun bir çok hastalıkla olan ilişkisi keşfedildiğinden dolayı bu izoformlar ilaç dizaynında hedef olarak kullanılmaktadır (92). CA inhibitörleri diüretik ve anti-glokom ajanları olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında, anti-obezite, anti-konvülsan ve anti-tümör aktiviteleri de bulunmaktadır (93).

CA inhibitörleri enzim bağlanma bölgelerine göre iki ana sınıfa ayrılır :

-Enzimin aktif bölgesinde katalitik Zn^{+2} iyonuna kendini bağlayan
-Metal iyonu ile direkt etkileşime girmeyip aktif bölgeye bağlananlar

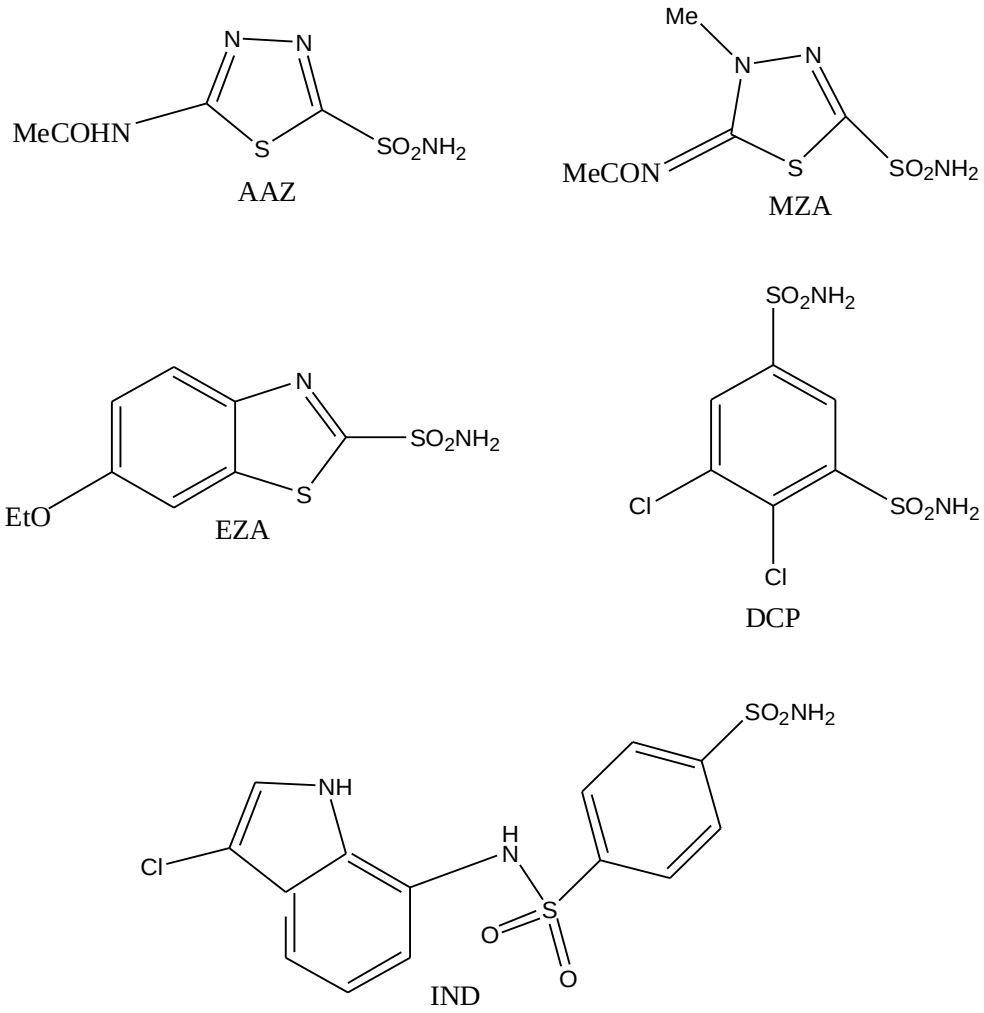
Zn^{+2} bağlanan inhibitörler ise dört sınıfa ayrılmaktadır. üratlar ve hidroksamatlar, merkaptofenoller, metalle kompleks oluşturan anyonlar ve sülfamat-sülfamit gibi biyoizoesterleri ile sülfonamidlerdir (45).

Yaklaşık 30 CA inhibitörü antiglokom (CA-II, CA-IV, CA-XII'yi hedefler.), antikonvülsan (CA-II, CA-VII ve C-IV'ü hedefler.), antiobezite (CA-VA ve CA-VB'yi hedefler.) ajanı olarak kliniklerde kullanılmaktadır (94). Klinik olarak kullanılan insan CA (hCAs) inhibitörlerine örnek olarak; asetazolamit AZA, metazolamit MZA, etokzolamit EZA, dibromofenamit DCP, dorzolamit DZA, brinzolamit BRZ, benzolamit BZA, topiramat TPM, zonizamit ZNS, sülfirit SLP, indisulam IND, selekosib CLX ve valdekosib VLX verilebilir (95) (Şekil 2.14).

Sıklıkla kullanılan sülfonamid bazlı bir ilaç olan AZA çok iyi bir CA inhibitörüdür. Minimal toksisite gösterir ve iyi farmokinetik özellikler sağlar. Ancak bu ilaç istenmeyen yan etkilere sahiptir. Üre seviyesinde artışa, artmış bir sodyum ve potasyum salınımına neden olarak diüretik etki oluşturur (96). EZA'de CA'ların inhibitörü olarak çalışır. MZA'de CA inhibitörüdür. AZA'den daha uzun yarılanma ömrü vardır ve böbreğe olan olumsuz etkileri daha azdır. DZA, bir sülfonamit ve topikal CA-II inhibitörüdür. Açık açılı glokom veya oküler hipertansiyonlu hastalarda açığa çıkan intraselüler basıncı azaltmak için kullanılır. TPM, fruktoz ile ilişkili sülfamat ilave edilmiş bir monosakkarittir ve özellikle CA-II ve CA-IV izoenzimleri için zayıf bir inhibitörüdür (28).

CA inhibitörlerinin çoğu seçicilikten yoksundur ve sayısız istenmeyen yan etkileri vardır. Buna engel olabilmenin bir yolu spesifik izoenzimleri inhibe eden inhibitörler dizayn etmektir. CA izoenzimlerinin aktif bölgesi korunmuş olmasına rağmen, aktif bölgenin giriş kısmındaki aminoasitlerde varyasyonlar görülür. Bu şekil ve hidrofobisite farklılıklarından dolayı bu yüzey ceplerine özel inhibitörler tasarlanabilir (94).

CA-IX ve CA-XII enzimleri intrasellüler pH'ı düzenleyerek tümör hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunurlar bu yüzden bunların kombineli hedeflenmesi yeni antikanser ilaçların geliştirilmesinde büyük önem arz etmektedir.



Şekil 2.14. Klinikte sıklıkla kullanılan CA inhibitörleri (97)

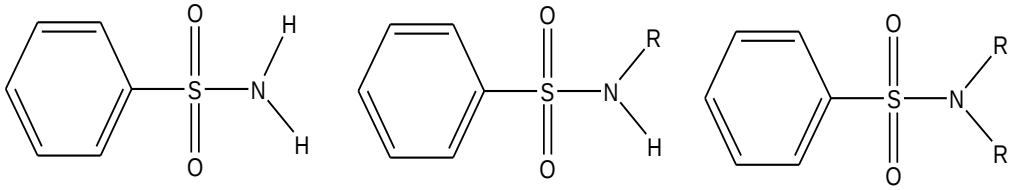
Tümör ilerlemesindeki rollerinden dolayı, CA-IX ve CA-XII'ye bağlanıp katalitik aktivitelerini inhibe eden moleküller geliştirmek birçok çalışmada amaçlanmıştır. Bu konuda 2 temel yaklaşım vardır. Bunlardan ilki spesifik antibadiler, ikincisi ise bu enzimlerin katalitik domainini hedefleyen küçük moleküller geliştirmektir (4).

2.5. Sülfonamidler

Sülfonamid grubu CA inhibisyonu Zn^{+2} bağlayıcı fonksiyonu için kullanılan en önemli ve en geniş yapıdır. Klinikte kullanılan CA inhibitörlerinin çoğu sülfonamidlerdir. Bu yapıların CA inhibisyon fonksiyonu keşfedildiğinden beri, kinetik, fizyolojik ve farmakolojik çalışmalarla geniş anlamda araştırılmışlardır (45).

Sülfonamidlerin ana yapısını bir benzol halkasına para durumunda bağlı olan bir amino (NH_2) veya bir deamido ($-SO_2NHR$) belirler. Kimi zaman bir grubun kimi kez de her iki grubun H^+'lerinden birinin yerine getirilen eklerle değişik sülfonamidler elde edilmiştir. Sülfonamidlerin fiziksel, kimyasal, farmakolojik ve anti-infeksiyöz özelliklerini bu farklılıkları sağlamaktadır (98).

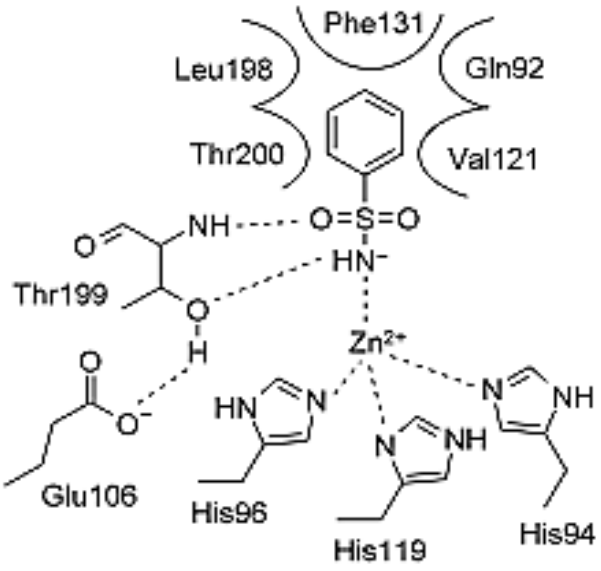
Sülfonamidlerin nitrojen atomu 3 sübstitüent içerdiğinden dolayı, sülfonamidler nitrojendeki sübstitüentin derecesine göre primer, sekonder ve tersiyer olarak sınıflandırılabilirler. Primer sülfonamidler sülfonil gruplarında 2 adet H^+ atomu, sekonder sülfonamidler ise 1 adet H^+ atomu bulundururlar (Şekil 2.15). Bu H^+'ler kısmen asidiktirler. Tersiyer sülfonamidler ise asidik değillerdir çünkü iyonize olabilen bir proton bulundurmazlar (7). Primer sülfonamidler CA enzimlerinin kapsamlı özgül inhibitörler iken, sekonder sülfonamidler genellikle zayıf CA inhibitörleridir (99).



Şekil 2.15. Sülfonamidlerin genel yapısı (96)

Sülfonamid türevleri deprotonlanmış sülfonamid nitrojeninin katalitik Zn^{+2} iyonuna bağlanması ve sülfonamidde bulunan iki hidrojen bağının Thr199 rezidüsü ile koordine edilmesiyle çalıştırılır. Bunun dışında sülfonamidde bulunan R grubu aktif bölgenin hidrofobik veya hidrofilik bölgeleriyle etkileşim kurabilir (45) (Şekil 2.16.).

CA'ın aktivitesinin sülfonamidle inhibe edilmesinin keşfinden beri bir çok sülfa ilaçlar, antiglokom ajanları, anti-tiroit, hipoglisemik sülfonamidler ve antikanser ajanların yeni tipleri açıklanmıştır (97). Klinik olarak kullanımı olan sülfonamidlere, asetolazamit (AZA) , metazolamit (MZA), etokzolamit (EZA), diklorofenamit (DCP) ve indisulam (IND) örnek olarak verilebilir (100).



Şekil 2.16. Sülfonamidlerin CA inhibisyon mekanizması (45)

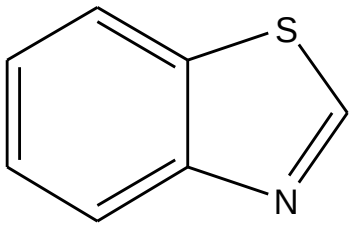
CA-IX ve CA-XII tümörlerin bir çok tipinde yüksek derecede eksprese edilir. Bir çok sülfonamid bileşiği , CA-IX ve CA-XII izoenzimleri ile ilgili olan seçici CA inhibisyon aktivitesini bulmak için araştırılmaktadır (101). CAIX'un inhibisyonu ile ilgili ilk yapılan çalışma AZA, MZA, EZA ve DCP gibi klinikte kullanılan bir seri aromatik ve heterosiklik sülfonamidlerle yapılmıştır. Bunun ilerisinde IND güçlü bir CA-II ve CA-IX inhibitörü olarak solid tümörlerin tedavisinde kullanılabilecek bir antikanser ajan olarak gösterilmiştir (97).

Son 10 yıldır tümör ilişkili CA-IX'a karşı güçlü seçiciliği olan inhibitörler geliştirilmiştir. Bu inhibitörlerden IND'ın etkisinin diğer inhibitörlere göre daha kuvvetli olduğu belirtilmiştir (97). CA-XII'ye karşı seçici inhibisyon etkisi gösteren limitli sayıda sülfonamid bulunmaktadır (102). CA-XII hakkındaki ilk inhibisyon çalışması 2000 yılında Ulmasov ve ark. tarafından EZA ile yapılmıştır. Bu çalışmada

EZA'in, CA-XII üzerinde inhibisyon etkisine sahip olduğu belirtilmiştir. Supuran ve ark. tarafından 2005 yılında yapılan çalışmada CA-XII üzerinde 34 inhibitörün inhibisyon etkisine bakılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda EZA ve halojenlenmiş sülfonamidlerin CA-XII üzerinde daha güçlü bir inhibisyon etkisine sahip olduğu belirtilmiştir (103). Günümüzde de CA-IX ve CA-XII izoenzimlerine karşı seçici inhibisyon etkisi gösteren ve kanser tedavisinde onları hedefleyen sülfonamid türevleri geliştirmeye yönelik çalışmalar devam etmekte ve bu inhibitörlerin klinikte kullanımının uygun hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

2.6. Benzotiyazoller

Benzotiyazol benzen ve tiyazol halkalarından meydana gelen heterosiklik bir yapıdır (Şekil 2.17). Bu yapı antitüberküler, antimikrobiyal, antimalaryal, antikonvülsant, antihelmintik, aneljezik, antiinflamatuvar, antiobezite ve antitümör gibi farmakolojik aktivitelere sahip olmalarından dolayı ilgi çekmektedir. Son birkaç yılda, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan yeni benzotiyazol türevleri geliştirilmiştir (104).

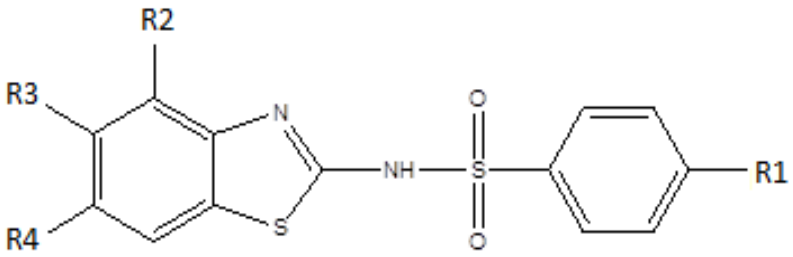


Şekil 2.17. Benzotiyazollerin genel yapısı (105)

Bazı benzotiyazol türevleri kinazları hedefler, ayrıca çoğu benzotiyazol konjugatları B-Raf ve Bcl-xL protein seviyelerinin modüle edilmesini sağlayarak apoptozisi indükler. Benzotiyazoller bu özellikleri ile kanser tedavisinde kullanılabilirler. Benzotiyazoller bu özelliklerini tirozin kinazların katalitik domainlerine bağlanmak için ATP ile yarışarak gösterirler . Bazı benzotiyazol türevleri ise bir biyolüminesans olan lüsiferinin yapısında bulunurlar ve florofor olarak kullanılabilirler. Bir CA inhibitörü olan EZA sülfonamid türevi bileşiktir. Benzotiyazol yapısı içerir. Diüretik olarak görev görür.

Benzotiyazoller antitümör etkilerinden dolayı geniş anlamda araştırılmaktadır. Benzotiyazollerin antitümör aktivitesi ile ilgili ilk çalışmalar Stevens ve ark. tarafından yapılmıştır (106). Bu grup tarafından yapılan çalışmada polihidroksilatlı 2-fenilbenzotiyazol türevleri sentezlenmiş ve bu yapıların ATP' nin antogonist etkisini taklit ettiği ve tirozin kinaz inhibitörü gibi davrandığı görülmüştür (107). Tüm bunlara ek olarak benzotiyazol türevleri süperoksit ayonlarına karşı koruyucu rol oynadıkları belirtilmiştir (108). Benzotiyazol türevi CA üzerindede inhibisyon etkisi gösterdiği çalışmalarla gösterilmiştir (109, 110). Günümüzde, antitümör aktivitesini artırmak için benzotiyazoller üzerinde modifikasyon çalışmaları yapılmaktadır . Bu modifikasyonlar sayesinde bir çok benzotiyazol türevi ve çok çeşitli farmakolojik özellikler elde edilmiştir. (108, 111).

Yapılan bu çalışmada da yeni bir inhibitör serisi olan benzotiyazol-2-il-benzen sülfonamidlerin sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerine olan inhibisyon etkileri incelenmiştir (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Çalışmada kullanılan inhibitörlerin genel yapısı

Tablo 2.2' de çalışmada kullanılan inhibitörler ve kimyasal adları verilmiştir.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan inhibitörlerin kimyasal olarak adlandırılması

İnhibitör	Kimyasal adı
AnA1	N-(4-kloro-benzotiazol-2-il)- 4-kloro-benzensülfonamid
AnA2	N-(5,6-dimetil-benzotiazol-2-il) -4-kloro-benzensülfonamid
AnA3	N-(5,6-dimetil-benzotiazol-2-il)-4-nitro-benzensülfonamid
AnA4	N-(5,6-dimetil-benzotiazol-2-il)-benzensülfonamid
AnA5	N-(4-kloro-benzotiazol-2-il)-4-metoksi-benzensülfonamid
AnA6	N-(6-kloro-benzotiazol-2-il)-4-metoksi-benzensülfonamid
AnA7	N-(6-kloro-benzotiazol-2-il)-4-floro-benzensülfonamid
AnA8	N-(6-floro-benzotiazol-2-il)- 4-floro- benzensülfonamid
AnA9	N-(5,6-dimetil-benzotiazol-2-il)-4-floro-benzensülfonamid
AnA10	N-(6-floro-benzotiazol-2-il)-4-metoksi-benzensülfonamid
AnA11	N-(4-metil-benzotiazol-2-il)- 4-floro-benzensülfonamid
AnA12	N-(4-metil-benzotiazol-2-il)- 4-metil -benzensülfonamid
AnA13	N-(4-kloro-benzotiazol-2-il)-4-metil-benzensülfonamid
AnA14	N-(5,6-dimetil-benzotiazol-2-il)-4-metil-benzensülfonamid

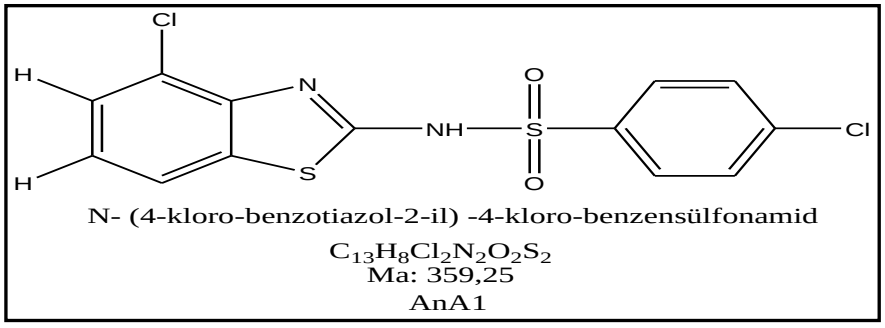
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyaller

Çalışmada kullanılan CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri ticari olarak temin edilmiştir. Kullanılan 14 adet sekonder benzotiyazol grubu içeren sülfonamid örneği ise Selanik Aristotales Üniversitesi Farmasotik Kimya laboratuvarında Dr. Athina Geronikakis ve grubu tarafından sentezlenmiştir.

