

Van Gölü Balığının (*Calcalburnus tarichi*)da Karbonik-Anhidraz'ın Esteraz Aktivitesi Üzerine Bir Çalışma

Haluk TESTERECİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon-TÜRKİYE

Servet SEKİN

Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Diyarbakır-TÜRKİYE

Suat EKİN

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Van-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 24.09.1997

Özet: Karbonatlı Van gölünün balığının (*Calcalburnus tarichi*) karbonik anhidraz enzimi üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Van gölü balığının solungaç ve karaciğerlerinden karbonik anhidraz enzimi aseton-kloroform ve etanol-kloroform ile iki ayrı ekstraksiyonla kısmi saflaşması sağlanıp, enzimin esteraz aktivitesi p-nitrofenol asetat substrat kullanılarak spektrofotometrede ölçülmüştür. Bazı kinetik parametrelerin (k_m , V_o , V_{max} , Na_2CO_3 aktivasyonu, optimum pH vb) etkileri incelenmiştir.

Karaciğerden elde edilen ekstraktlarda enzimin ($25^\circ C$ de) Lineweaver-Burk diyagramı incelendiğinde etanolün asetona göre kompetitif bir inhibisyona sahip olduğu görülmüştür. Dolayısıyla substratın K_m değeri, etanol ekstraktı için 0.95 mM, aseton ekstraktı için 0.54 mM dir. Solungaç dan elde edilen 2 ayrı ekstraktın ($25^\circ C$ de), etanolün asetona göre kompetitif olmayan bir inhibisyon etkisi gözlenmektedir. Bu nedenle etanol ve aseton ekstraktı için K_m : 0.39 mM'dur.

Na^+/CO_3^{2-} 'ün bu enzimin esteraz aktivitesini stimule ettiği, etanolün inhibisyon etkisinin Na^+/CO_3^{2-} iyonları ile yarışmadığı anlaşılmaktadır. Aslında etanolün solungaçta inhibisyonun kompetitif bir inhibisyon olduğu Na^+/CO_3^{2-} iyonları ilavesiyle anlaşılmıştır. Karbonat iyonları p-nitrofenol asetat ile enzimin farklı katalitik bölgelerini etkileyerek kooperatif bir etki oluşturmuşlardır.

Karbonik anhidraz enziminin aktivitesinin pH 7.4'e kadar etkilenmediği açıkça görülmüştür. pH 8'in üzerinde enzim aktivitesinde önemli bir artış olmuşsa da, bu değişimin substratın p-nitrofenol asetat pH:8-11.5 arasında buffer ile kinetik reaksiyon vermesi nedeniyle bu pH da enzimin esteraz aktivitesi değerlendirilemez olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla substratın etkilenmediği en ideal pH: 7.0 olarak bu enzimin esteraz aktivitesi ölçülebilir kanaatine varılmıştır.

Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesi, Van gölü balığının anhidraz aktivitesi üzerine yapılacak çalışmalarda kullanılabilir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesinin stimülasyonu CO_3^{2-} iyonları ilavesiyle gösterilmiştir. Van Gölü balığının iç sisteminde pH'sının regülasyonunda solungaç ve karaciğerlerinde bulunan karbonik anhidrazın önemli rolü olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Karbonik anhidraz, Van gölü balığı, esteraz aktivitesi

A Study on Esterase Activity of Carbonic Anhydrase from Van Lake Fish (*Calcalburnus tarichi*)

Abstract: No study has been reported on carbonic anhydrase enzyme of the fish (*Calcalburnus tarichi*) living in the carbonated Van Lake. Having partial purification of Carbonic anhydrase from gill and liver of Van Lake fish by ethanol-chloroform and acetone-chloroform, the esterase activity was performed by using p-nitrophenyl acetate as a substrate on spectrophotometer. The effects of the some kinetic parameters (k_m , V_o , V_{max} , Na_2CO_3 activation, optimum pH etc.) have been examined

When Lineweaver-Burk diagram of liver extracts (at $25^\circ C$) is examined, ethanol has an apparent competitive inhibition compare to acetone extracts. So K_m of the substrate (p-nitrophenyl acetate) is 0.95 mM is for ethanol extract and 0.54 mM of that is found for acetone extracts. In two extracts from gill (at $25^\circ C$), ethanol seems to have a non-competitive inhibition comparing to acetone, K_m for both extracts is 0.39 mM.