Çalışmada kullanılan; fenol red, sodyum hidroksit, trihidroksi metil amino metan (Tris), sodyum sülfat, HEPES, dimetil sülfoksit (DMSO), asetazolamit ve nitrik asit Sigma Co. Ltd. tarafından Almanyadan temin edilmiştir. Karbondioksit gazı ise piyasadan temin edilmiştir.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan İnhibitörler (Kimyasal Yapıları, Adlandırılması, Formülleri ve Molekül Ağırlıkları)



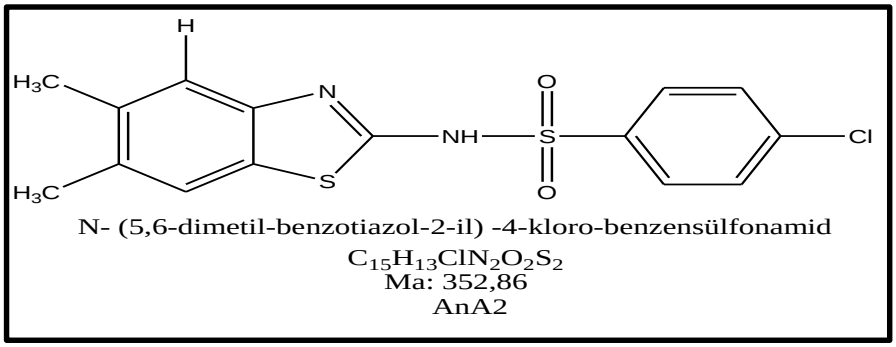
N- (4-kloro-benzotiazol-2-il) -4-kloro-benzensülfonamid

$C_{13}H_8Cl_2N_2O_2S_2$

Ma: 359,25

AnA1

Şekil 3.1. AnA1'in kimyasal yapısı



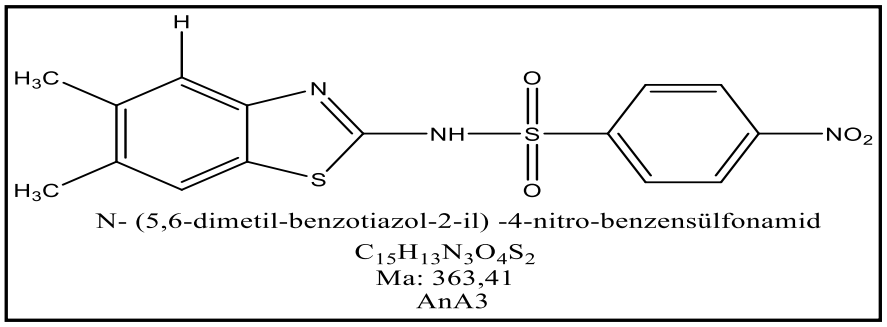
N- (5,6-dimetil-benzotiazol-2-il) -4-kloro-benzensülfonamid

$C_{15}H_{13}ClN_2O_2S_2$

Ma: 352,86

AnA2

Şekil 3.2. AnA2'nin kimyasal yapısı



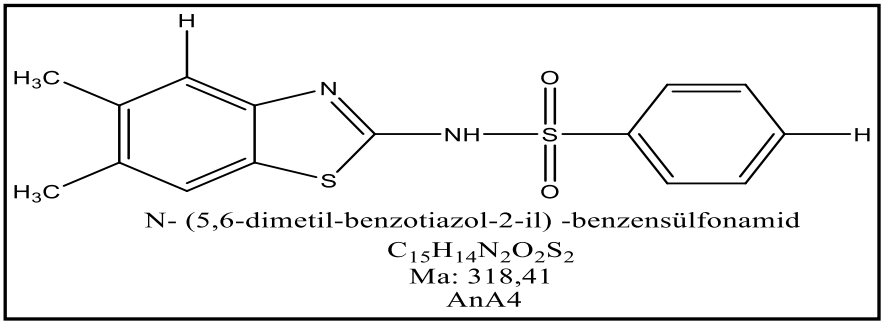
N- (5,6-dimetil-benzotiazol-2-il) -4-nitro-benzensülfonamid

$C_{15}H_{13}N_3O_4S_2$

Ma: 363,41

AnA3

Şekil 3.3. AnA3'ün kimyasal yapısı



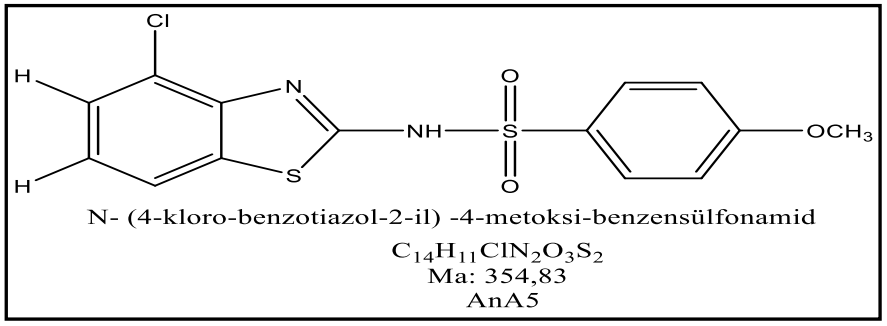
N- (5,6-dimetil-benzotiazol-2-il) -benzensülfonamid

$C_{15}H_{14}N_2O_2S_2$

Ma: 318,41

AnA4

Şekil 3.4. AnA4' ün kimyasal yapısı



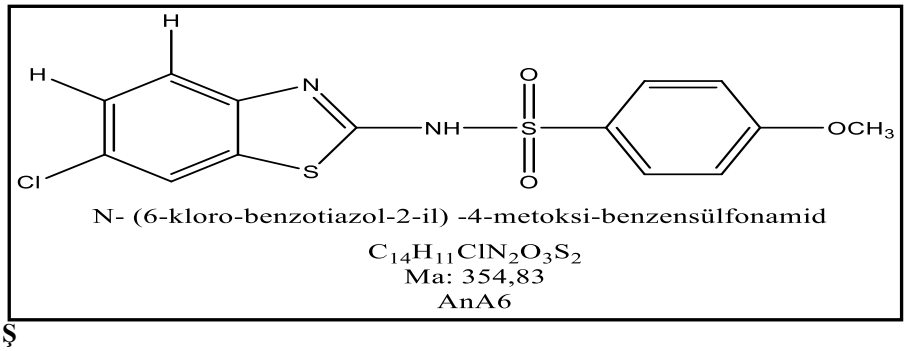
N- (4-kloro-benzotiazol-2-il) -4-metoksi-benzensülfonamid

$C_{14}H_{11}ClN_2O_3S_2$

Ma: 354,83

AnA5

Şekil 3.5. AnA5'in kimyasal yapısı



N- (6-kloro-benzotiazol-2-il) -4-metoksi-benzensülfonamid

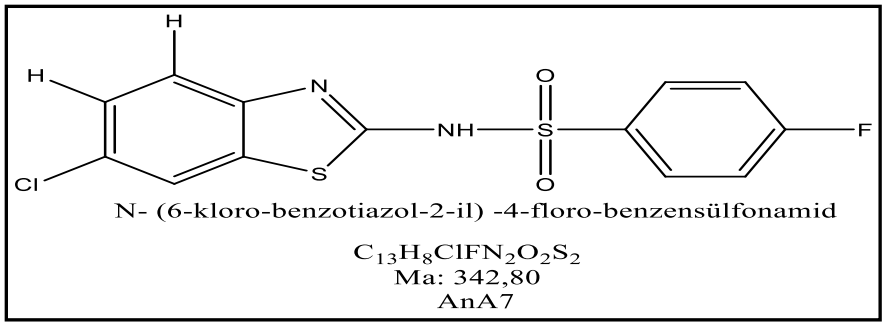
$C_{14}H_{11}ClN_2O_3S_2$

Ma: 354,83

AnA6

Ş

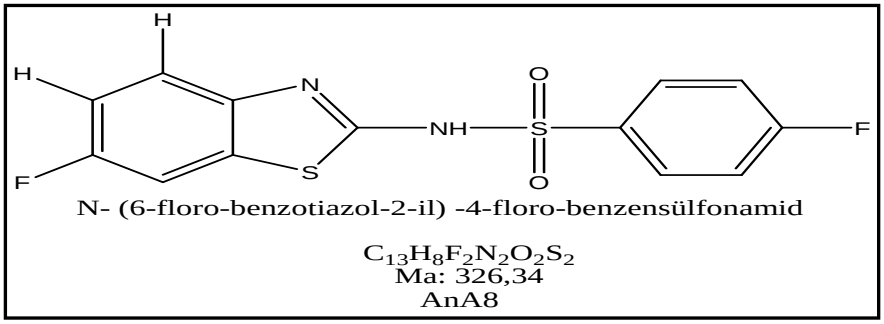
Şekil 3.6. AnA6'nın kimyasal yapısı



N- (6-kloro-benzotiazol-2-il) -4-floro-benzensülfonamid

$C_{13}H_8ClFN_2O_2S_2$
Ma: 342,80
AnA7

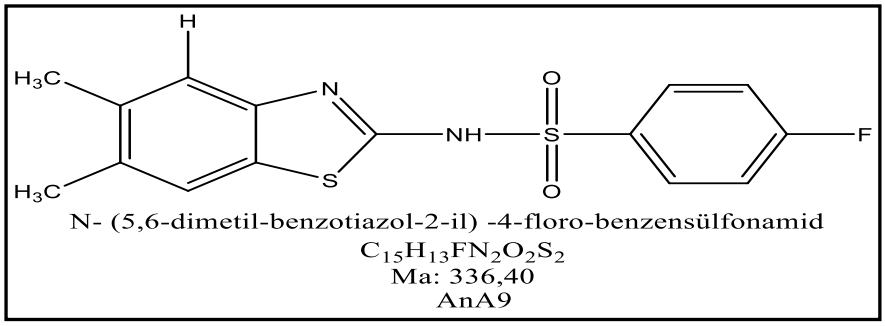
Şekil 3.7. AnA7'nin kimyasal yapısı



N- (6-floro-benzotiazol-2-il) -4-floro-benzensülfonamid

$C_{13}H_8F_2N_2O_2S_2$
Ma: 326,34
AnA8

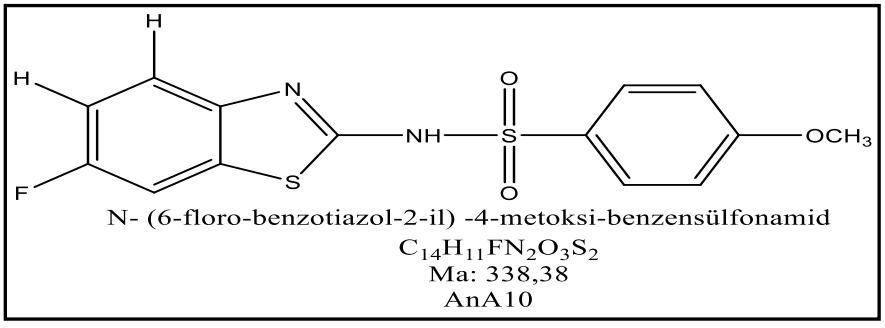
Şekil 3.8. AnA8'in kimyasal yapısı



N- (5,6-dimetil-benzotiazol-2-il) -4-floro-benzensülfonamid

$C_{15}H_{13}FN_2O_2S_2$
Ma: 336,40
AnA9

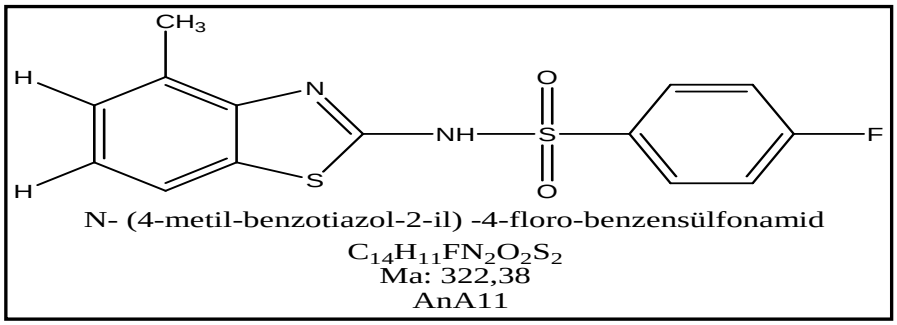
Şekil 3.9. AnA9'un kimyasal yapısı



N- (6-floro-benzotiazol-2-il) -4-metoksi-benzensülfonamid

$C_{14}H_{11}FN_2O_3S_2$
Ma: 338,38
AnA10

Şekil 3.10. AnA10'un kimyasal yapısı



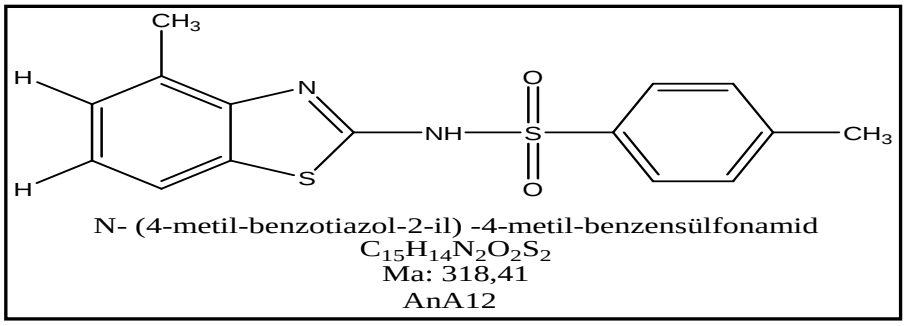
N- (4-metil-benzotiazol-2-il) -4-floro-benzensülfonamid

$C_{14}H_{11}FN_2O_2S_2$

Ma: 322,38

AnA11

Şekil 3.11. AnA11'in kimyasal yapısı



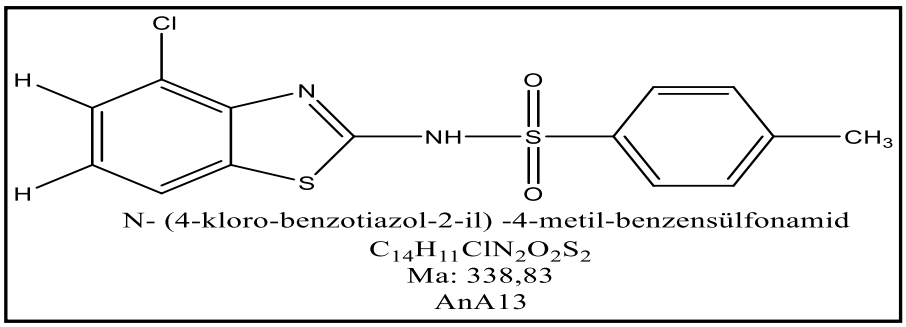
N- (4-metil-benzotiazol-2-il) -4-metil-benzensülfonamid

$C_{15}H_{14}N_2O_2S_2$

Ma: 318,41

AnA12

Şekil 3.12. AnA12'nin kimyasal yapısı



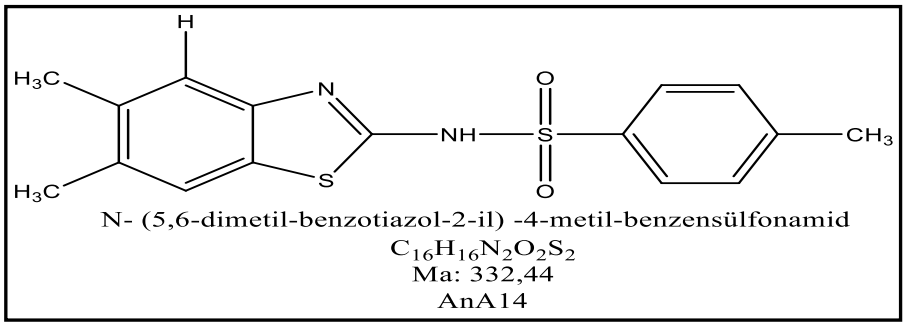
N- (4-kloro-benzotiazol-2-il) -4-metil-benzensülfonamid

$C_{14}H_{11}ClN_2O_2S_2$

Ma: 338,83

AnA13

Şekil 3.13. AnA13'ün kimyasal yapısı



N- (5,6-dimetil-benzotiazol-2-il) -4-metil-benzensülfonamid

$C_{16}H_{16}N_2O_2S_2$

Ma: 332,44

AnA14

Şekil. 3.14. AnA14'ün kimyasal yapısı

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Buzdolabı (+4 C°): Hitachi
pH metre: Orion-model 920A
Hassas terazi: Libror, AEG-220 (Shimadzu)
Kronometre: Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr
Otomatik pipetler: Eppendorf, Medisis, Gilson
Magnetik karıştırıcı: ARE magnetic, heating stirrer IKA Combimag RCO
Vorteks: Fisons Whirli Mixer
Stopped-Flow Kinetic Aleti: SX.18MV-R Applied Photophysics

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

CA-CO_2 Hidrataz Enzim Aktivitesi için Kullanılan Tamponlar

- Stopped-Flow ve Maren metodu için CO_2 çözeltisi; 20°C'de bidistile su içinden CO_2 geçirilerek hazırlanmıştır.

- Stopped-Flow tampon çözeltisi: 0.01 M HEPES 4-(hidroksi etil)-1-Piperazin-ethansülfonik asit, 0.01 M Tris [hidroksimetil] aminometan hidroklorür (TRIZMA HIDROKLORÜR), 0.1 M Na_2SO_4 pH 7.5.

- Stopped-Flow stok CA enzim çözeltileri; Ticari CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII için sırasıyla $2.5X10^{-5}$, 10^{-5} , $3.3X10^{-5}$, $1.9X10^{-5}$ M stok çözeltilerden CA-I için 10^{-6}, CA-II, CA-IX ve CA-XII için ise 10^{-7} M olarak hazırlanmıştır.

- Stopped-Flow stok sülfonamid örneği çözeltileri: Kullanılan 14 adet benzotiyazol türevi sülfonamid grubu bileşikler ile AZA ilk olarak 10^{-2} M olarak hazırlanmış daha sonra 10^{-2} M'lık stok çözeltiden sırasıyla 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} M olacak şekilde seyreltilerek kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

CA enziminin aktivitesi iki şekilde ölçülebilmektedir; birincisi, CA'ın fizyolojik aktivitesi olan CO_2-hidrataz aktivitesidir, ikincisi ise in vitro şartlarda gerçekleştirdiği spektrofotometrik olarak takip edilebilen esteraz aktivitesidir (112).

3.2.1. CO_2-Hidrataz Aktivitesi Tayini (Stopped-flow Kinetik Aleti)

CO_2-Hidrataz aktivitesi tayini SX.18MV-R Applied Photophysics Stopped-Flow Kinetik aleti ile yapılmıştır. Bu alet, hızlı kimyasal, biyokimyasal ve biyolojik reaksiyonların stopped flow ile başlamasına izin verir (38).

Stopped flow 1 ms 100 s arasında gerçekleşen reaksiyonları analiz etmek için kullanılan spektroskopik ve hızlı kinetik tekniklerden en çok kullanılanıdır (113).

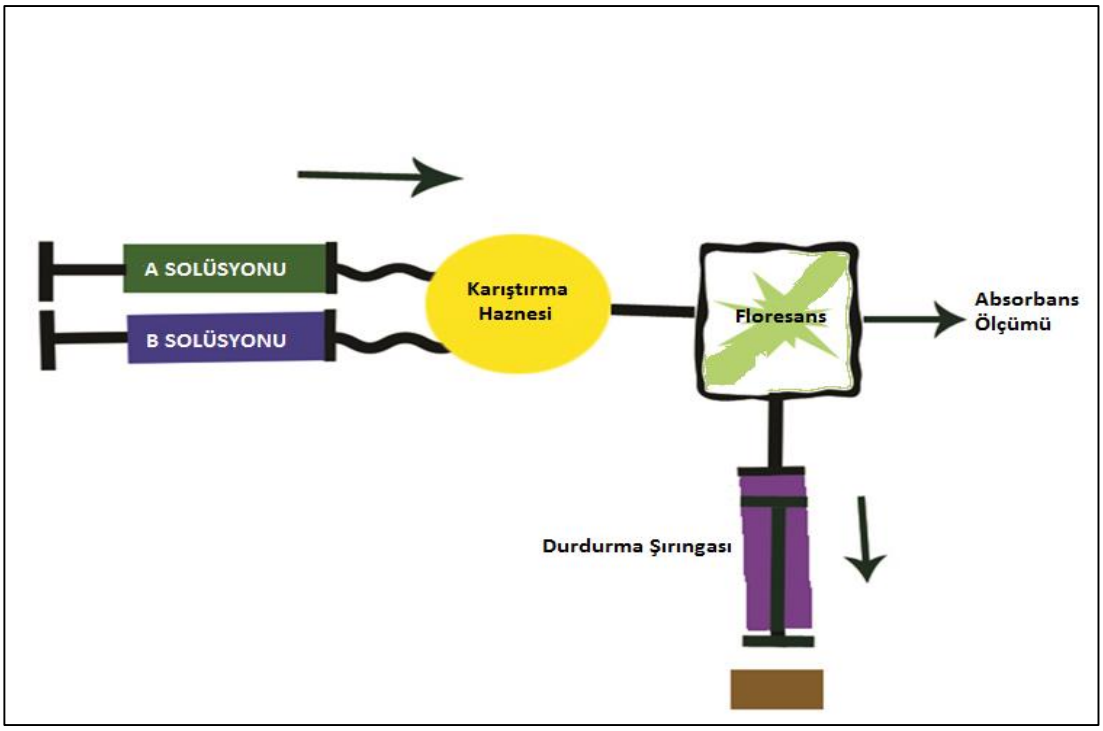


Şekil 3.15. Stopped-Flow kinetik aleti (114)

Klasik spektrofotometrik teknikler saniye altında hızla gerçekleşen reaksiyonları araştırmak için kullanılamazlar. Tepkimeye giren maddeler manuel olarak eklenirse, birkaç saniye içinde karışır, kimyasal tepkime meydana gelir ve herhangi bir spektrum değişikliği elde edilmez. Ancak Stopped-Flow yöntemi ile tepkimeye giren maddelerin anlık karıştırılması ve mili saniyenin onda birinde data elde edinimi sağlanır (115).

Stopped-Flow metodunda tepkimeye girecek olan maddeler bir karıştırma bölgesinin içine eş zamanlı olarak enjekte edilir. Burada reaksiyona girerler. Daha sonra buradan bir spektrofotometre hücresine ve en son olarak da durdurma şırıngasına taşınırlar. Durdurma şırıngası dolar ve pistonunu bir durdurma bloğuna karşı yönlendirir. Bu akımı durdurur ve bilgisayarda bir veri toplama aktivasyonuna neden olur (113) (Şekil 3.16).

Reaksiyonun ilerlemesi spektrofotometre hücresindeki tepkimeye giren madde ya da ürünün absorbansındaki değişikliğin görüntülenmesiyle takip edilir.



Şekil 3.16. Stopped flow kinetik aletinin çalışma prensibi (116)

Stopped-Flow cihazında, enjekte edilen sıvı hacminin stop şırıngası tarafından sınırlandırılması ile stopped flow sağlanır.

Solüsyon stop şırıngasına dolar, piston başlatıcı düğmeye çarpar. Bu sayede akım durur. Hücredeki reaksiyon kinetikleri ölçülür (117).

Stopped-Flow yönteminde küçük örnek hacimleri kullanılır. Hızlı analiz yapılır. Cihaz aşındırıcı maddelere karşı dayanıklıdır, geniş bir sıcaklık aralığı vardır (+100'den -100'e) ve yüksek basınçla çalışmaktadır (2 kbar). Stopped-Flow

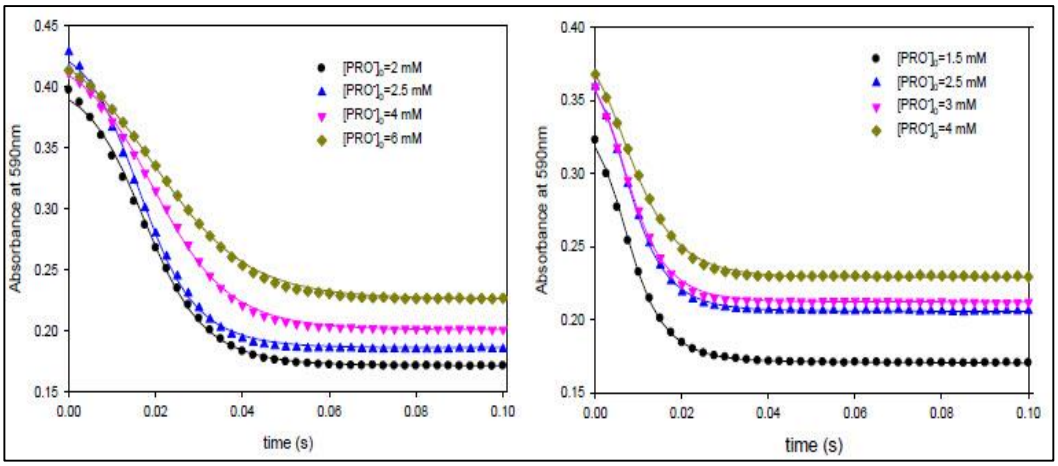
yönteminde ölü zaman adı verilen bir kavramı vardır. Ölü zaman karıştırmanın sonu ile ölçüm başlangıcı arasında geçen zamandır. Bu süre elektronik olarak ölçülür ve ne kadar kısaysa o kadar daha iyi bir sonuç elde edilir. Bu değer cihazın kinetik performansının belirlenmesi ve örneklerin konulduğu hücrenin tasarım kalitesinin belirlenmesi açısından önemlidir (113, 118).

Elde edilen kinetik analiz; reaksiyon hızı, reaksiyon mekanizmasının kompleksliği, kısa süreli reaksiyon aralık bilgisini belirleyebilir. Stopped flow deneyleri reaksiyon kinetikleri üzerinde sıcaklık, pH, reaktif konsantrasyonu gibi parametrelerin etkinliklerini belirlemek için kullanılabilir. Bunlar dışında;

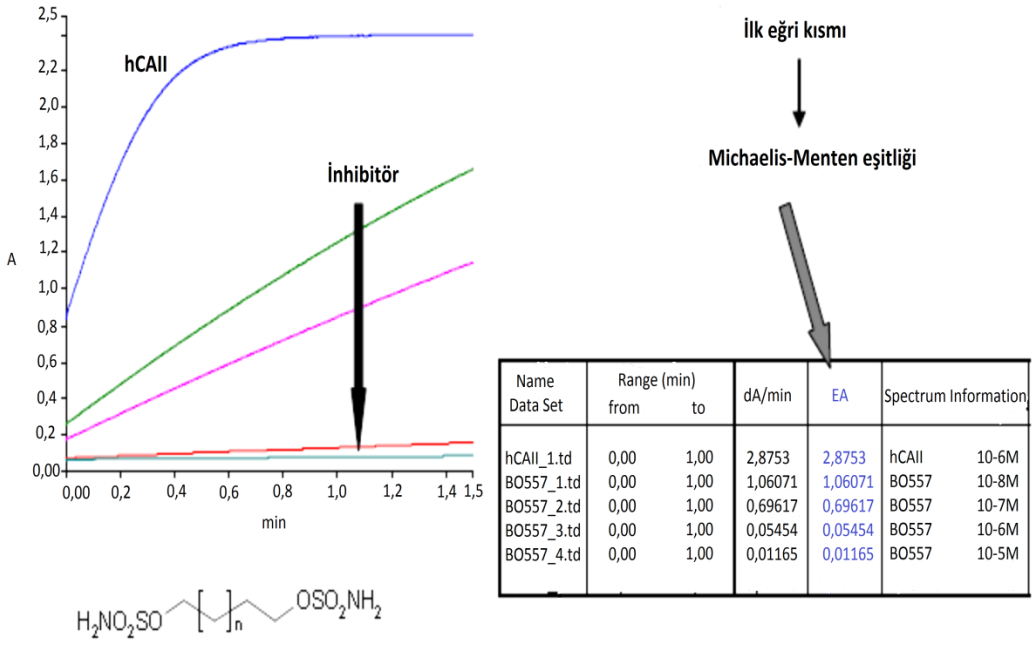
- Reaksiyon mekanizmaları
- İlaç bağlanma süreci
- Protein yapısının belirlenmesi
- Protein-protein etkileşimlerinin incelenmesi
- Ligand bağlanması
- Elektron transferi
- Floresans rezonans enerji transferi (FRET)
- Protein katlanması
- Enzimatik reaksiyonlar, kimyasal reaksiyonlar ve koordinasyon

reaksiyonları stopped-flow kinetik cihazının kullanım alanları içerisinde yer almaktadır (114).

Cihazın temel avantajlarına , fizyolojik şartlar altında pH ve sıcaklık, reaksiyon zamanlarının ve reaktif miktarlarının indirgemesine sahip olma, tekrarlanabilir üretim örnek olarak verilebilir (38).



Şekil 3.17. Prolin tuzlarının değişik konsantrasyonlarında meydana gelen CO_2 hidrasyon reaksiyonunun stopped-flow kinetik cihazı ile incelenmesi (119).



Şekil 3.18. CA-II enziminin tek başına (mavi çizgi) olan adsorpsiyon spektrumu, ve disülfonamid türeviyle beraber olan artışı (38)

Stopped-Flow aletinde veri analizi yukarıda görülen spektrumdan anlaşılacağı üzere, hCA-II enziminin bir sülfonamid türevi ile birlikte ve tek başına olan ilk kısımdaki eğri azalışı ile fark edilmektedir (Şekil 3.18.). dA/dak. oranından K_i değeri Michaelis-Menten eşitliği kullanılarak hesaplanır (38).

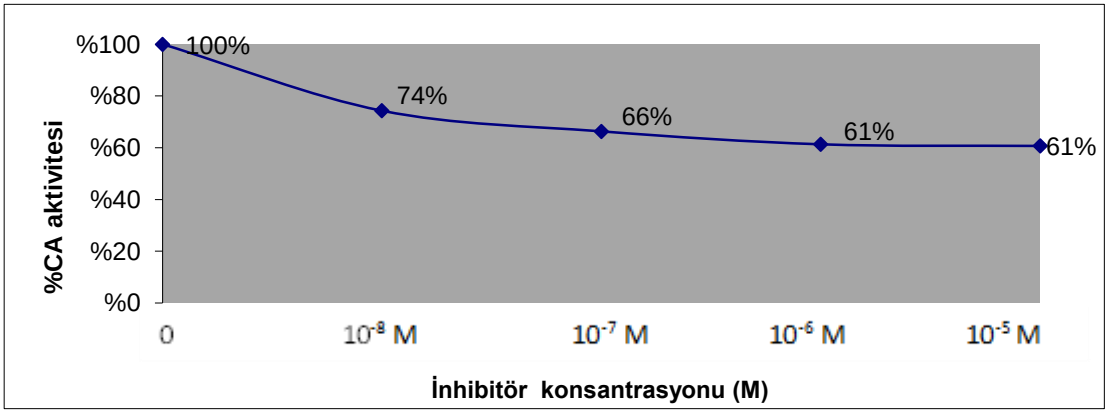
4. BULGULAR

Yapılan çalışmada 14 adet sekonder benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevinin sitozolik CA-I, CA-II izoenzimleri ve tümör ilişkili CA-IX, CA-XII izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiş ve her bir inhibitörün 4 farklı CA izoenzimiyle olan inhibisyonu şekil 4.1- 4. 56 grafikleri ve 4.1-4.14 tabloları ile verilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Grafikler çalışmada kullanılan 14 adet inhibitörün CA aktivitesinde yüzde (%) olarak ne kadar bir değişime sebep olduğunu göstermektedir. Tablo 4.1-4.14' de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} (enzim aktivitesinin yarısını inhibe eden inhibitör konsantrasyonu) değerleri verilmiştir. Etkili bir inhibisyon için, inhibitörlerin I_{50} değerlerinin incelediğimiz konsantrasyon aralığında (10^{-8}M-10^{-5}M) olması beklenmektedir.

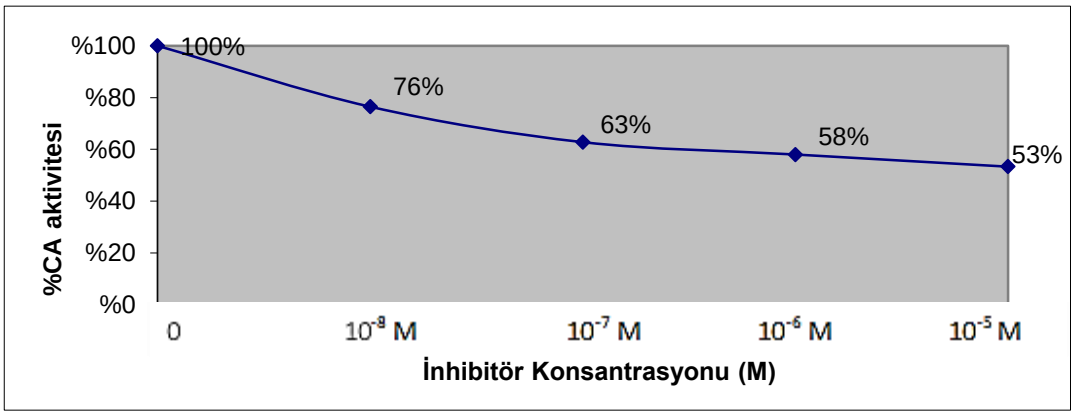
4.1. AnA1

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana1'in sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.1-4.4' de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.1'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

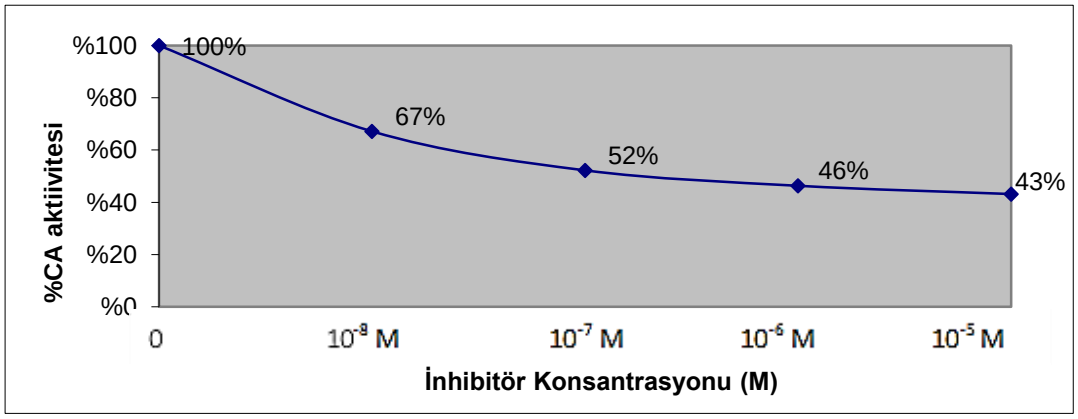
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA1'in en etkili inhibisyon etkisini CA-IX izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



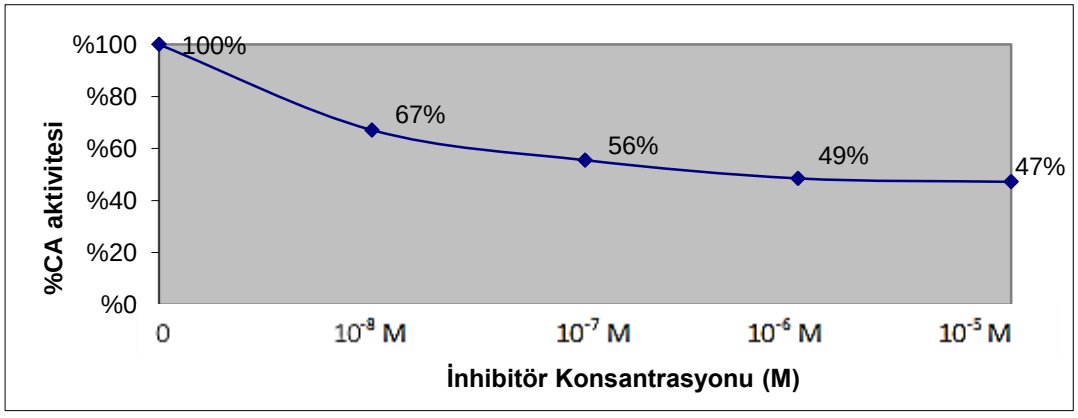
Şekil 4.1. AnA1'in CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.2. AnA1'in CA-II (10-7 M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.3. AnA1'in CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.4. AnA1'in CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

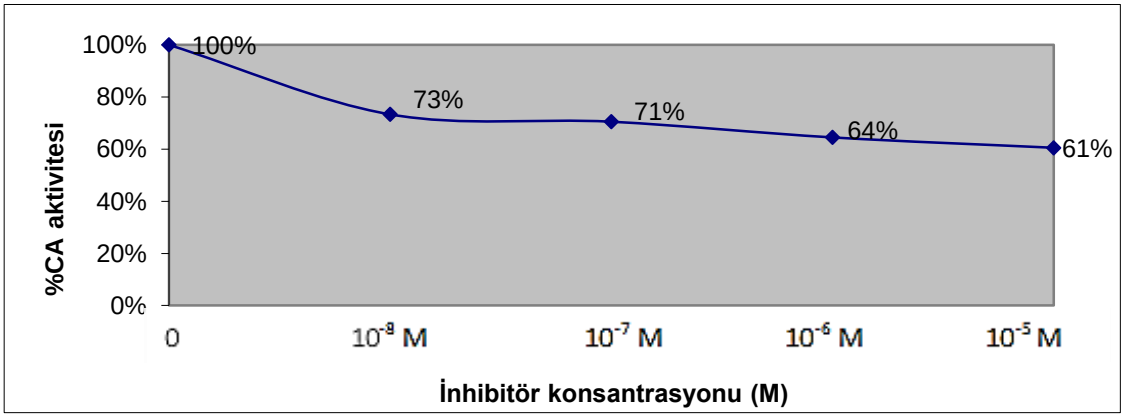
Tablo 4.1. AnA1'in CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	>10	0,44	0,81

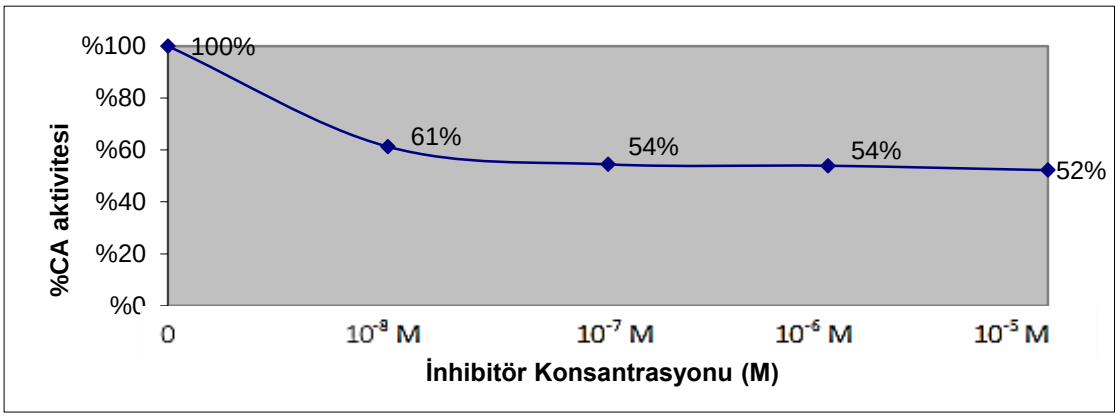
4.2. AnA2

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana2'nin sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.5-4.8'de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.2'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

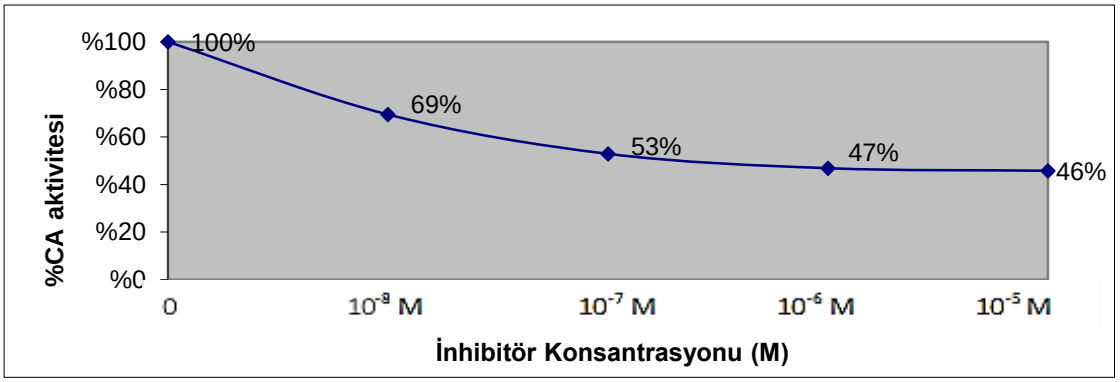
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA2'nin en etkili inhibisyon etkisini CA-IX izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



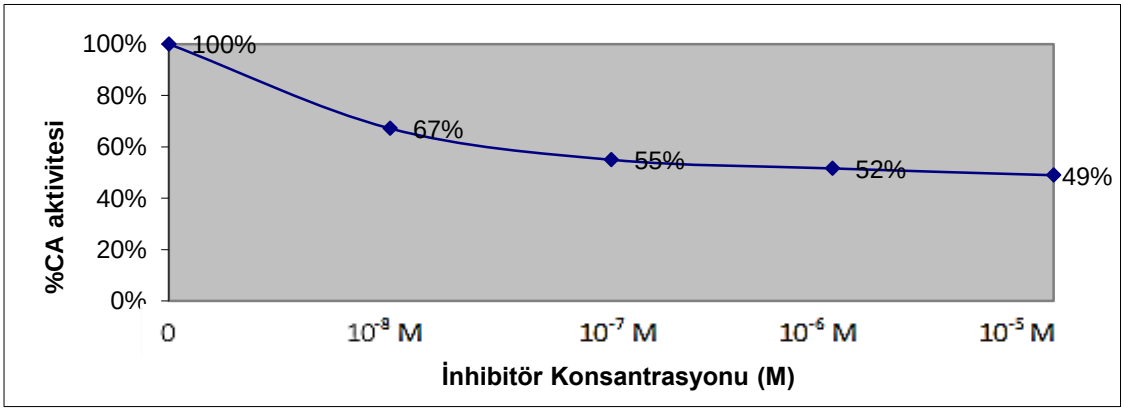
Şekil 4.5. AnA2'nin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.6. AnA2'nin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.7. AnA2'nin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.8. AnA2'nin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

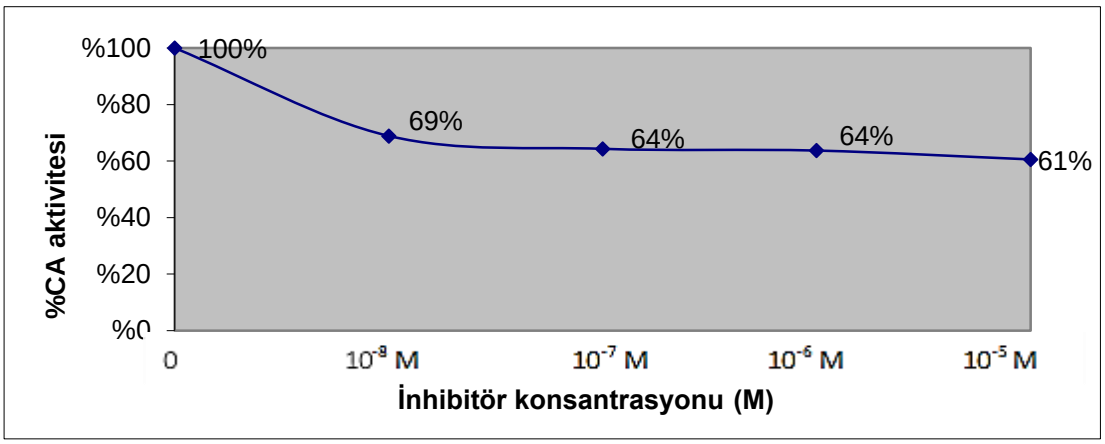
Tablo 4.2. AnA2'nin CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	>10	0,5	1,42

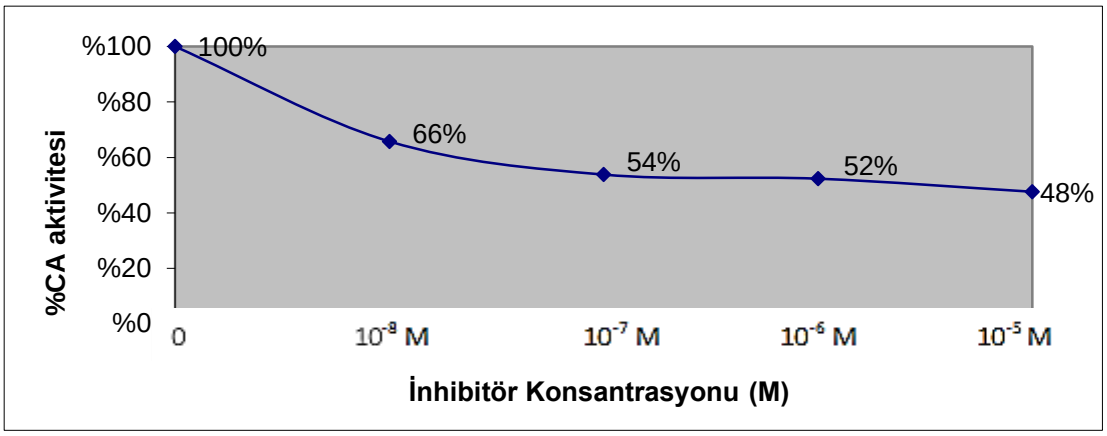
4.3. AnA3

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana3'ün sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.9-4.12'de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.3'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

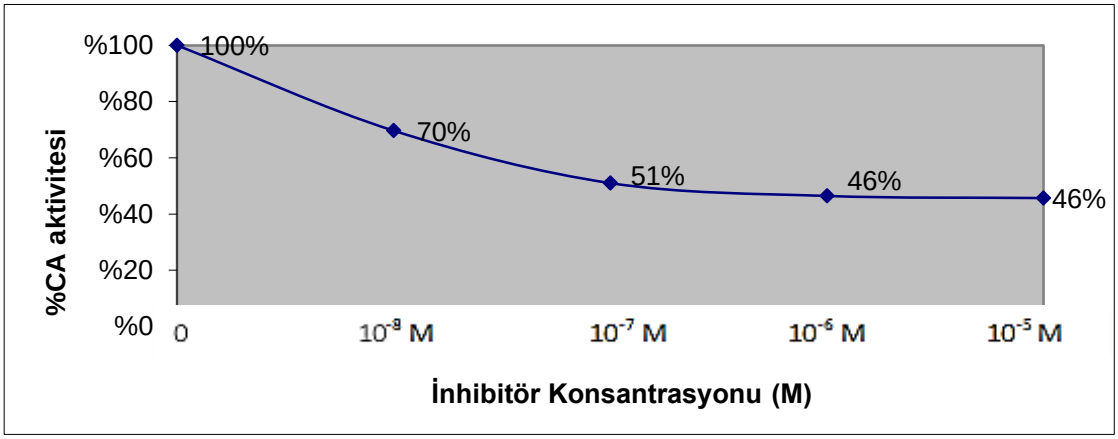
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA3'ün en etkili inhibisyon etkisini CA-IX izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