Na^+/CO_3^{2-} ions induce esterase activity, Na^+/CO_3^{2-} ions are not competitive with the inhibitory effects of ethanol. In fact, inhibition of ethanol on gill esterase activity appears to be competitive which is understood by addition of Na^+/CO_3^{2-} .

Since carbonate ions and p-nitrophenyl acetate act on two different catalytic site of this enzyme, both have formed a cooperative effect

It is clear that carbonic anhydrase activity has not been affected till pH:7.4. Although pH above 8.0 enzyme activity has seem to increase, this increase is due to kinetic reaction between substrate (p-nitrophenyl acetate) and buffer at pH:8-11.5. So, the esterase

activity of this enzyme at this high pH, can not be evaluated. for the esterase activity of this enzyme. The optimal and unaffected pH for the substrate is 7 for the esterase activity of carbonic anhydrase.

"Esterase" activity could be useful for determining "anhydrase" activity of Carbonic anhydrase enzyme of Van Lake fish.

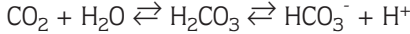
Stimulation of esterase activity of carbonic anhydrase has been shown by addition of CO_3^{2-} ions. Carbonic anhydrase present in gill and liver of Van Lake fish has a significant regulatory role for internal pH balance.

Key Words: Carbonic anhydrase, Van Lake fish, esterase activity

Giriş

Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1.) (Karbonat hidrolizaz veya karbonat dehidratiz) Zn^{+2} iyonu ihtiva eden metaloenzimdir. Memeli eritrositlerinde karbonik anhidraz, hücrelerde CO_2 'in hidrasyonu veya HCO_3^- 'in dehidrasyonu reaksiyonlarını katalizler. Karbonik Anhidraz böbrek, gastrik mukoza ve göz merceği, tükrük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometriyum dokularında da aktiviteye sahiptir. Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun teşekkülünde, alglerde ve bitkilerin fotosentetik kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Karbonik anhidraz enzimi, sitoplazmada çözülmüş, bazen de hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak bulunur (1-4).

Karbonik anhidraz, aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



Karbonik anhidraz enzimi balık solungaçlarında hidromineralinin ve asit-baz dengesinin salanmasında önemli rol alır. Deniz balıklarında vücut sıvıları deniz suyuna göre hipotonik olup, solungaçları ile Na^+ ve Cl^- salgırlar (5). NaCl atımı tatlı su balığındakine benzer şekilde Na^+ - K^+ ATP az enzimi ile salanır (6). Deniz balıkları ise solungaçlarıyla Na^+ atılımına karşın H^+ (NH_4^+) iyon alır, keza Cl^- atımına karşın HCO_3^- alınır. Bu değişimin tek amacının asit-baz dengesini korumak olduğu sanılmaktadır (7). Balık solungaçlarında karbonik anhidraz NaCl regülasyonunda rol alır (8). Tatlı su balıklarında karbonik anhidraz proton ve bikarbonat iyonları üretip salgılar, bu salgılama sırasında Na^+ ve Cl^- iyonlarının tatlı sudan alınmasını sağladığına dair deliller bulunmaktadır (9). Sülfonamidlerden başka asetazolamid ve benzolamid'inde deniz canlılarının karbonik anhidraz aktivitesine inhibisyon etkisi göstermektedirler (10, 11). Sığır karbonik anhidrazı ile yapılan esteraz aktivitesi deneylerinde artan etkinliğe göre inhibe edici anyonlar: F^- , Cl^- , CH_3COO^- , Br^- , NO_3^- , HSO_3^- , HCO_3^- , ClO_4^- , I^- , N_3^- , SCN^- , CNO^- , HS^- , CN^- şeklindedir (12-15).

Karbonik anhidrazın afinite jell kromatografisi (4, 16,

17), etanol-kloroform ekstraktı (17), amonyum sülfat (18), Sephadex-G-25 ile kurutma (19) gibi metotlarla ekstraksiyonu, ve saflaştırılması gerçekleştirilmektedir.