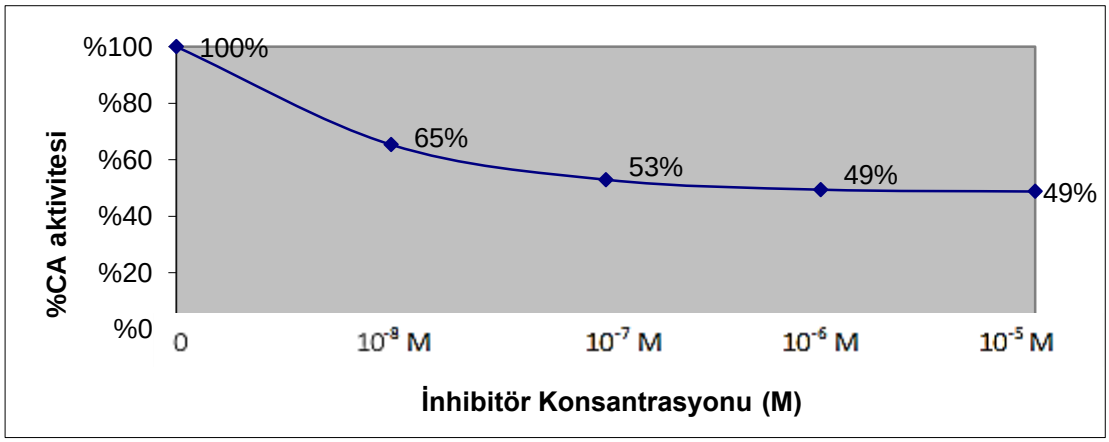
Şekil 4.9. AnA3'ün CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.10. AnA3'ün CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.11. AnA3'ün CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.12. AnA3'ün CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

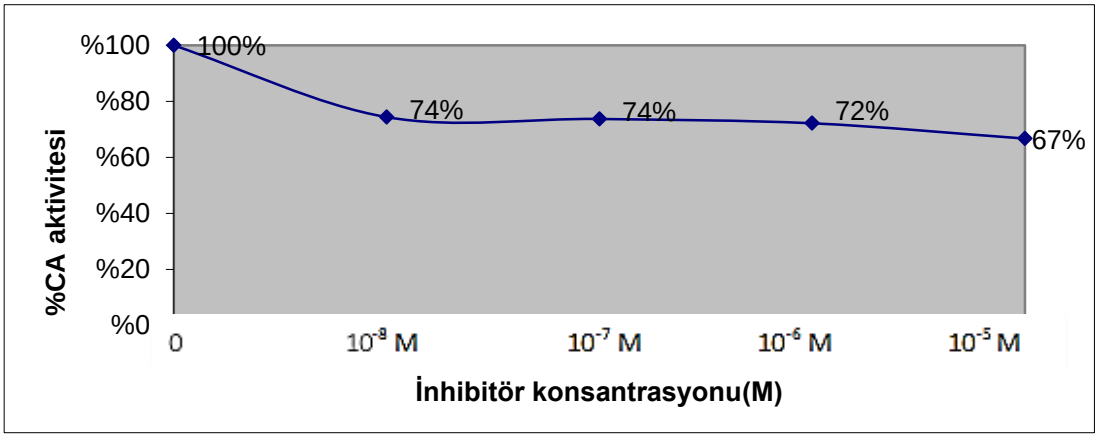
Tablo 4.3. AnA3'ün CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	5,46	0,3	0,9

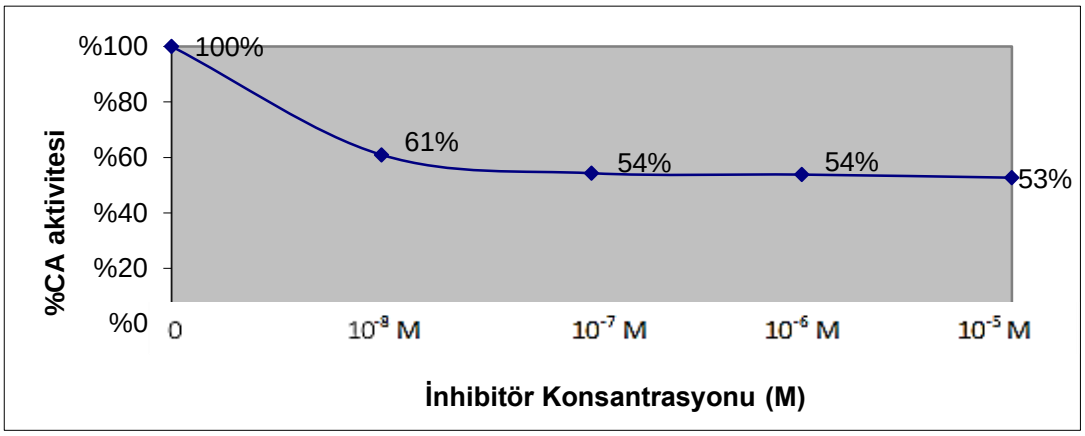
4.4. AnA4

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana4'ün sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.13-4.16'da gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.4'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

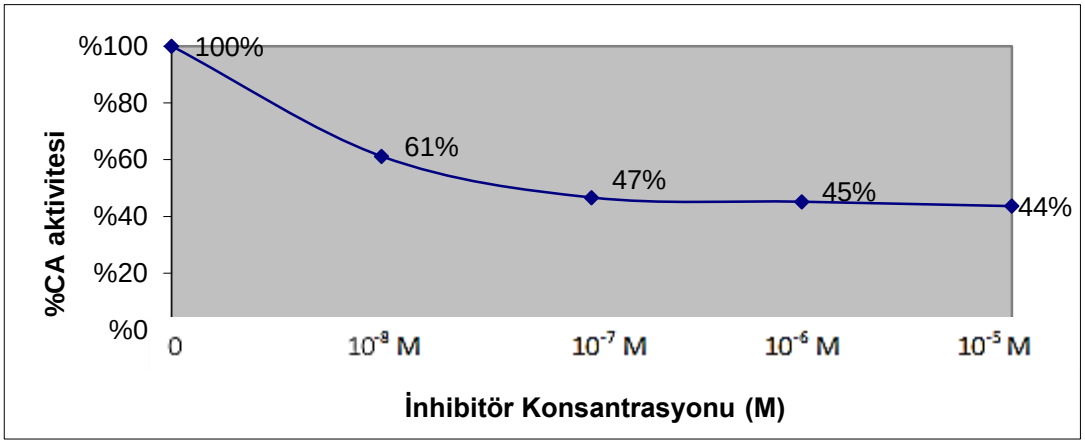
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA4'ün en etkili inhibisyon etkisini CA-IX izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



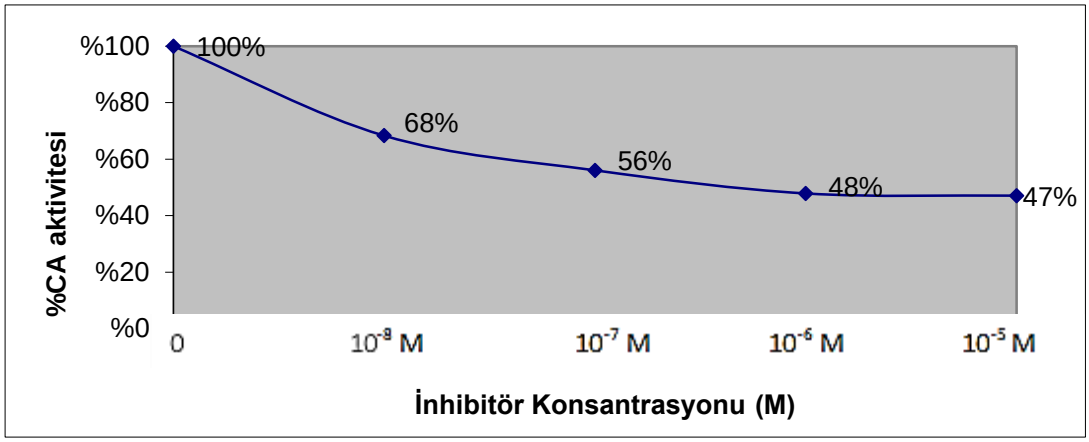
Şekil 4.13. AnA4'ün CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.14. AnA4'ün CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.15. AnA4'ün CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.16. AnA4'ün CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

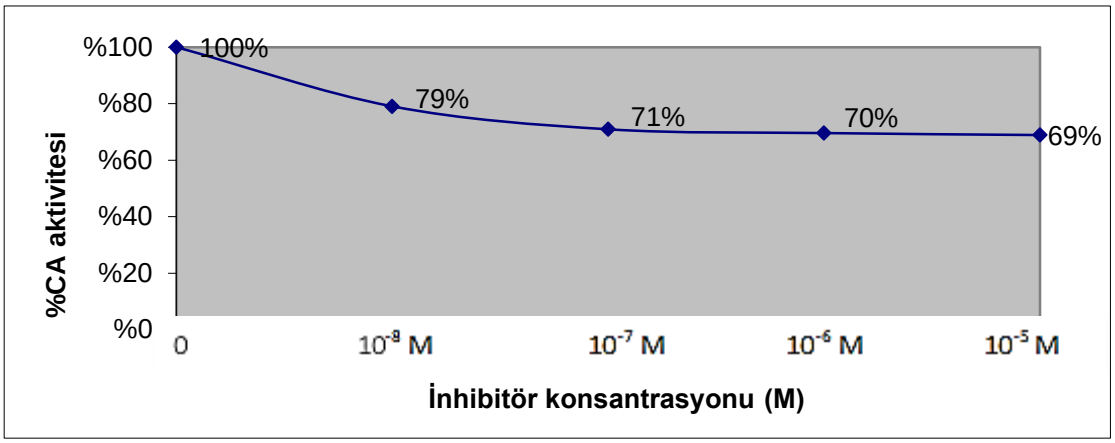
Tablo 4.4. AnA4'ün CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	>10	0,08	0,77

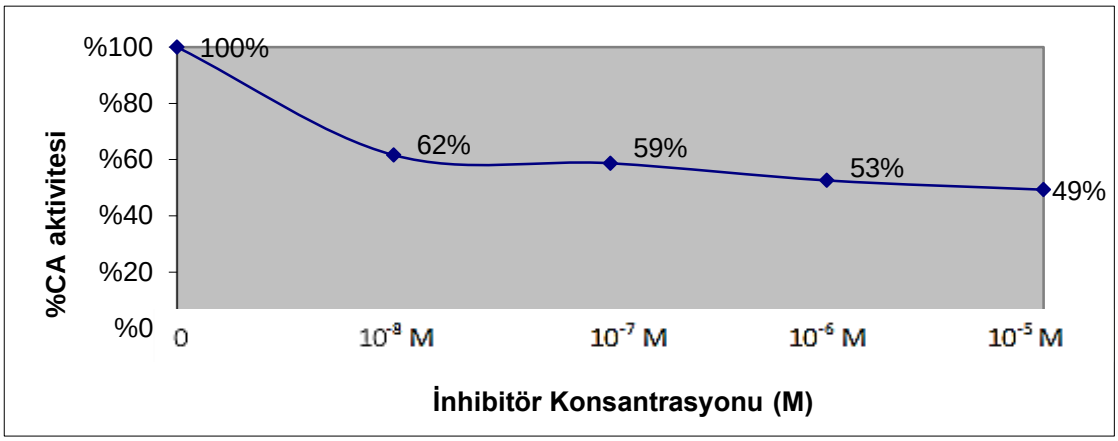
4.5. AnA5

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana5'in sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.17-4.20'de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.5'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

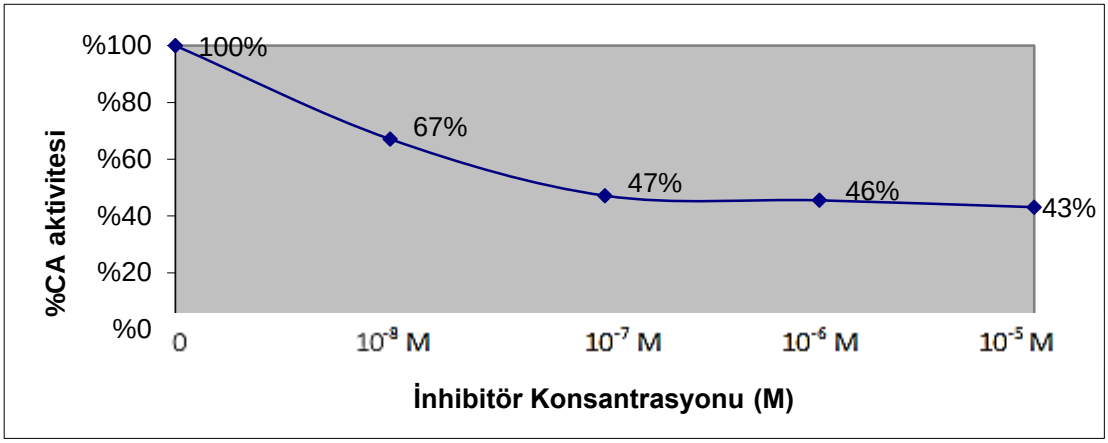
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA5'in en etkili inhibisyon etkisini CA-IX izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



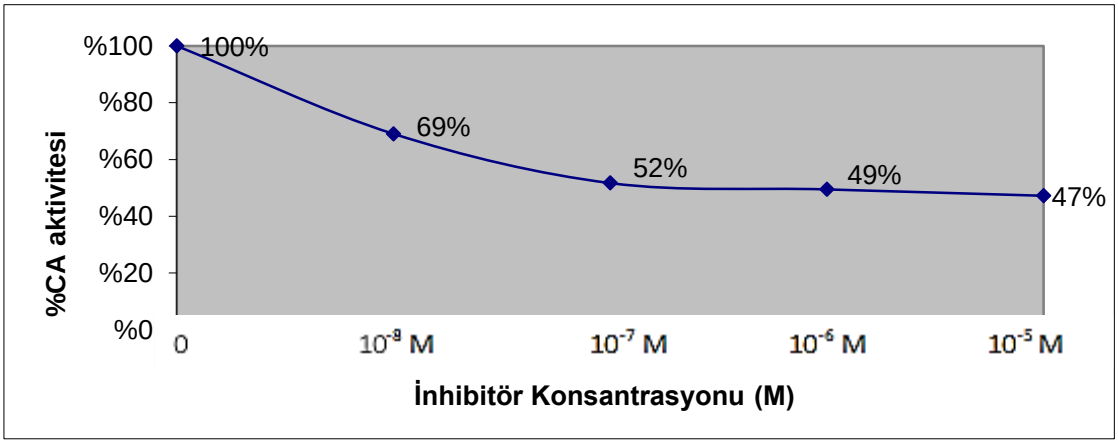
Şekil 4.17. AnA5'in CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.18. AnA5'in CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.19. AnA5'in CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.20. AnA5'in CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

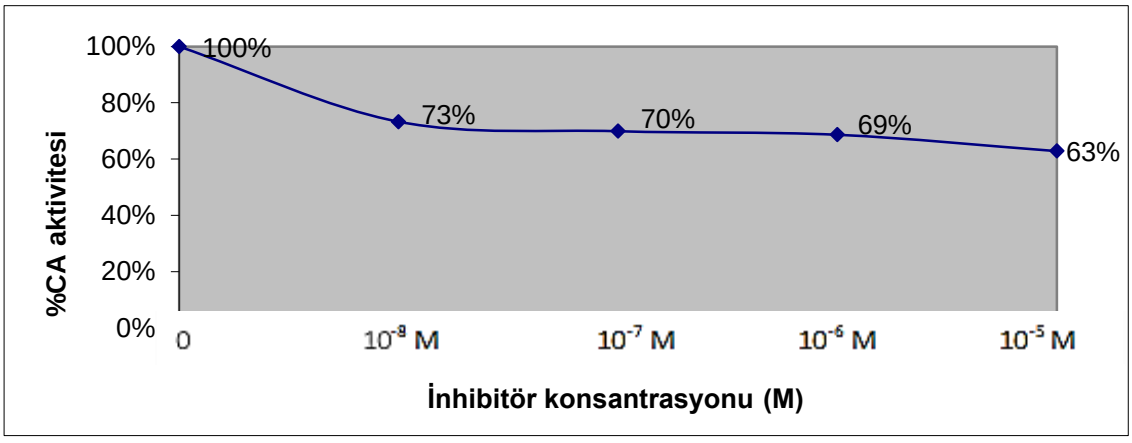
Tablo 4.5. AnA5'in CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	8,1	0,09	0,78

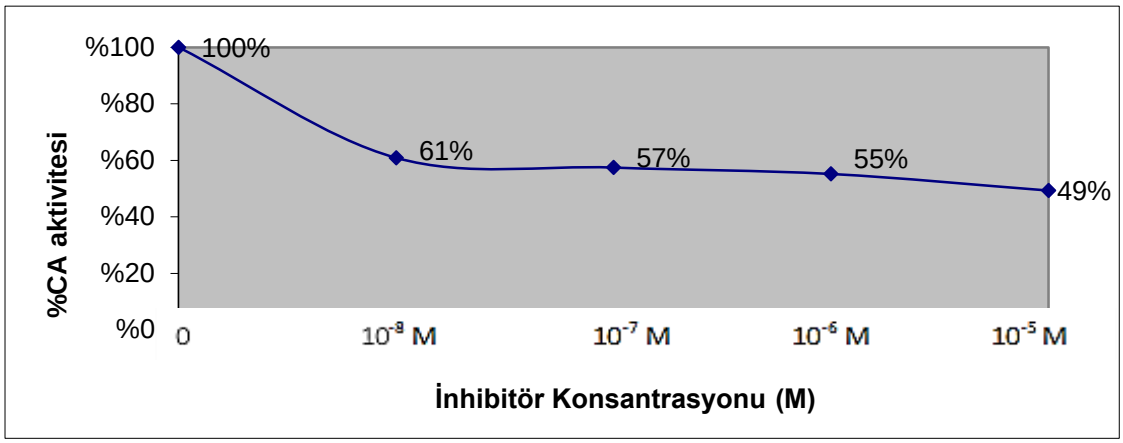
4.6. AnA6

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana6'nın sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.21-4.24'de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.6'da ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

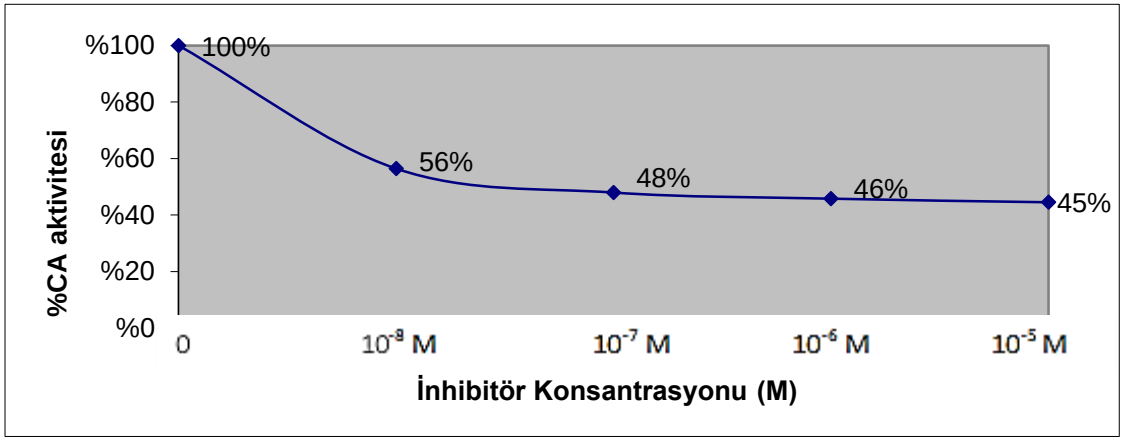
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA6'nın en etkili inhibisyon etkisini CA-IX izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



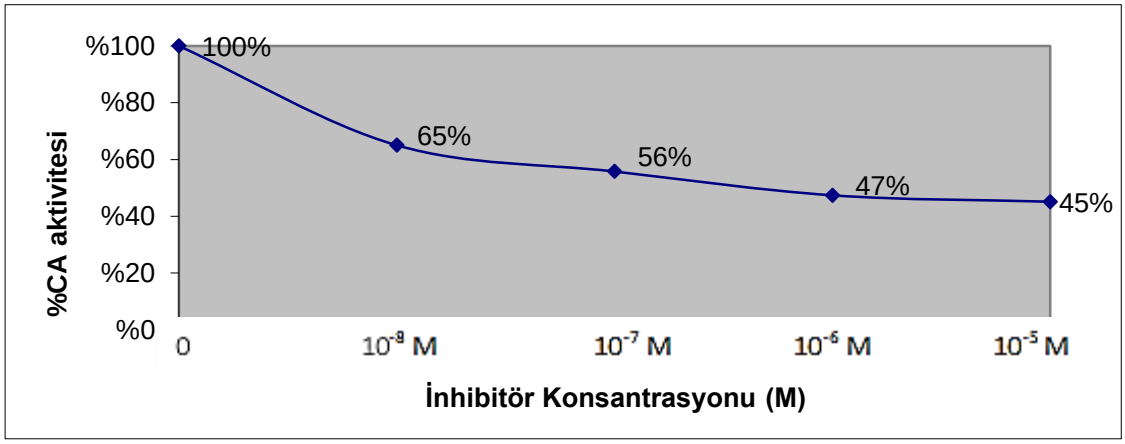
Şekil 4.21. AnA6'nın CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.22. AnA6'nın CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.23. AnA6'nın CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.24. AnA6'nın CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

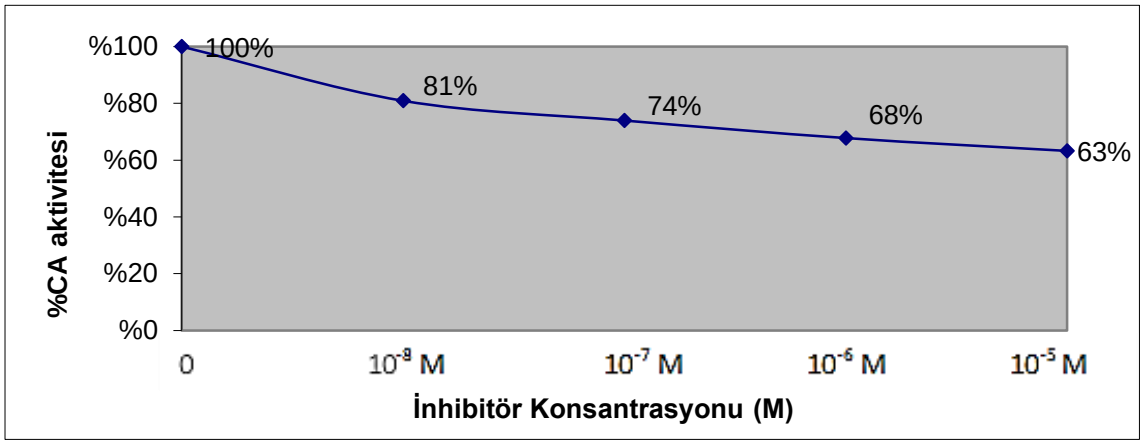
Tablo 4.6. AnA6'nın CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	8,9	0,08	0,72