Karbonik anhidrazın saflaştırılması basamaklarında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson yöntemiyle yapılmaktadır. Bu yöntemde, CO_2 hidrasyonunda pH'nın 8.2 den 6.3'e düşüşü için geçen süre, brom timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmaktadır (20,21).

Karbonik anhidraz'ın ayrıca aldehitlerin dehidrasyonu ve esterlerin hidrolizini katalize ettiği bilinmektedir (1, 2, 3, 4). Vücut sıvılarında, karbonik anhidraz aktivitesi ölçümleri esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı p-nitrofenol (veya p-nitrofenolat)'e hidroliz etmekte ve bu da 348 nm de absorpsiyon vermektedir. 348 nm de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat'ın her ikisi de ayrı absorpsansı göstermektedir (17,22). Bu dalga boyunda p-nitrofenol asetat'ın da çok az bir absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır.

Van gölü balığı (*calcalburnus tarichi*), üzerine yapılan araştırmalar oldukça sınırlıdır (23, 24). Van gölü balığı tuzlu ve pH'sı 9.8'un üzerinde bir ortamda yaşamaktadır. Van Gölü balığının vücut pH'sını dengede tutmaya yarayan enzimleri, özellikle karbonik anhidraz enzimi üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu enzimin değişik türlerdeki değişik katalitik etkileri incelenmekle (2, 5, 7, 9, 10,12, 13) beraber bu özellikler Van Gölü balığında bu güne kadar irdelenmemiştir. Bu enzimin katalitik ve metabolik özelliklerinin detaylı incelenebilmesi için uygun bir ekstraksiyon metodu ile incelenecek katalitik bölgenin bu amaca hizmet edip etmeyeceğinin seçilen metoda uyumluluğunun ortaya konması ilk temel şarttır. Bu amaçla, organik çözücüler ile daha çabuk ve kabul edilebilir verimde esteraz aktivitesine haiz ekstraktlar elde edildiği bildirilmiştir (17). Bunlar arasından en az inhibe edici etkisi olan aseton ile ekstraksiyonu literatürdeki etanol (17) ekstraktına karşı bu çalışma ile incelenmiştir. Yukarıdaki önemli fonksiyonlara sahip bu enzim üzerinde ileride yapı

labilecek metabolik (Na^+ , Cl^- etkisi, $\text{üre}/\text{NH}^+$ metabolizması diğer vb) çalışmalar için laboratuvar şartlarımızda esteraz aktivitesi ölçümü kolay olmaktadır. Daha önce Van Gölü balığında balığında araştırılmamış olan, göl suyu pH sınırı bu balığın nasıl regüle ettiğini ortaya koyacak bir dizi çalışmaya ışık tutmak amacıyla bu enzimin çeşitli katalitik etkilerinden birisi olan esteraz aktivitesinin incelenmesi gerekmektedir. Van balığının göl suyundaki karbonat iyonlarını ve suyun yüksek pH sınırı nasıl elimine ettiği hiç ele alınmamıştır. Bu amaçla pH'nın ve karbonat iyonlarının bu enzimi nasıl etkilediği bu çalışmanın bir amacıdır. Van Gölü balığının karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesinin, ilerde bu enzimin hidrasyon/ dehidrasyon etkisini değerlendirmede kullanılıp kullanılmayacağı, bu amaçla ekstraksiyon yöntemi, pH, substrat, bazı iyonların vb. parametrelerinin ilerki çalışmalara uygunluğu diğer bir amacıdır.

Materyal ve Metot

9 mM p-nitrofenil asetat (substrat) stok çözeltisi : Günlük olarak hazırlandı. 163.2 mg p-nitrofenil asetat , 4 ml aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 100 ml. bidistile suya yavaş yavaş ilave edildi.

50 mM Tris- SO_4 Tampon Çözeltisi (pH = 7.4) : 6.055gr (0.05 mol) Tris- SO_4 , 950 ml redistile suda çözüldü. 1N H_2SO_4 ile pH = 7.4 e kadar titre edildi. Toplam hacim bidistile su ile 1 litreye tamamlandı.