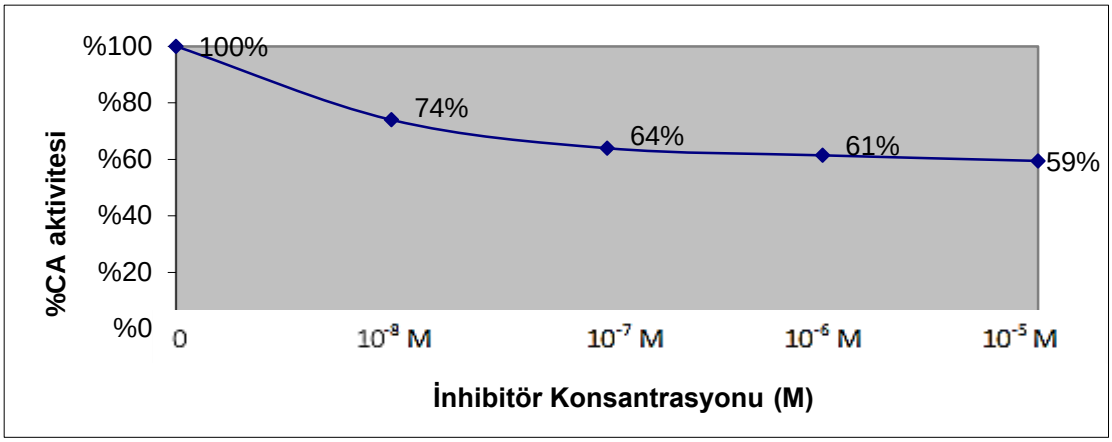
4.7. AnA7

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana7'nin sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.25-4.28'de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.7'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

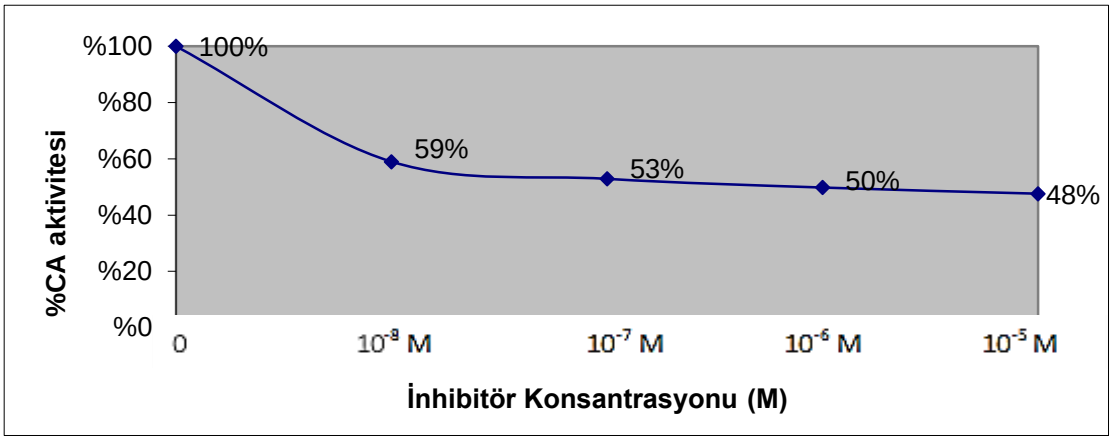
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA7'nin en etkili inhibisyon etkisini CA-XII izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



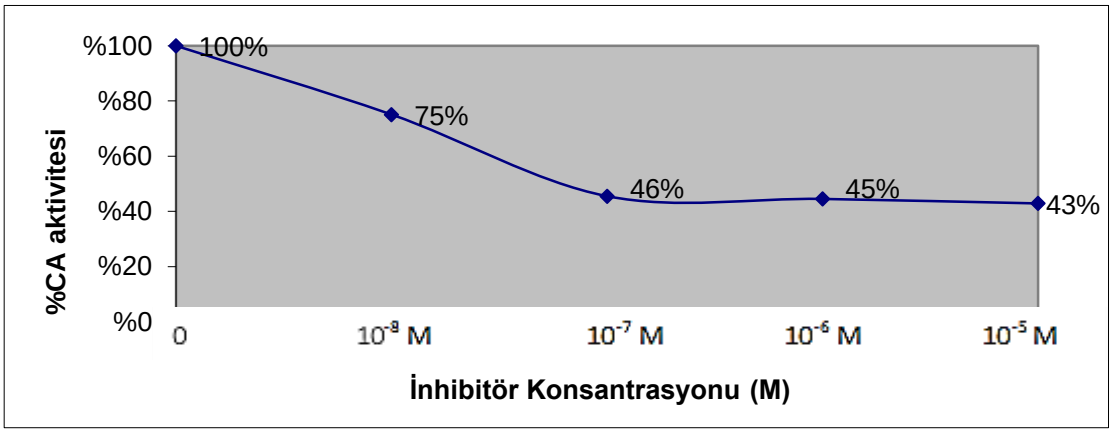
Şekil 4.25. AnA7'nin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.26. AnA7'nin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.27. AnA7'nin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.28. AnA7'nin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

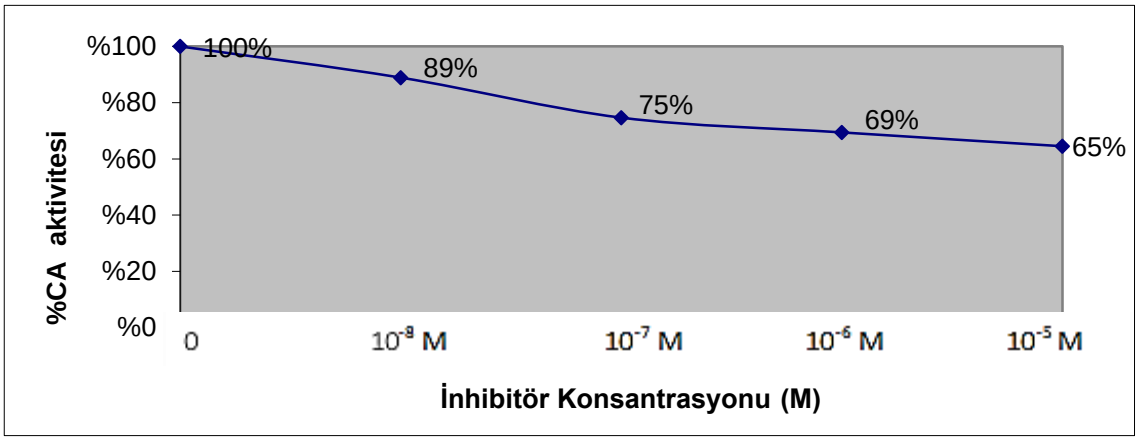
Tablo 4.7. AnA7'nin CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	>10	0,94	0,09

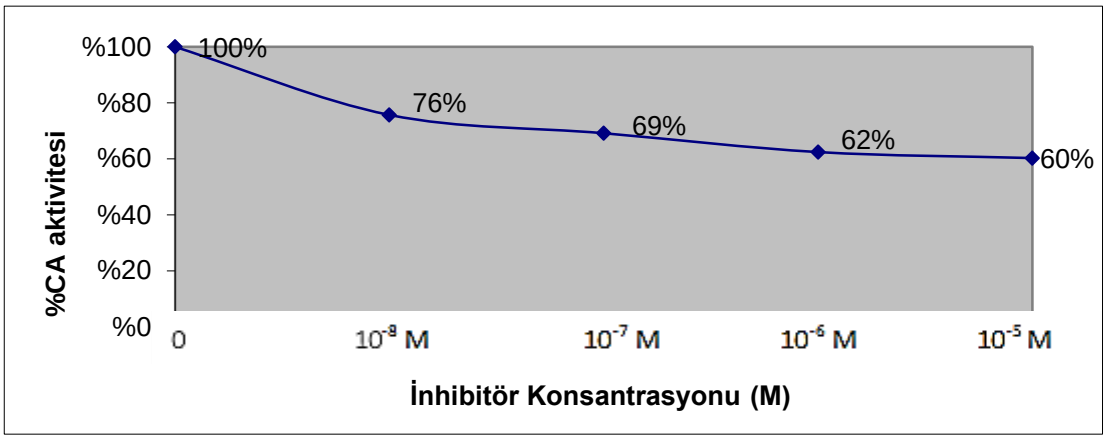
4.8. AnA8

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana8'in sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.29-4.32'de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.8'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

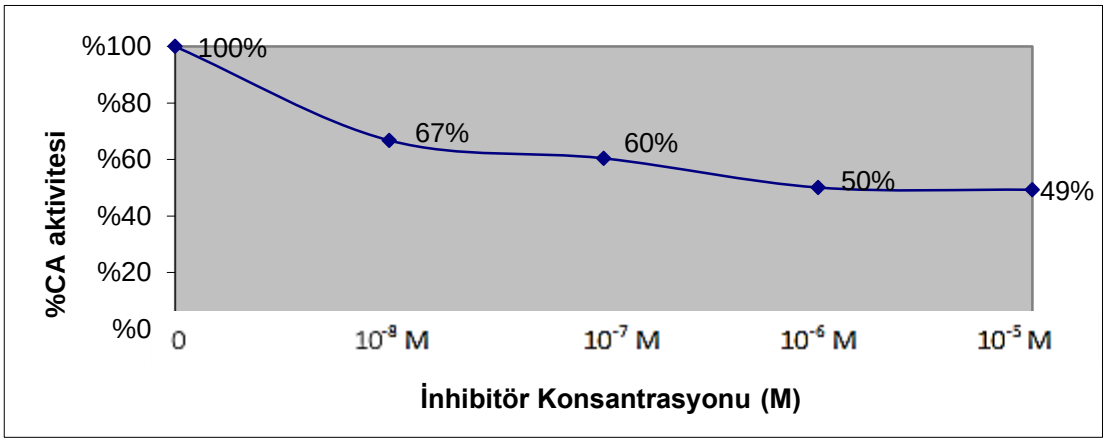
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA8'in en etkili inhibisyon etkisini CA-XII izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



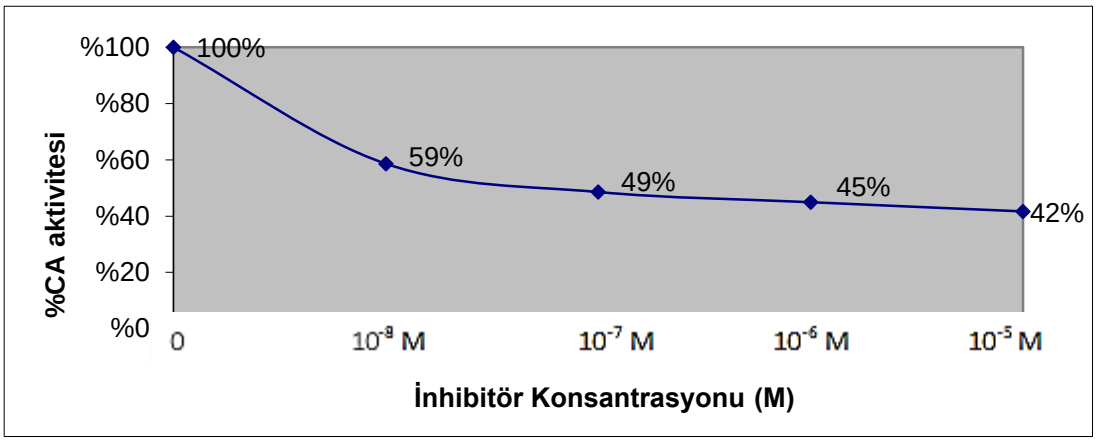
Şekil 4.29. AnA8'in CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.30. AnA8'in CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.31. AnA8'in CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.32. AnA8'in CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

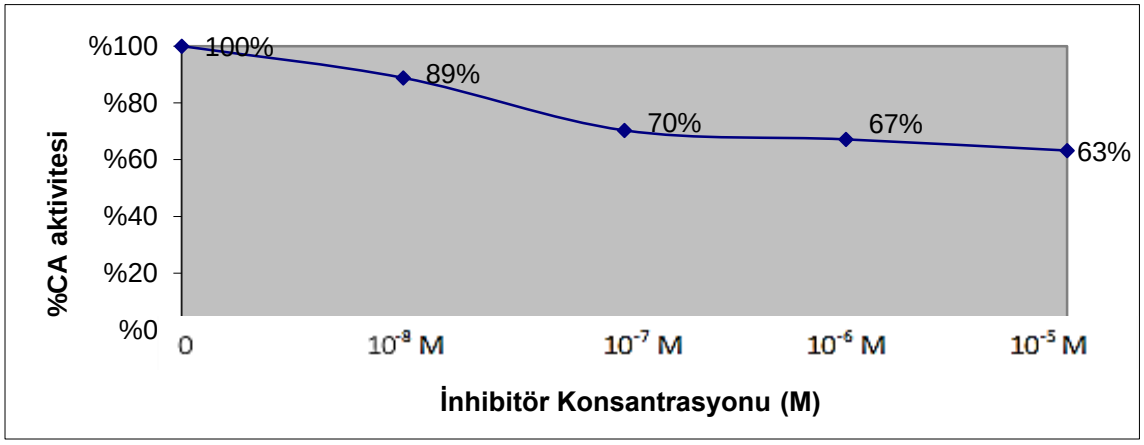
Tablo 4.8. AnA8'in CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	>10	2,07	0,09

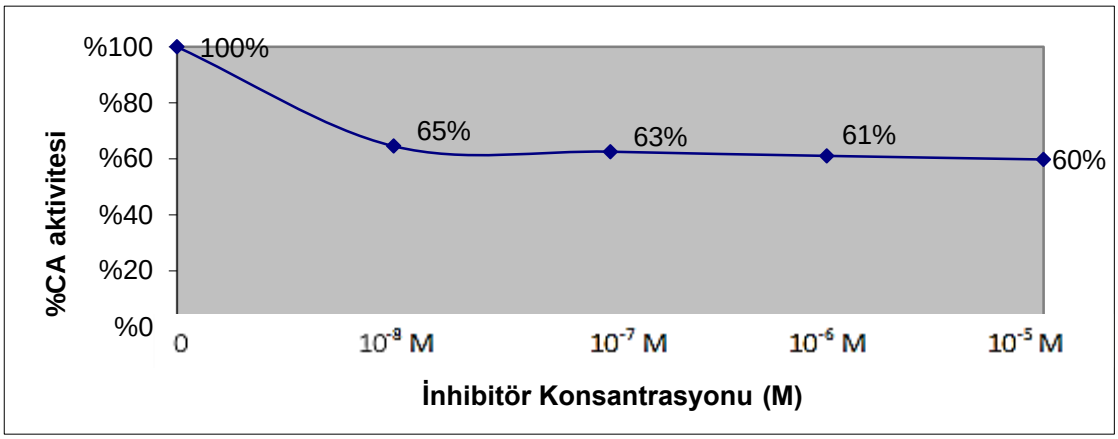
4.9. AnA9

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana9'un sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.33-4.36'da gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.9'da ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

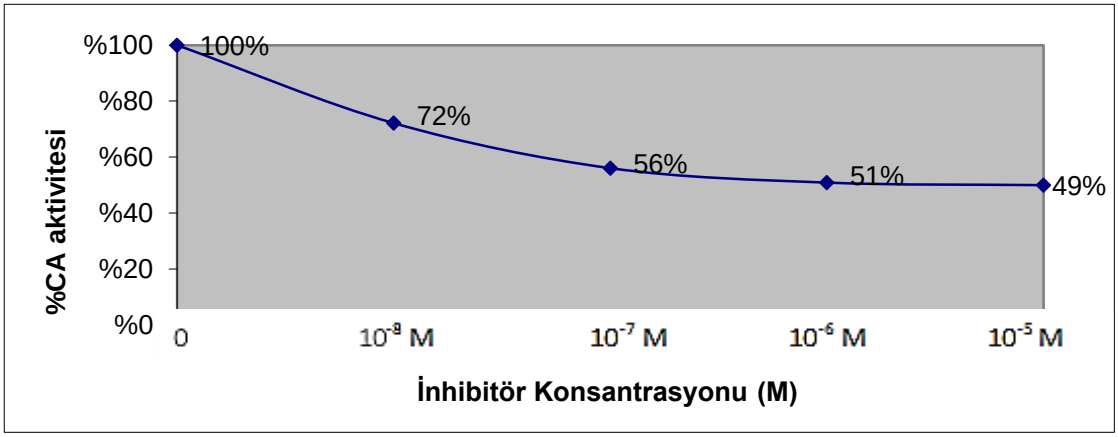
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA9'un en etkili inhibisyon etkisini CA-XII izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



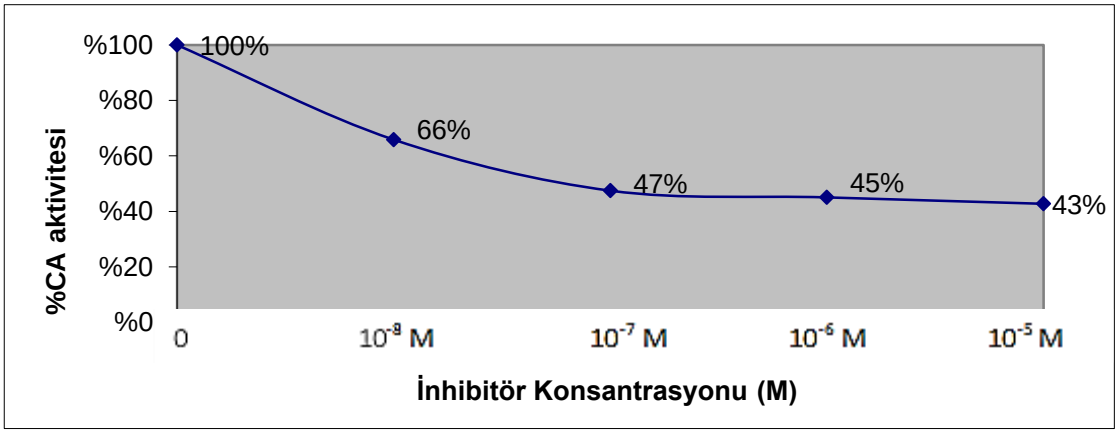
Şekil 4.33. AnA9'un CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.34. AnA9'un CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.35. AnA9'un CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.36. AnA9'un CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

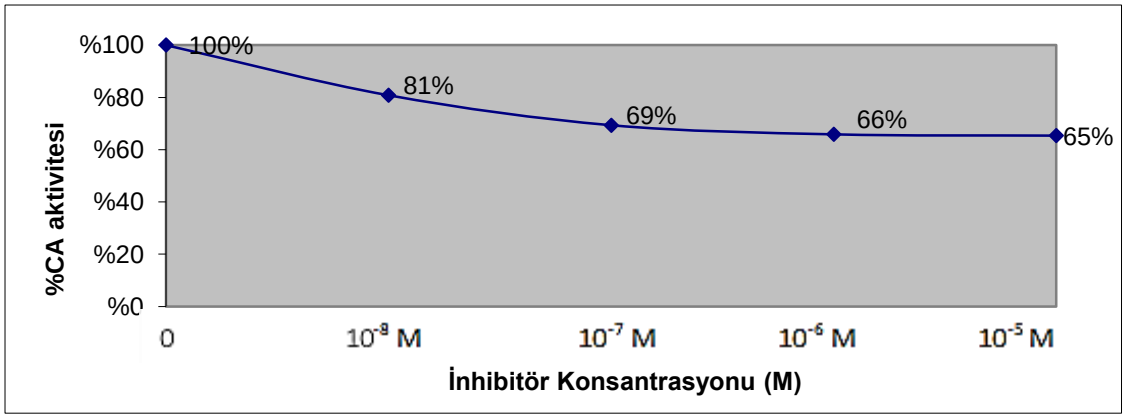
Tablo 4.9. AnA9'un CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	>10	6,71	0,09

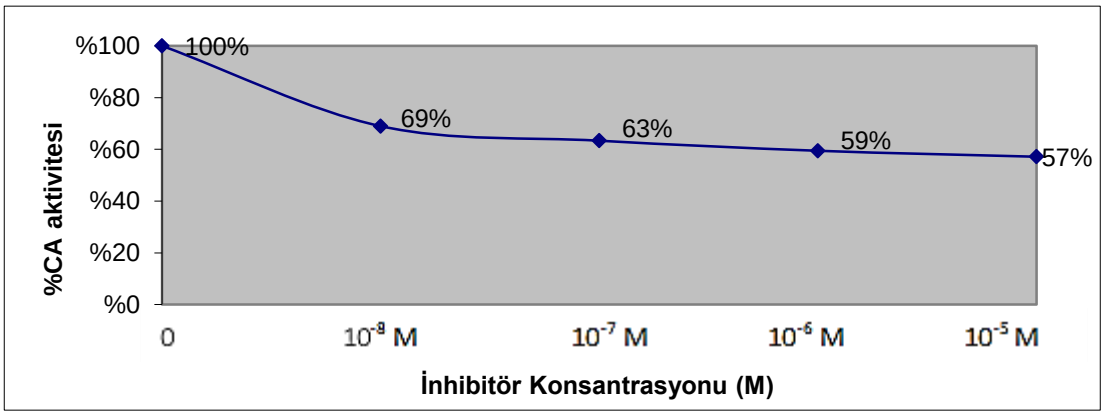
4.10. AnA10

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana10'un sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.37-4.40'da gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.10'da ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

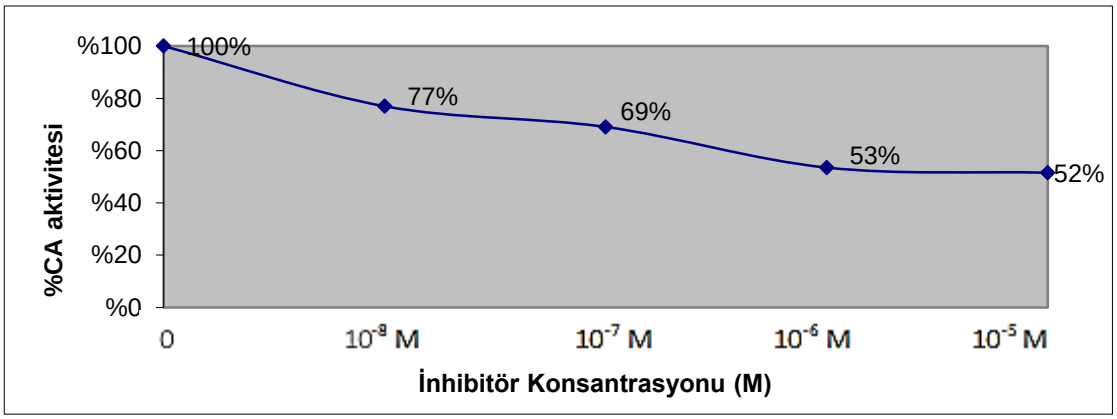
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA10'un en etkili inhibisyon etkisini CA-XII izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