Cihazlar: Esteraz aktivitesinin ölçümü için, p-nitrofenolasetat'tan p-nitrofenolat'ın oluşumu 348 nm de ölçüldü. Bu amaçla p-nitrofenolat'ın verdiği absorbans Perkin Elmer Lambda LA UV/VIZ Spektrofotometre ve ona bağlı Shimadzu Chromatopac integratöründe kaydedildi ve hız ürün/saniye olarak belirlendi. Tampon çözeltisinin pH ayarlaması Orion pHmetre de yapıldı. Ekstraksiyon başlangıcında Nüve Vortex kullanıldı. İki çözücü fazın ekstraksiyonunda ve homojenize edilmesinde Gerhardt Mekanik karıştırıcı kullanıldı. Süpernatantın ayrılmasında (+4 °C de) Minifuge RF Heraeus Sepatech marka soğutmalı santrifüj ile gerçekleştirildi. Protein tayini Technicon-RAXT Autoanalizör de tayin edildi. Enzim reaksiyonları enzim ekstraktlarının eklenmesiyle başlatıldı. Kinetik ölçümlerde sıcaklık, ısı kontrollü UV kuvvetlerin su banyosuna (Preciterm PFV, Mannheim Boehringer) bağlı pompa (pumpe 4010, Mannheim Boehringer) aracılığı ile 25°C de sabit tutuldu. Analiz anına kadar +4°C de saklanan tampon çözeltiler ve ekstraktlar, kullanmadan 10 dakika

önce aynı su banyosunda 25°C'ye getirildikten sonra kullanıldı.

Ekstraksiyon : Materyal olarak taze olarak getirilen 30 Adet Vangölü balığı (*Calcalburnus tarichi*) kullanıldı. İlk olarak 30 adet balığın karaciğer ve sağ-sol solungaçları birleştirilerek homojenize edilen karaciğerden ve solungaçlardan 11'er gr tartıldı. Van gölü balığı karaciğer ve solungaçları ağırlıkları kadar 11 ml Tris- SO_4 tamponu (pH=7.4) ile ekstrakte edildi. Ekstrakt işleminde cam baget ile 20 dk. süre ile ezilen doku daha sonra Vortex işlemine tabi tutuldu sonra 30 dk 4500 rpm de santrifüj edilerek, enzim içeren üst kısım toplandı.

Enzim içeren sıvı ön saflaştırmaya tabi tutuldu. Bunun için soğuk etanol-kloroform (17) ve asetonun (25) diğer çözücülere göre daha az esteraz aktivitesini inhibe eden çözücü olduğundan dolayı aseton-kloroform karışımı kullanıldı. Bu suretle, hemolizattaki hemoglobinin büyük kısmı denatüre edilerek uzaklaştırılmış oldu. Bu işlemin yapılmasının avantajı, enzimin geri kalan hemoglobinden temizlenmesinin çok daha kolay ve az vakit almasıdır. Ayrıca hücre zarlarının uzaklaştırılmasına ihtiyaç kalmamaktadır (17).

Karaciğer ekstraktından elde edilen, enzim içeren sıvı iki kısma ayrıldı. Birinci kısım, 1.5 ml soğuk etanol damlatılarak eklendi daha sonra da 1 ml soğuk kloroform eklenerek mekanik karıştırıcı ile 30 dk homojenize edilmesi sağlandı. 15 dk bekletildikten sonra 30 dk 5000 rpm de santrifüj edildi ve enzim içeren süpernatant ayrıldı. İkinci kısım aseton-kloroform karışımına tabi tutuldu. 1.5 ml soğuk aseton damla damla eklendi daha sonra da 1 ml soğuk kloroform eklenerek mekanik karıştırıcı ile 30 dk homojenize edilmesi sağlandı. 15 dk bekletildikten sonra 30 dk 5000 rpm de santrifüj edildi ve enzim içeren süpernatant ayrıldı.

Solungaç dokusundan aseton ve etanol ekstraktlarında karaciğerdekine benzer şekilde hazırlandı.

Van gölü balığı karaciğer ve solungaçlarından aseton-kloroform ve etanol-kloroform karışımı ile elde edilen süpernatantlar; 1 ml süpernatant +4ml tampon çözelti (TRİS- SO_4 , pH:7.4) şeklinde seyreltildi ve bu sulandırma tüm analizlerde kullanıldı.