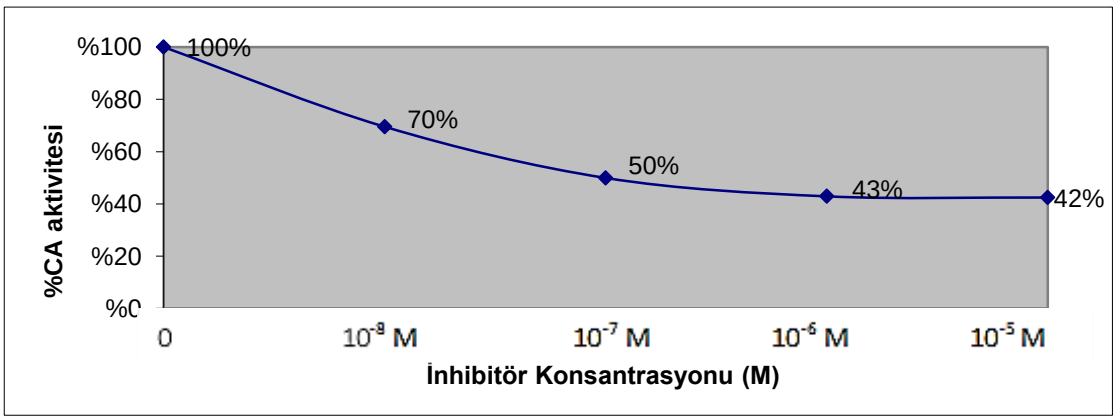
Şekil 4.37. AnA10'un CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.38. AnA10'un CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.39. AnA10'un CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.40. AnA10'un CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

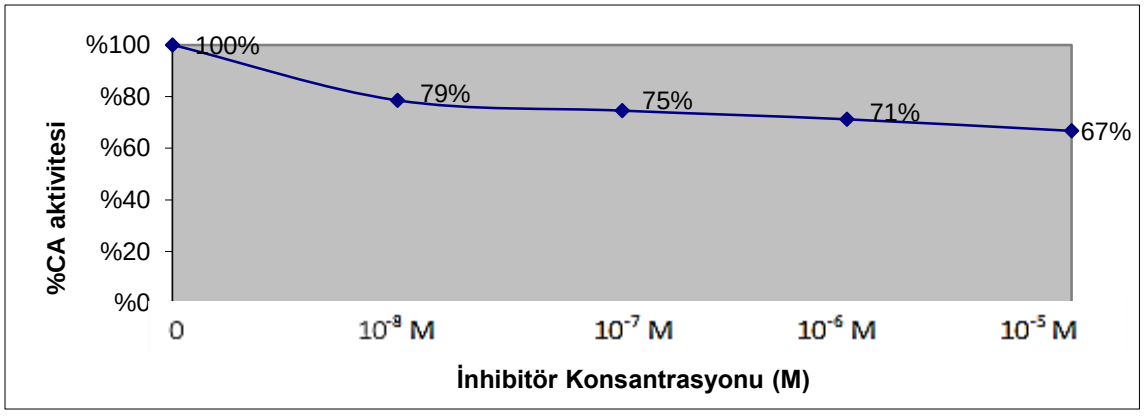
Tablo 4.10. AnA10'un CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	>10	>10	0,09

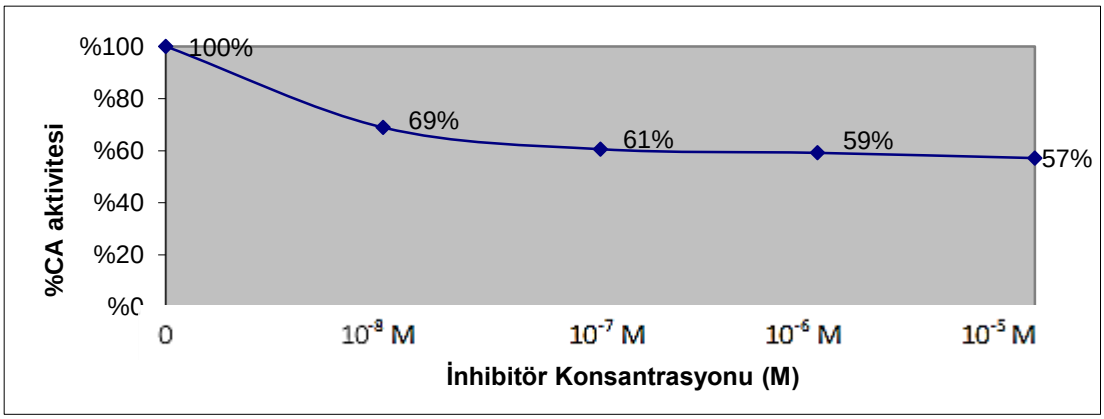
4.11. AnA11

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana11'in sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.41-4.44'de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.11'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

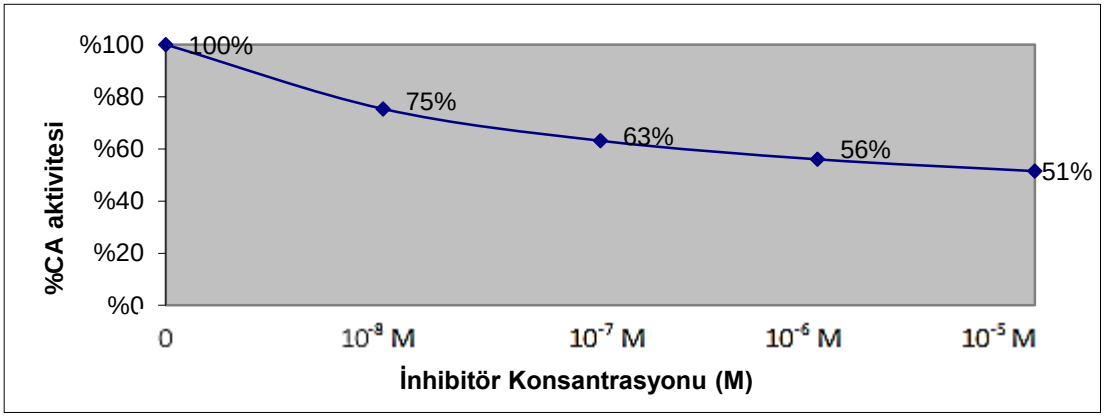
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA11'in en etkili inhibisyon etkisini CA-XII izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



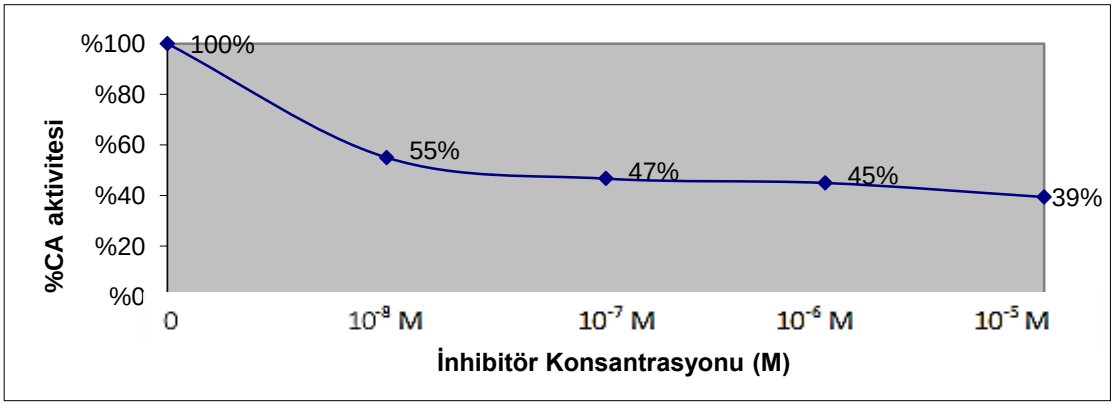
Şekil 4.41. AnA11'in CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.42. AnA11'in CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.43. AnA11'in CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.44. AnA11'in CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

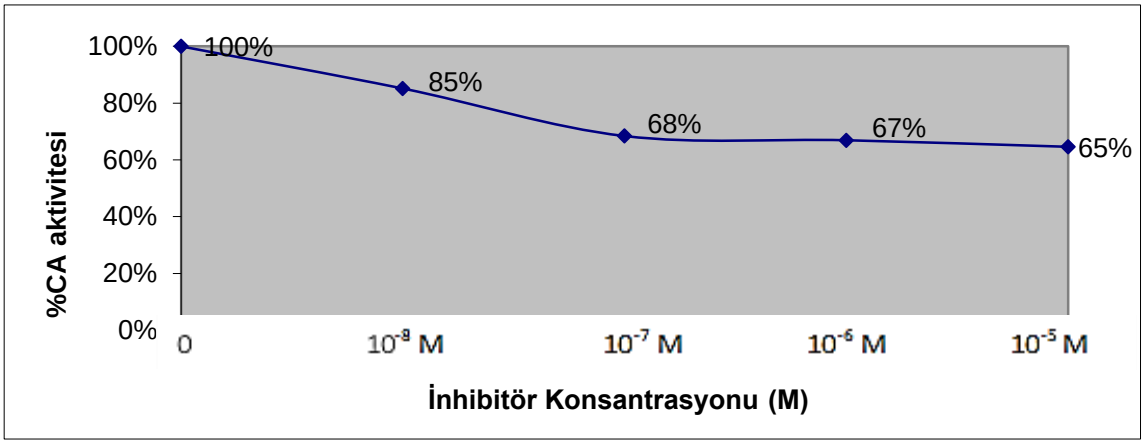
Tablo 4.11. AnA11'in CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	>10	>10	0,06

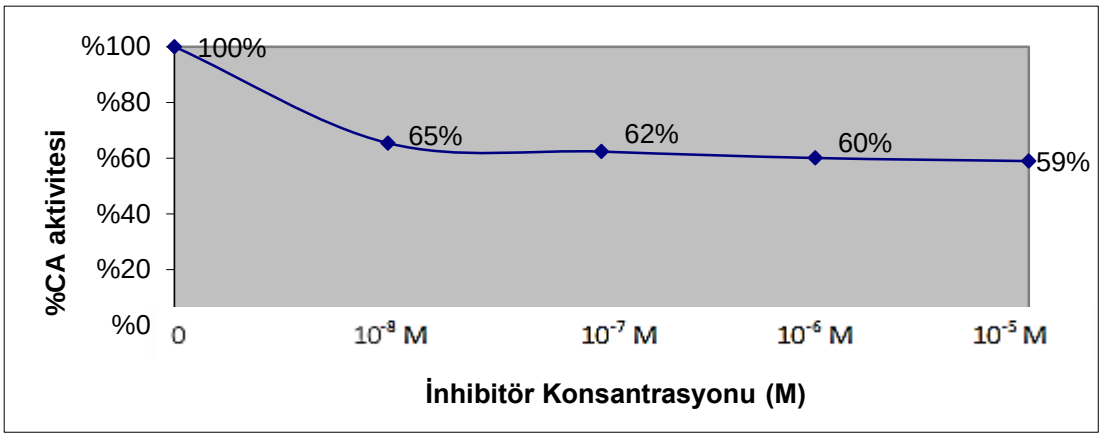
4.12. AnA12

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana12'nin sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.45-4.48'de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.12'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

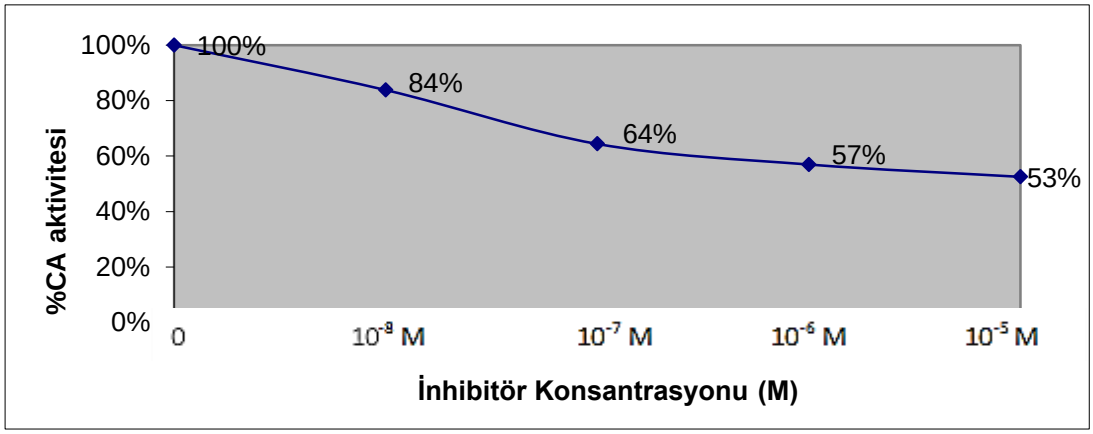
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA12'nin en etkili inhibisyon etkisini CA-XII izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



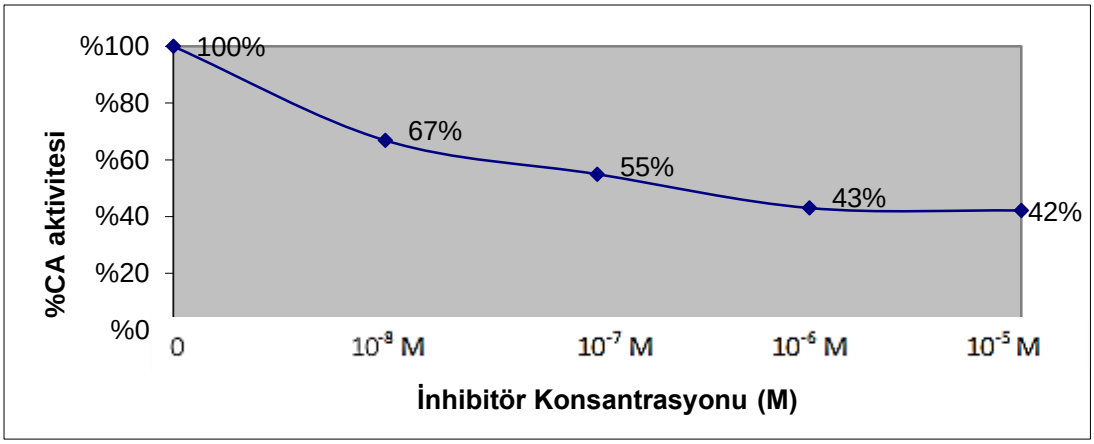
Şekil 4.45. AnA12'nin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.46 AnA12'nin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.47. AnA12'nin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.48. AnA12'nin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

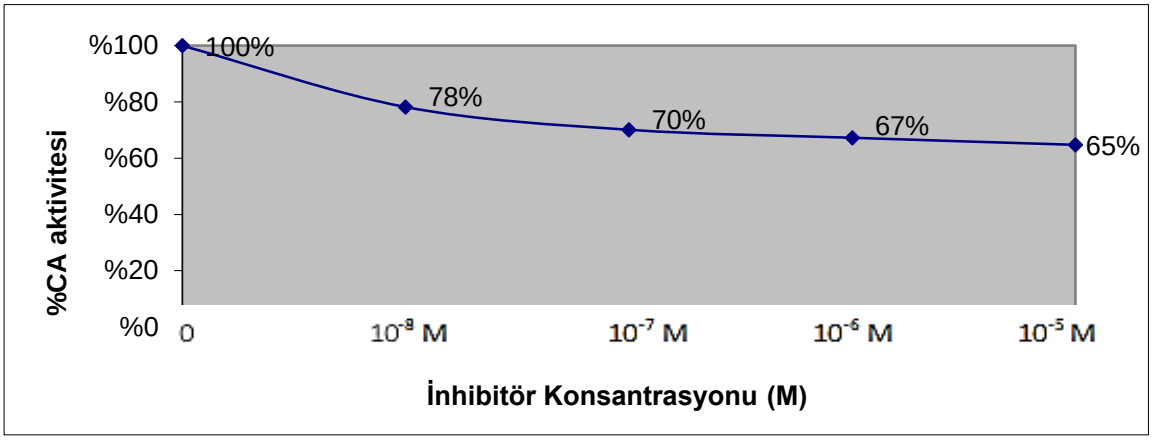
Tablo 4.12. AnA12'nin CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	>10	>10	0,47

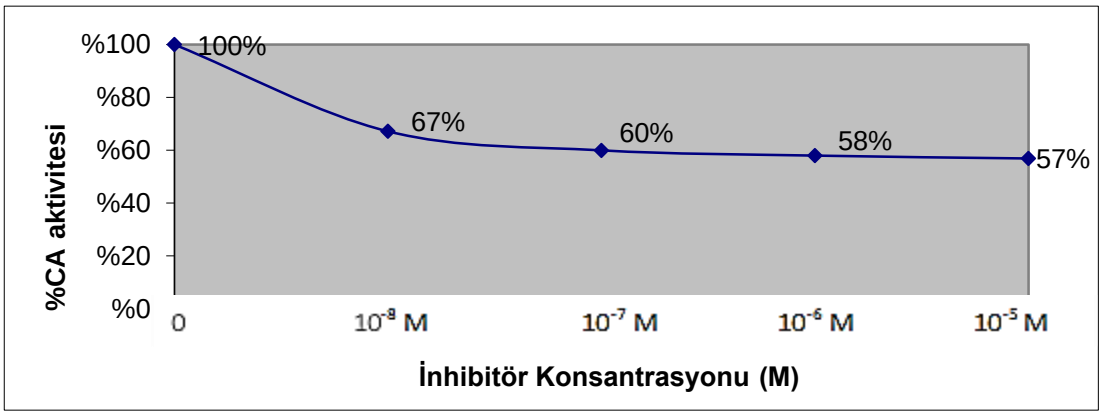
4.13. AnA13

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana13'ün sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.49-4.52'de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.13'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

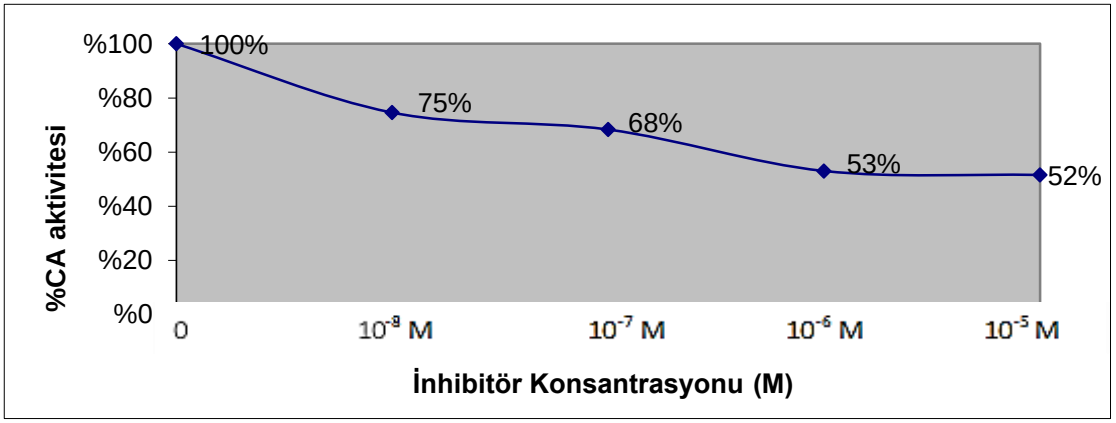
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA13'ün en etkili inhibisyon etkisini CA-XII izoenzimi üzerinde gösterdiği görülmektedir.



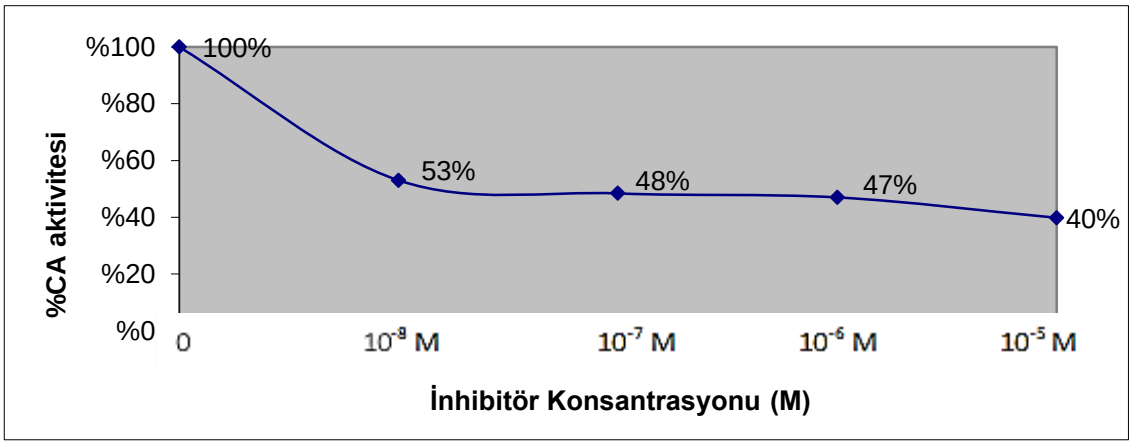
Şekil 4.49. AnA13'ün CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.50. AnA13'ün CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.51. AnA13'ün CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.52. AnA13'ün CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

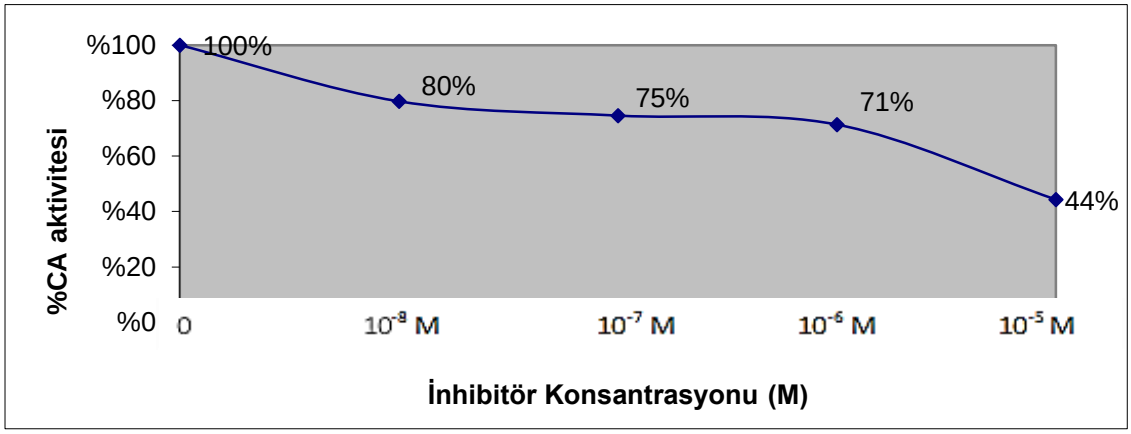
Tablo 4.13. AnA13'ün CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
>10	>10	>10	0,07

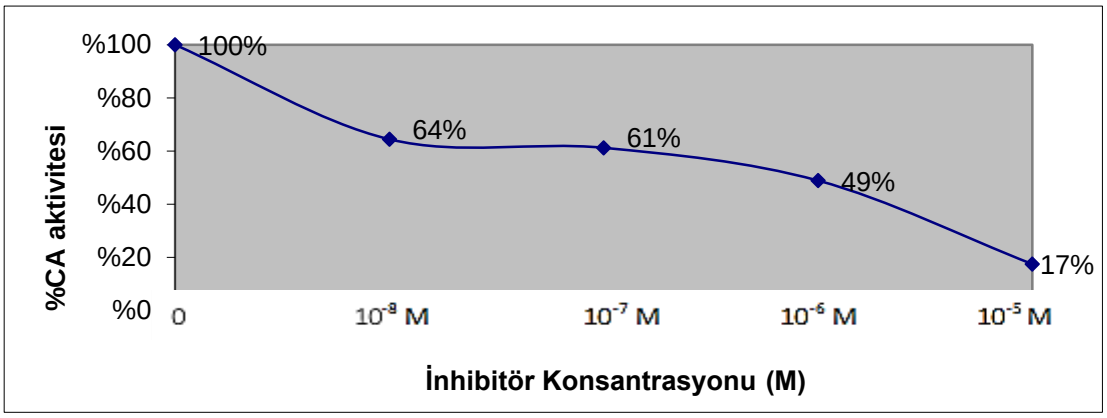
4.14. AnA14

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevi olan Ana14'ün sitozolik CA izoenzimleri olan CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA izoenzimleri olan CA-IX ve CA-XII üzerindeki üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler şekil 4.53-4.56'de gösterilmiştir. İnhibisyon grafikleri 4 ayrı inhibitör konsantrasyonu için çizilmiştir (10^{-8} M-10^{-5} M). Tablo 4.14'de ise söz konusu izoenzimlerin I_{50} değerleri verilmiştir.

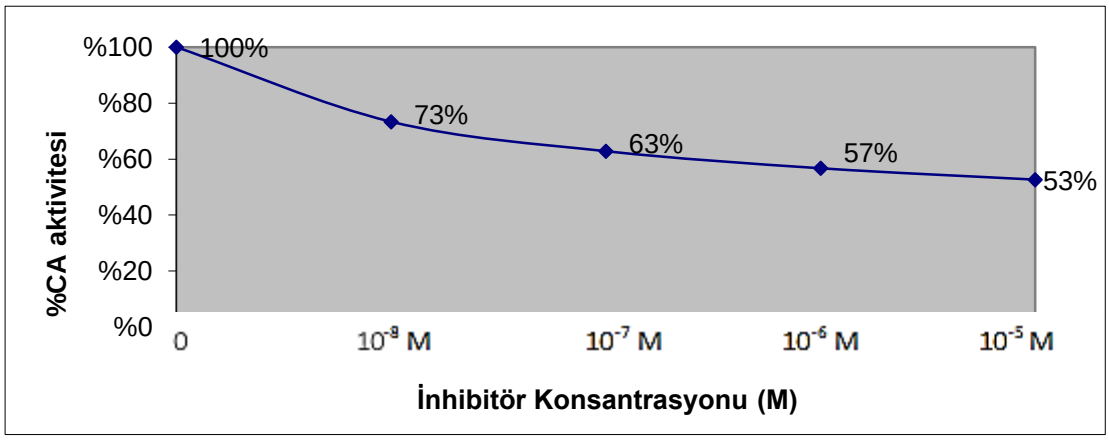
Grafiklere ve tabloya bakıldığında AnA14'ün en etkili inhibisyon etkisini CA-XII ve CA-II izoenzimleri üzerinde gösterdiği görülmektedir.



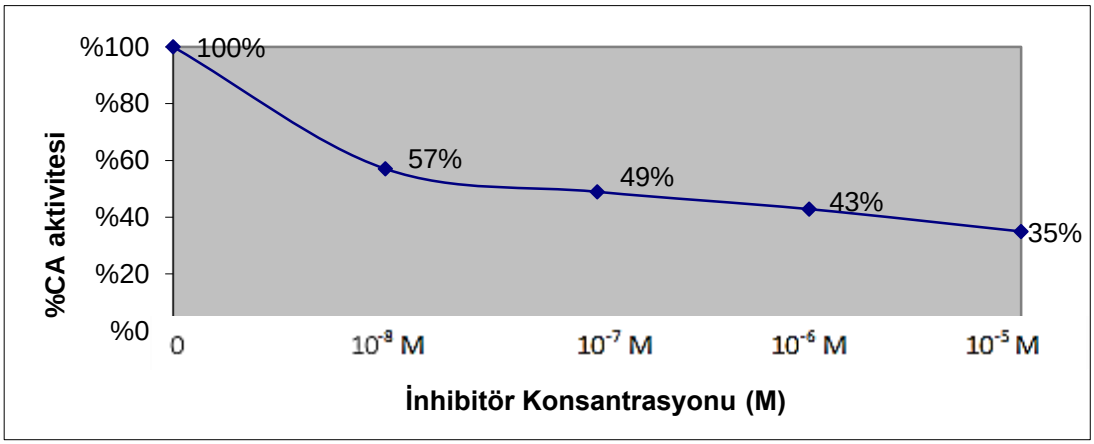
Şekil 4.53. AnA14'ün CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.54. AnA14'ün CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.55. AnA14'ün CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.56. AnA14'ün CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Tablo 4.14. AnA14'ün CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri

I_{50} değerleri (µM)			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
8,11	0,9	>10	0,09

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada tümör ilişkili CA'lar; CA-IX, CA-XII ve sitozolik CA'lar; CA-I, CA-II izoenzimleri üzerinde 14 adet yeni sentezlenmiş benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevlerinin inhibisyon çalışmaları yapılmıştır.

CA-IX ve CA-XII izoenzimleri, tümörlü dokularda ekspresyonu gözlenen CA izoenzimleridir (85). CA-IX ve CA-XII'nin yüksek katalitik aktiviteleri sayesinde tümör mikroçevresinin asidifikasyonu sağlanmaktadır ve tümör hücrelerinin ekstrasellüler matrix boyunca ilerlemesi kolaylaşmaktadır (86). CA-IX ve CA-XII, tümör hücrelerinde eksprese olduklarından dolayı potansiyel birer anti-kanser hedefi olarak ifade edilmektedirler (63). Bu tümör ilişkili izoenzimlerin farmakolojik etkileri söz konusu bu izoenzimler ve antikanser tedaviler için önemli bir yaklaşımdır.

Çalışmamızda orijinal olarak sentezlenen benzotiyazoller; antitüberküler, antimikrobiyal, antimalaryal, antikonvülsant, antihelmintik, aneljezik, antiinflamatuvar, antiobezite ve antitümör gibi farmakolojik aktivitelere sahiptirler (104). Bundan dolayı benzotiyazoller ile yapılan modifikasyon çalışmaları ile birçok benzotiyazol türevi ve çok çeşitli farmakolojik özellikler elde edilmiştir (106).

Sülfonamidler CA inhibisyonu Zn^{+2} bağlayıcı fonksiyonu için kullanılan en önemli yapılardan biridir (45). Bir çok sülfonamid bileşiği , CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerine olan inhibisyon etkisini bulmak için araştırılmaktadır (101). CA-IX ve CA-XII izoenzimlerine karşı seçici inhibisyon etkisi gösteren ve kanser tedavisinde söz konusu bu izoenzimleri hedefleyen sülfonamid türevleri geliştirmeye yönelik çalışmalar devam etmekte ve bu inhibitörlerin klinikte kullanımının uygun hale getirilmesi amaçlanmaktadır (97).

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamidlerin CA üzerinde inhibisyon etkisi olduğu literatürde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (109). Bu moleküllerin metabolik asidoz ve intraoküler basıncı azalttığı literatürde yapılan çalışmalarda

mevcuttur (110). Günümüzde, antitümör aktivitesini artırmak için benzotiyazoller üzerinde çeşitli modifikasyon çalışmaları yapılmaktadır.

Supuran ve grubunun yaptıkları bir çalışmada, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri için dizayn ettikleri 6.pozisyonunda sülfonamid içeren 2-aminobenzotiazollerin bu izoenzimler üzerinde Ki değerlerini CA-IX için; 2,1-295 nM, CA-XII için; 4,3-9,5 nM, CA-II için; 3.5-45.4 nM; CA-I için ise 7,5-77,1 nM aralığında bulmuşlardır. İnhibitörlerin sülfonamid grubunun CA izoenzimlerinin aktif bölgedeki Zn^{+2} iyonuna, benzotiyazol grubunun ise Zn^{+2} iyonuna 5 Å uzaklığındaki aktif bölge kavitesine bağlandığını gözlemlemişlerdir (111).

Söz konusu çalışmada, yeni sentezlenmiş benzotiyazol-2-il-benzen sülfonamidlerin CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın özgünlüğünü sülfonamid grubunun bağlanma pozisyonunun farklılığı oluşturmaktadır. Çünkü çalışmamızda sülfonamid grubu, hem benzotiyazol grubunun 2. karbon atomuna, hem de bir benzen halkasına bağlanmıştır. Benzotiyazol-2-il-benzensülfonamidlerin CA-IX ve CA-XII için daha etkin inhibisyon gösterdiği, ancak 6.pozisyonunda sülfonamid içeren 2-aminobenzotiazollerin CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri için etkin inhibisyon etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden yeni sentezlenen bu inhibitörlerin tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin anti-kanser ajanı olarak hedeflenmesinde aday moleküller olduğu kanaatindeyiz.

İnhibisyona neden olan benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevlerinin inhibisyon etkisi Ki ve I_{50} olmak üzere iki farklı değerle verilebilir (38).

En pratik parametre I_{50} değeridir. Çünkü, K_i sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit inhibitör konsantrasyonunda beş farklı substrat konsantrasyonu için hız değerleri belirlenmektedir (120). Bu nedenle çok sayıda araştırmacının inhibisyon etkisini tespit etmek için I_{50} değerini kullandıkları literatürde gösterilmektedir (121-124). I_{50} değeri; substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmesi ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonun tespiti ile hesaplanmaktadır (38) .

Dolayısıyla çalışmamızda daha pratik olan I_{50} değerleri tespit edilmiştir.

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevlerinin I_{50} değerlerini bulmak için Stopped-Flow Kinetik aletinde optimum şartlarda CO_2 substratının doygun konsantrasyonunda (1.7-17 mM) çalışılmıştır. Bu amaçla kullanılan Maren metodu CA aktivitesinde bilinen eski ve en çok tercih edilen metottur (125). Ancak özellikle CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin aktivitelerinin yüksek olması ve tümörlü dokularda eksprese olması nedeniyle enzim aktivite tayin ölçümünü mümkün kılmamaktadır. Stopped-Flow yöntemi ise bilinen en hızlı kinetik tekniklerden biridir (113). Bu yüzden çalışmamızda daha hassas olan Stopped-Flow Kinetik aleti ile aktivite tayin metodu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4. 1-4. 56 grafikleri ve Tablo 4.1-4.14 ile verilmiştir. Çalışmamızda kullanılan 14 adet yeni sentezlenmiş benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevleri için söz konusu CA izoenzimlerini inhibisyon değerleri Tablo 5.1 ve Şekil 5.1-5.2'de ise karşılaştırılmalı olarak özetlenmiştir. Buna göre;

AnA14; CA-I ve CA-II için en etkili bileşik olarak tespit edilmiştir. Buna göre belirlenen I_{50} değerleri sırası ile 8,11 ve 0,9 µM'dır. AnA14 bileşiği, CA-II izoenzimi üzerinde CA-I izoenzimine göre çok daha etkin bir inhibisyon etkisi göstermiştir.

AnA4, AnA5, AnA6, tümör ilişkili CA-IX izoenzimi için en iyi inhibisyon etkisini gösteren bileşiklerdir. I_{50} değerleri sırasıyla, 0,08; 0,09; 0,08 µM olarak bulunmuştur.

AnA7, AnA8, AnA9, AnA10, AnA11, AnA13 , ve AnA14 tümör ilişkili diğer bir izoenzim CA-XII için etkili inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerdir. I_{50} değerleri CA-XII için sırasıyla 0,09; 0,09; 0,09; 0,09; 0,07; 0,09 µM olarak bulunmuştur.

AnA3, AnA5 ve AnA6 bileşikleri, CA-II, CA-IX, CA-XII izoenzimlerinin üçünüde etkili bir şekilde inhibe etmiştir. AnA3'ün I_{50} değerleri sırasıyla 5,46; 0,3; 0,9 µM olarak; AnA5'in I_{50} değerleri sırasıyla 8,1; 0,09; 0,78 µM olarak; AnA6'nın I_{50} değerleri ise sırayla 8,9; 0,08; 0,72 µM olarak belirlenmiştir.

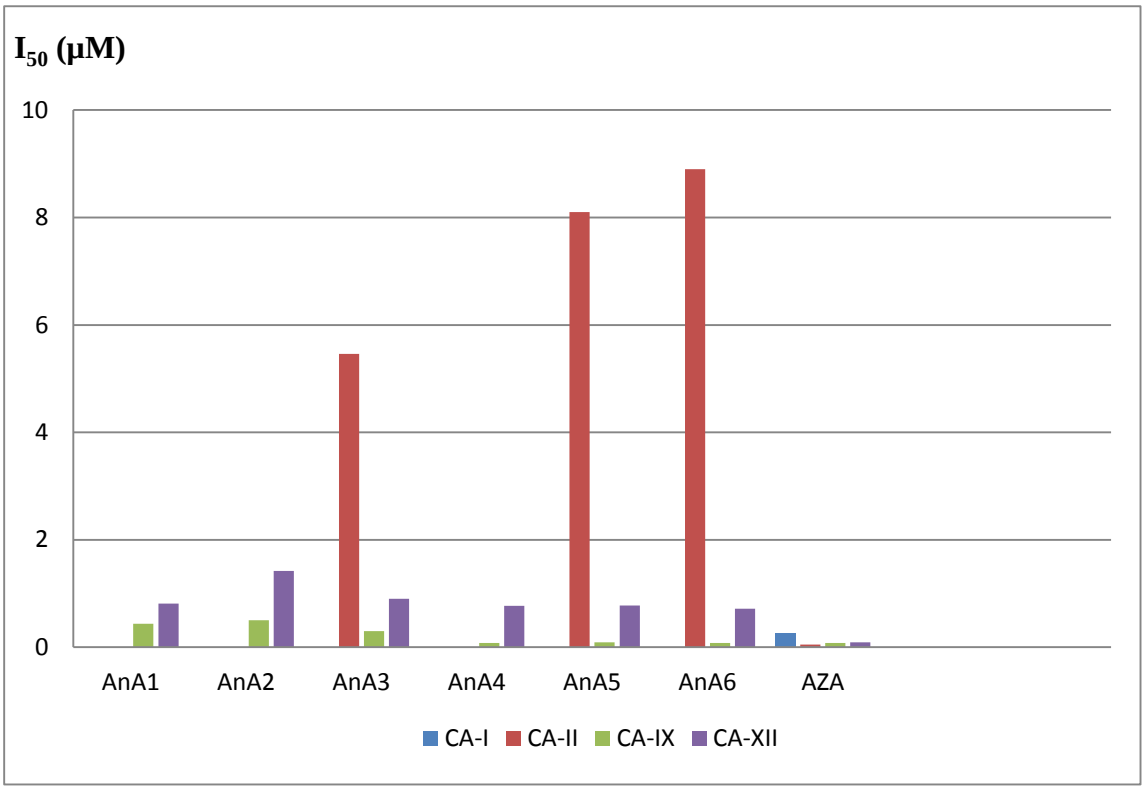
AnA1 ve AnA2 bileşiklerinin de tümör ilişkili CA izoenzimlerini etkin bir şekilde inhibe ettikleri görülmektedir. AnA1'in I_{50} değerleri CA-IX için 0,44 µM; CA-XII için 0,81 µM'dır. AnA2 bileşiği kullanılarak elde edilen I_{50} değerleri ise CA-IX için 0,5 µM; CA-XII için 1,42 µM'dır.

Tablo 5.1. Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid örneklerinin CA-I, CA-II, CA-IX, CA-XII izoenzimleri üzerinde gözlenen inhibisyon değerleri (AZA kontrol olarak kullanılmıştır).

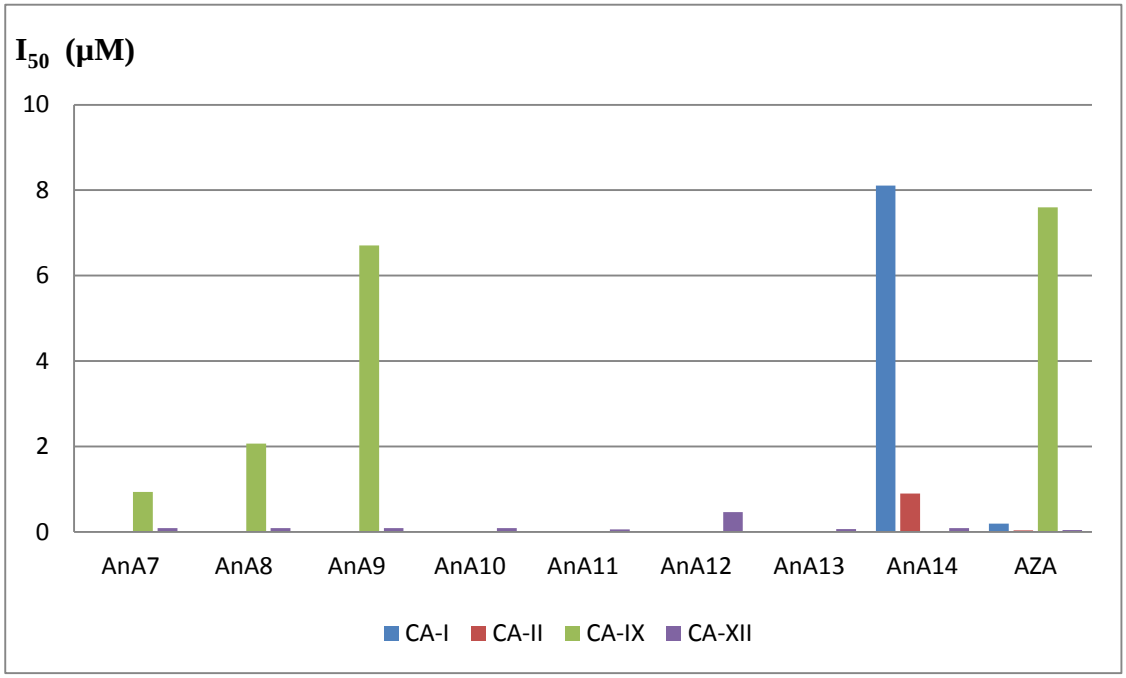
I_{50} (µM)				
İzoenzim				
İnhibitör	**CA-I**	**CA-II**	**CA-IX**	**CA-XII**
AnA1	>10	>10	0,44	0,81
AnA2	>10	>10	0,5	1,42
AnA3	>10	5,46	0,3	0,9
AnA4	>10	>10	0,08	0,77
AnA5	>10	8,1	0,09	0,78
AnA6	>10	8,9	0,08	0,72
AZA	0,25	0,005	0,08	0,09
AnA7	>10	>10	0,94	0,09
AnA8	>10	>10	2,07	0,09
AnA9	>10	>10	6,71	0,09
AnA10	>10	>10	>10	0,09
AnA11	>10	>10	>10	0,06
AnA12	>10	>10	>10	0,47
AnA13	>10	>10	>10	0,07
AnA14	8,11	0,9	>10	0,09
AZA	0,2	0,009	7,6	0,05

Benzotiyazol grubu içeren sülfonamid olan ve çalışmada kullanılan AnA14' ün tümör ilişkili CA-XII' yi inhibe ederken, sitozolik olan CA-I ve CA-II izoenzimlerini de inhibe ettiği, CA-IX' u ise inhibe etmediği görülmektedir. Bu yüzden AnA14 inhibitörünün tümör ilişkili CA-IX izoenzimi için seçiciliği söz konusu değildir. Ancak, AnA14'ün CA-II izoenzimi üzerinde gösterdiği etkili inhibisyon oldukça dikkat çekmektedir. AnA14 bileşiğinin CA-II ile ilişkili hastalıklarda CA-II'yi hedeflemede aday bir molekül olabileceği düşünülmektedir.

AnA5 ve AnA6 bileşikleri CA-IX'u etkin bir şekilde inhibe etmenin yanında, CA-II üzerindede etkili bir inhibisyon etkisi gösterdiği için CA-IX'u hedeflemede AnA4' ün daha etkin olacağı söylenebilir. Bu nedenle AnA4'ün özellikle tümör ilişkili CA-IX üzerindeki etkin inhibisyonu bu bileşiğin gelecekteki anti-kanser ilaç dizaynları için önem arz etmektedir.



Şekil 5.1. Benzotiyazol grubu içeren sülfonamidlerin (AnA1-AnA6), CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri (10^{-8}-10^{-5} M arasındaki inhibisyon değerleri gösterilmiştir.)



Şekil 5.2. Benzotiyazol grubu içeren sülfonamidlerin (AnA7-AnA14), CA izoenzimleri üzerindeki I_{50} değerleri (10^{-8}-10^{-5} M arasındaki inhibisyon değerleri gösterilmiştir.)

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak yapılan çalışmada aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- Tümör ilişkili CA izoenzimleri CA-IX ve CA-XII üzerinde benzotiyazol grubu içeren sülfonamid türevlerinin inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

- Ayrıca bu bileşiklerin sitozolik CA izoenzimleri CA-I ve CA-II üzerindeki inhibisyon etkileride araştırılmıştır.

- Benzotiyazol grubu içeren sülfonamidlerin tümör ilişkili CA izoenzimleri üzerinde sitozolik olan CA izoenzimlerine göre daha etkili bir inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir.

- CA-I izoenzimi üzerinde AnA14 bileşiği en etkili inhibisyon etkisini göstermiştir.

- AnA3, AnA5, AnA6 ve AnA14, CA-II için etkili inhibisyon özellikleri gösteren sülfonamid türevleridir

- AnA14 bileşiği, CA-II izoenzimi üzerinde çok etkili bir inhibisyon göstermiştir. AnA14 bileşiği CA-II ile ilişkili hastalıklarda CA-II' yi hedeflemede aday bir molekül olabilir.

- AnA4, AnA5 ve AnA6, CA-IX için etkili inhibisyon özellikleri gösteren benzotiyazol grubu içeren sülfonamid örnekleridir.

- AnA4, CA-IX izoenzimini hedeflemede ideal bir molekül olabilir.

- AnA7, AnA8, AnA9, AnA10, AnA11, AnA13 ve AnA14, CA-XII için etkili inhibisyon özellikleri gösteren sülfonamid bileşikleridir.

- CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin aktiviteleri dizayn edilecek olan çeşitli aktivatör ve inhibitörlerle düzenlenebilir. Bu sayede sağlıklı olan hücrelerin fizyolojik görevlerini yerine getirmesi için elzem olan sitozolik CA

izoenzimleri etkilenmeksizin kanser tedavisinde minimum toksisite, maksimum terapötik hedef yaklaşımı sağlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer. 2 Mart 2015.

2. Parveen S, Sahoo SK. Polymeric nanoparticles for cancer therapy. *J. Drug Target.* 2008;16: 108–123.

3. Supuran CT. Carbonic Anhydrase: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. *Nature Reviews*. 2008;7:168.

4. Monti SM, Supuran CT, De Simone G. Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008 - 2013). *Expert Opin Ther Pat.* 2013; 23(6) :737-49.

5. Opavský R, Pastoreková S, Zelník V, Gibadulinová A, Stanbridge EJ, Závada J, Kettmann R, Pastorek J. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics*. 1996; 33(3): 480-7.

6. Decoursey TE. Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol Rev.* 2003; 83(2): 475-579.

7. http://www.auburn.edu/~deruija/pda1_acids2.pdf. 23 Şubat 2015.

8. Corner J, Bailey C. *Cancer Nursing Care in Context,* Blackwell Publishing. Oxford. (2001).

9. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. 4 Şubat 2015.

10. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. *Concepts of genetics*. Pearson education, Inc. publishing as Prentice Hall, Copyright. (2006).

11. http://www.propanc.com/what-we-do/disease-background.php. 2 Şubat 2015.

12. Does A, Johnson N.A, Thiel T. Rediscovering biology: Molecular to Global perspectives. Cell biology and Cancer. http://www.learner.org/courses/biology/ support/ textbook_full.pdf. 4 Şubat2015.

13. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(4): 263-74.

14. http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=ProtoOncogenes &lang=1. 3 Mart 2015.

15. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York, Garland Science, 2008: 1106.

16. Quinn M, McMillin M, Frampton G, Afroze SH, Huang L, DeMorrow S. The Role of the Tumor Microenvironment in the Pathogenesis of Cholangiocarcinoma. Julianov A. *Liver tumor*. ISBN: 978-953-51-0036-2 InTech. 2012: 59-74. http://www.intechopen.com/books/liver-tumors. 4 Şubat 2015.

17. Weber CE, Kuo PC. The tumor microenvironment. *Surg Oncol*. 2012 ; 21(3): 172-7.

18. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* 2012 ; 125.

19. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 2010; 123: 4195-4200.

20. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* 2013; 13(1): 89.

21. Helmlinger G, Sckell A, Dellian M, Forbes NS, Jain RK. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(4): 1284–1291.

22. Gökmen N. Perioperatif Hipoksi Tanımı ve Fizyopatolojisi. http://webb.deu.edu.tr/anestezi/images/dosya-yukle/ngokmen.pdf. 4 Şubat 2015.

23. Bryant JL, Meredith SL, Williams KJ, White A. Targeting hypoxia in the treatment of small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014; 86(2): 126-32.

24. Poon E, Harris AL, Ashcroft M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Rev Mol Med.* 2009; 11: 1-18.

25. Erbel PJ, Card PB, Karakuzu O, Bruick RK, Gardner KH. Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix--loop--helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(26): 15504-9.

26. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010; 29(5): 625-34

27. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(10): 721-32.

28. Imtaiyaz Hassan M, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg Med Chem.*2013; 21(6): 1570-82.

29. Aguilera J, Van Dijken JP, De Winde JH, Pronk JT. Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of Saccharomyces cerevisiae at atmospheric carbon dioxide pressure. *Biochem J*. 2005; 391: 311-316.

30. Lionetto ML, Caricato R, Giordano ME, Erroi E, Schettino T. Carbonic Anhydrase and Heavy Metals. Ekinci D. *Biochemistry.* ISBN: 978-953-51-0076-8 InTech. 2012: 205-224. http:// cdn.intechopen.com /pdfs-wm /30569. pdf. 9 Şubat 2015.

31. Çomaklı V, Yerlikaya E, Demirdağ D, Küfrevioğlu Öİ. Purification and Characterization of a-Carbonic Anhydrase II from Sheep Liver and Examining the Inhibition Effect of Kanamycin on Enzyme Activity. *Hacettepe J. Biol. & Chem.* 2012; 40 (2): 133–138.

32. Hilvo M. Expression and Biochemical Properties of Membrane-Bound Carbonic Anhydrase Isozymes IX and XV (Thesis). Institute of Medical Technology. University of Tampere. 2008. Finland. https://tampub .uta.fi/ bitstream/ handle/ 10024/ 67905/978-951-44-7475-0.pdf?sequence=1. 9 Nisan 2015.

33. Smith, KS, Ferry JG. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000; 24: 335–366.

34. Pastoreková S, Závadová Z, Kostál M, Babusíková O, Závada J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology.* 1991; 87(2): 620-6.

35. Türeci O, Sahin U, Vollmar E, Siemer S, Göttert E, Seitz G, Parkkila AK, Shah GN, Grubb JH, Pfreundschuh M, Sly WS. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ;95(13): 7608-13.

36. Hilvo M, Tolvanen M, Clark A, Shen B, Shah GN, Waheed A, Halmi P, Hanninen M, Hamalainen JM, Vihinen M, Sly WS, Parkkila S. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem J.* 2005; 392: 83–92.

37. Davis RA, Innocenti A, Poulsen SA, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Identification of selective inhibitors of the human mitochondrial isozymes VA and VB over the cytosolic isozymes I and II from a natural product-based phenolic library. *Bioorg Med Chem.* 2010; 18(1): 14-8.

38. Özensoy Ö. Kanser İlişkili Karbonik Anhidraz IX ve XII izoenzimlerinin (CA-IX, CAXII) ekspresyonu, saflaştırılması ve bazı bileşiklere karşı inhibisyon etkilerinin araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2006.

39. Stams T, Christianson DW. X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. Chegwidden WR, Carter ND, Edwards YH. The Carbonic Anhydrases: New Horizons. Birkhäuser Verlag, 2000: 159-173.

40. Esbaugh AJ, Tufts BL. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol.* 2006; 154(1-2): 185-98.

41. Domsic JF, McKenna R. Sequestration of carbon dioxide by the hydrophobic pocket of the carbonic anhydrases. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1804(2): 326-31.

42. Silverman DN, McKenna R. Solvent-mediated proton transfer in catalysis by carbonic anhydrase. *Acc Chem Res.* 2007; 40(8): 669-75.

43. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York, W.H.Freeman and Company, 2012:277.

44. Akbaba Y, Bastem E, Topal F, Gülçin I, Maraş A, Göksu S. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory effects of novel sulfamides derived from 1-aminoindanes and anilines. *Arch Pharm (Weinheim).* 2014; 347(12): 950-57.

45. Alterio V, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone G. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms?. *Chem Rev.* 2012; 112(8): 4421-68.

46. Del Prete S, Vullo D, Fisher GM, Andrews KT, Poulsen SA, Capasso C, Supuran CT. Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen Plasmodium falciparum--the η-carbonic anhydrases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24(18): 4389-96.

47. Supuran CT, Capasso C. The η-class carbonic anhydrases as drug targets for antimalarial agents. *Expert Opin Ther Targets*. 2014; 12: 1-13.

48. Gilmour KM. Perspectives on carbonic anhydrase. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2010; 157(3): 193-7.

49. Aspatwar A, Tolvanen ME, Ortutay C, Parkkila S. Carbonic anhydrase related proteins: molecular biology and evolution. *Subcell Biochem.* 2014; 75: 135-56.

50. Pastoreková S, Závada J. Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy. *Cancer Therapy Vol*. 2004; 2: 245-262.

51. Pan PW, Waheed A, Sly WS, Parkkila S. Carbonic anhydrases in the mouse harderian gland. *J Mol Histol.* 2010; 41(6): 411-7.

52. Kuday H, Sonmez F, Bilen C, Yavuz E, Gençer N, Kucukislamoglu M. Synthesis and in vitro inhibition effect of new pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives on erythrocyte carbonic anhydrase I and II. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 594879.

53. Wistrand PJ, Schenholm M, Lonnerholm G.Carbonic-anhydrase isoenzymes CA-I and CA-II in the human-eye, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1986; 27: 419-428.

54. Liu C, Wei Y, Wang J, Pi L, Huang J, Wang P. Carbonic anhydrases III and IV autoantibodies in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, diabetes, hypertensive renal disease, and heart failure. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 354594.

55. Konialis CP, Barlow JH, Butterworth PH. Cloned cDNA for rabbit erythrocyte carbonic anhydrase I: A novel erythrocyte-specific probe to

study development in erythroid tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(3): 663-7.

56. Datta R, Shah GN, Rubbelke TS, Waheed A, Rauchman M, Goodman AG, Katze MG, Sly WS. Progressive renal injury from transgenic expression of human carbonic anhydrase IV folding mutants is enhanced by deficiency of p58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(14): 6448-52.

57. Datta R, Waheed A, Bonapace G, Shah GN, Sly WS. Pathogenesis of retinitis pigmentosa associated with apoptosis-inducing mutations in carbonic anhydrase IV. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(9): 3437-42.

58. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2012; 17(1): 11-5.

59. Patrikainen M, Pan P, Kulesskaya N, Voikar V, Parkkila S. The role of carbonic anhydrase VI in bitter taste perception: evidence from the Car6$^{-/-}$ mouse model. *J Biomed Sci.* 2014; 21: 82.

60. Kivela J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. *Caries Res*. 1999; 33: 178–184.

61. Pilipuitytė V, Matulis D. Intrinsic thermodynamics of trifluoromethanesulfonamide and ethoxzolamide binding to human carbonic anhydrase VII. *J Mol Recognit* 2015; 28(3): 166-72.

62. Aspatwar A, Tolvanen ME, Ortutay C, Parkkila S. Carbonic anhydrase related protein VIII and its role in neurodegeneration and cancer. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(29): 3264-76.

63. Rosatelli E, Carotti A, Ceruso M, Supuran CT, Gioiello A. Flow synthesis and biological activity of aryl sulfonamides as selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24(15): 3422-5.

64. Aspatwar A, Tolvanen ME, Parkkila S. An update on carbonic anhydrase-related proteins VIII, X and XI. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2013; 28(6): 1129-42.

65. Di Fiore A, Monti SM, Hilvo M, Parkkila S, Romano V, Scaloni A, Pedone C, Scozzafava A, Supuran CT, De Simone G. Crystal structure of human carbonic anhydrase XIII and its complex with the inhibitor acetazolamide. *Proteins.* 2009; 74(1): 164-75.

66. Casey JR, Sly WS, Shah GN, Alvarez BV. Bicarbonate homeostasis in excitable tissues: role of AE3 Cl-/HCO3- exchanger and carbonic anhydrase XIV interaction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 297(5): C1091-102.

67. Innocenti A, Hilvo M, Scozzafava A, Parkkila S, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the new membrane-associated isoform XV with phenols. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008; 18(12): 3593-6.

68. Yoshida K. Effects of thyroid hormone on erythrocyte carbonic anhydrase-I and zinc concentrations in vivo and in vitro: clinical usefulness of carbonic anhydrase-I and zinc concentrations in erythrocytes. *Tohoku J Exp Med.* 1996; 178(4): 345-56.

69. Shrivastava G, Hyodo M, Ara MN, Harashima H. The screening of RNA aptamers specific for carbonic anhydrase I using the Systematic Evolution of Ligands by an Exponential Enrichment Method (SELEX). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2014; 33(11): 697-708.

70. Ferraroni M, Tilli S, Briganti F, Chegwidden WR, Supuran CT, Wiebauer KE, Tashian RE, Scozzafava A. Crystal structure of a zinc-activated variant of human carbonic anhydrase I, CA I Michigan 1: evidence for a second zinc binding site involving arginine coordination. *Biochemistry.* 2002; 41(20): 6237-44.

71. Chang X, Zheng Y, Yang Q, Wang L, Pan J, Xia Y, Yan X, Han J. Carbonic anhydrase I (CA1) is involved in the process of bone formation and is susceptible to ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14(4): R176.

72. Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Banno M, Sakuma T, Imada K, Oda Y, Kamita M, Honda K, Yamada T, Naito S, Ono M. Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncol.* 2012; 2012: 768190.

73. Aggarwal M, Kondeti B, McKenna R . Insights towards sulfonamide drug specificity in α-carbonic anhydrases. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21(6): 1526-33.

74. Maupin CM, Voth GA. Preferred Orientations of His-64 in Human Carbonic Anhydrase II. *Biochemistr*y. 2007; 46(11): 2938-47.

75. Sly WS, Hewett-Emmett D, Whyte MP, Yu YS, Tashian RE. Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80(9): 2752-6.

76. Karhukorpi EK. Carbonic anhydrase II in rat acid secreting cells: comparison of osteoclasts with gastric parietal cells and kidney intercalated cells. *Acta Histochem.* 1991; 90(1): 11-20.

77. Parkkila S, Rajaniemi H, Parkkila AK, Kivela J, Waheed A, Pastorekova S, Pastorek J, Sly WS. Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(5): 2220-4.

78. Hynninen P, Parkkila S, Huhtala H, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Tomas E. Carbonic anhydrase isozymes II, IX, and XII in uterine tumors. *APMIS.* 2012; 120(2): 117-29.

79. Yoshiura K, Nakaoka T, Nishishita T, Sato K, Yamamoto A, Shimada S, Saida T, Kawakami Y, Takahashi TA, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Oyaizu N, Yamashita N. Carbonic anhydrase II is a tumor vessel endothelium-associated antigen targeted by dendritic cell therapy. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(22): 8201-7.

80. 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. Carbonic anhydrase II. A novel biomarker for gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol*. 2010; 23(5): 743-50.

81. http://departments.colgate.edu/chemistry/rowlett_research.html. 6 Mart 2015.

82. Liao SY, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development. *BMC Dev Biol.* 2009; 9: 22.

83. Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, Pack S, Geil L, Johnson BE, Stanbridge EJ, Lerman MI. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(21): 12596-601.

84. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Re*s. 2000; 60(24): 7075-83.

85. Doyen J, Parks SK, Marcié S, Pouysségur J, Chiche J. Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis. *Front Oncol.* 2013; 2: 199.

86. Kallio H, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Mannisto S, Heikinheimo M, Parkkila S. Expression of carbonic anhydrases IX and XII during mouse embryonic development.. *BMC Dev Biol.* 2006; 26: 22.

87. Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use. *Semin Cancer Biol.* 2014; pii: S1044-579X(14)00099-6.

88. Li Y, Wang H, Tu C, Shiverick KT, Silverman DN, Frost SC. Role of hypoxia and EGF on expression, activity, localization and phosphorylation of carbonic anhydrase IX in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813(1): 159-67.

89. Supuran CT. Carbonic Anhydrase IX: A New Drug Target for Designing Diagnostic Tools and Antitumor Agents. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*2009; 37 (4): 259-270.

90. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/771. 18 Şubat 2015.

91. Whittington DA, Waheed A, Ulmasov B, Shah GN, Grubb JH, Sly WS, Christianson DW. Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(17): 9545-50.

92. Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15(13): 4336-50.

93. Aggarwal M, McKenna R. Update on carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008 - 2011). *Expert Opin Ther Pat.* 2012; 22(8): 903-15.

94. Brynda J, Mader P, Šícha V, Fábry M, Poncová K, Bakardiev M, Grüner B, Cígler P, Řezáčová P. Carborane-based carbonic anhydrase inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013; 52(51): 13760-3.

95. Sethi KK, Verma SM, Tanç M, Purper G, Calafato G, Carta F, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of the human carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII with benzene sulfonamides

incorporating 4- and 3-nitrophthalimide moieties. *Bioorg Med Chem.* 2014; 22(5): 1586-95.

96. Splendiani G, Condò S. Diuretic therapy in heart failure. *G Ital Nefrol.* 2006; 34: S74-6.

97. Sławiński J, Pogorzelska A, Żołnowska B, Brożewicz K, Vullo D, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of a novel series of 5-substituted 2,4-dichlorobenzenesulfonamides and their inhibition of human cytosolic isozymes I and II and the transmembrane tumor-associated isozymes IX and XII. *Eur J Med Chem.* 2014; 82: 47-55.

98. http://www.ekutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaciodasiyayinlari/antibiyotkler/7.pdf. 23 Şubat 2015.

99. Moeker J, Peat TS, Bornaghi LF, Vullo D, Supuran CT, Poulsen SA. Cyclic secondary sulfonamides: unusually good inhibitors of cancer-related carbonic anhydrase enzymes. *J Med Chem.* 2014; 57(8): 3522-31.

100. Brzozowski Z, Sławiński J, Vullo D, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Regioselective synthesis of novel series 1-substituted 1,4-dihydro-4-oxo-3-pyridinesulfonamides and their inhibition of the human cytosolic isozymes I and II and transmembrane cancer-associated isozymes IX and XII. *Eur J Med Chem*. 2012; 56: 282-91.

101. Ghorab MM, Alsaid MS, Ceruso M, Nissan YM, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, molecular docking, cytotoxic and inhibition of the human carbonic anhydrase isoforms I, II, IX, XII with novel benzenesulfonamides incorporating pyrrole, pyrrolopyrimidine and fused pyrrolopyrimidine moieties. *Bioorg Med Chem.* 2014; 22(14): 3684-95.

102. Jogaitė V, Zubrienė A, Michailovienė V, Gylytė J, Morkūnaitė V, Matulis D. Characterization of human carbonic anhydrase XII stability and inhibitor binding. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21(6): 1431-6.

103. Vullo D, Innocenti A, Nishimori I, Pastorek J, Scozzafava A, Pastoreková S, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the transmembrane isozyme XII with sulfonamides-a new target for the design of antitumor and antiglaucoma drugs? *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15(4): 963-9.

104. Gill RK, Rawal RK, Bariwal J. Recent Advances in the Chemistry and Biology of. *Arch Pharm (Weinheim).* 2015; 348(3): 155-78.

105. http.:// chemistry.about.com / od/ factsstructures/ ig/ Chemical-Structures---B / Benzothiazole. html. 24 Mayıs 2015.

106. Kamal A, Syed MA, Mohammed SM. Therapeutic potential of benzothiazoles: a patent review (2010 - 2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2015; 25(3): 335-49.

107. Noolvi MN, Patel HM, Kaur M. Benzothiazoles: search for anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 2012; 54: 447-62.

108. González-Alvarez M, Alzuet G, Borrás J, Castillo Agudo L, Montejo-Bernardo JM, García-Granda S. Development of novel copper (II) complexes of benzothiazole- N- sulfonamides as protective agents against superoxide anion. Crystal structures of [Cu(N-2-(4-methylbenzothiazole) benzenesulfonamidate) (2) (py) (2)] and [Cu(N-2-(6-nitrobenzothiazole) naphthalenesulfonamidate) (2) (py) (2)]. *J Biol Inorg Chem.* 2003; 8(1-2): 112-20.

109. Lu DW, Chiang CH, Kao KD, Wen LY. The study of ocular hypotensive effect of 6-hydroxyethoxy-2-benzothiazole sulfonamide: a topical carbonic anhydrase inhibitor. *J Ocul Pharmacol.* 1990; 6(4): 271-8.

110. Kalina PH, Shetlar DJ, Lewis RA, Kullerstrand LJ, Brubaker RF. 6-amino-2-benzothiazole-sulfonamide. The effect of a topical carbonic

anhydrase inhibitor on aqueous humor formation in the normal human eye. *Ophthalmology.* 1988; 95(6): 772-7.

111. Ibrahim DA, Lasheen DS, Zaky MY, Ibrahim AW, Vullo D, Ceruso M, Supuran CT, Abou El Ella DA. Design and synthesis of benzothiazole-6-sulfonamides acting as highly potent inhibitors of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII. *Bioorg Med Chem.* 2015; S0968-0896(15)00419-8.

112. Yazıcıoğlu M. Sığır Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması Ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi,2013.

113. http:// www.photophysics.com tutorials/ stopped-flow-spectroscopy. 25 Mart 2015.

114. http://www. photophysics.com / products /sx20- stopped- flow-s pectrometer. 25 Mart 2015.

115. http:// www.chem.agilent.com/ Library / applications / uv5.pdf. 25 Mart 2015.

116. http:// chem wiki. ucdavis. edu / Physical_ Chemistry / Kinetics/ Reaction_ Rates /Expermental_Determination_of_Kinetics /Stopped_Flow. 25 Mart 2015.

117. http://www.hi-techsci.com/techniques/stoppedflow/. 25 Mart 2015.

118. Gomez-Hens A, Perez-Bendito D. The stopped-flow technique in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*. 1991; 242: 147.

119. http://decarboni.se/sites/default/files/publications/173703/development-aqueous-ammonia-based-pcc-technology-australian-conditions-technical-report-3.pdf. 25 Mart 2015.

120. Conroy CW, Maren, TH, The determination of osteopetrotic phenotypes by selective inactivation of red cell carbonic anhydrase isoenzyme, *Clin. Chim. Acta.* 1985; 15: 3347.

121. Puccetti L, Fasolis G, Cecchi A, Winum JY, Gamberi A, Montero JL, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating thioureido-sulfanilyl scaffolds. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15(9): 2359-64.

122. Ozensoy O, Puccetti L, Fasolis G, Arslan O, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the tumor-associated isozymes IX and XII with a library of aromatic and heteroaromatic sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15(21): 4862-6.

123. Svastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zat'ovicová M, Gibadulinová A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastoreková S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett.* 2004; 577(3): 439-45.

124. Garaj V, Puccetti L, Fasolis G, Winum JY, Montero JL, Scozzafava A, Vullo D, Innocenti A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: novel sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine moieties as inhibitors of the cytosolic and tumour-associated carbonic anhydrase isozymes I, II and IX. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15(12): 3102-8.

125. Maren TH. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 1960,130:26-9.

8. EKLER

EK.1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Emine Terzi
Doğum tarihi	: 28.01.1990
Doğum yeri	: Bakırköy
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C.
Adres	: T.C. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bilkent yolu 3. Km. Bilkent/ANKARA
Tel	: 03123241555/4564
E-mail	: emineterzi1990@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesi
Lisans	: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek lisans	: T.C. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: İleri seviye
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
Biochemical Society (2013/--)	