Total protein tayini: Biüret metoduna(26) göre yukarıdaki ekstraksiyon ve saflaştırmada elde edilen süpernatant da (1ml Süpernatant + 4ml tampon çözelti) protein tayin edildi.

Analiz 1:

9 mM lık stok p-nitrofenilasetat substrat çözeltisinden 0.225 mM'a kadar değişen konsantrasyonlarda substrat çözeltileri hazırlandı. 2000 µl p-nitrofenilasetat çözeltisinden alınarak üzerine 60 µl etanol-kloroform enzim ekstraktı veya aseton-kloroform enzim ekstraktı eklenerek ürün dönüşüm hızı 348 nm de verdiği absorbans/dakika (27) cinsinden tayin edildi.

Analiz 2:

Değişen Na₂CO₃ konsantrasyonlarının karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesine etkisi ölçülmek istendi. Bu amaçla 3mM'lık p-nitrofenil asetat çözeltisi substrat olarak kullanıldı. Na₂CO₃'ün Karbonik-anhidraz enzimi üzerine etkisini test etmek için 1M'lık stok Na₂CO₃ çözeltisi hazırlandı. Bu Na₂CO₃'dan değişik konsantrasyonlarda (2,5, 6.25, 12.5, 25, 37,5, 50, 62,5, 125, 250 ve 625 mM) seyreltmeler yapıldı. 2ml substrat üzerine 60 µl Na₂CO₃'ün değişen konsantrasyonlarından eklenip, enzim (60 µl) içeren solungaçtan elde edilen ekstrakt (aseton-kloroform ve etanol-kloroform konarak reaksiyon başlatılıp ürün oluşumu 348 nm de okundu.

Analiz 3:

Karbonik anhidraz enzimi içeren süpernatant olmadan Na₂CO₃'ün p-nitrofenil asetat. (3mM) üzerine etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

Karbonik-anhidraz enzim ekstraktı olmadan, 2 ml 3mM p-nitrofenil asetat üzerine 6.25,50,250,625 mM Na₂CO₃'ten 60 µl'şer ilave edilerek spektrofotometrede zamana karşı p-nitrofenolat oluşumu ölçüldüğünde, ürün oluşum hızı Vo (ürün/dk) (27) değerlendirildi.

Analiz 4:

pH'nın Karbonik-anhidraz enzimi üzerine etkisini test etmek amacıyla pH sı 3-13,6 ya kadar Tris-SO₄ tampon çözeltileri hazırlandı. Bunun için 6 mM'lık substrat çözeltisi ve 11,6 mg/ml protein enzim içeren 60 µl karaciğer süpernatantı ve 4 mg/ml protein enzim içeren 60 µl solungaç süpernatantı kullanıldı. 1 ml değişik pH'lardaki tampon çözelti üzerine 1 ml substrat ve 60 µl enzim ekstraktı ihtiva eden karaciğer ve solungaç ekstraktları eklenerek reaksiyon başlatıldı. Oluşan ürün 348 nm de kaydedildi

Analiz 5:

Karbonik anhidraz enzim ekstraktı kullanılmadan, değişik pH'lı buffer'lerin 6 mM'lık p-nitrofenil asetatın üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla pH'sı 3-13,6 ya kadar olan 12 adet Tris-SO₄ tampon çözeltileri yapıldı. 1 ml

tampon çözeltisi üzerine 1 ml 6 mM p-nitrofenil asetat konup, spektrofotometrede sıfırlandı ve 5 dk süreyle ürün oluşum hızları ölçüldü.

Bulgular

Van gölü balığı (*Calcalburnus tarichi*) nin karaciğer ve solungaçlarından elde edilen aseton-kloroform ve etanol-kloroform ekstraktlarının ilk hız (Vo) üzerine etkisi, artan p-nitrofenilasetat konsantrasyonu ile esteraz aktivitesi Şekil 1 ve 2 de gösterilmiştir. Şekil 1'de karbonik anhidraz enziminin Km değeri karaciğerin etanol ile ekstraksiyonunda 0.95mM aseton ekstraksiyonu için ise 0.54mM'dır, Şekil 2 de ise enzimin Km değeri hem etanol hemde aseton ekstraktı kullanıldığında 0.39 mM dır.

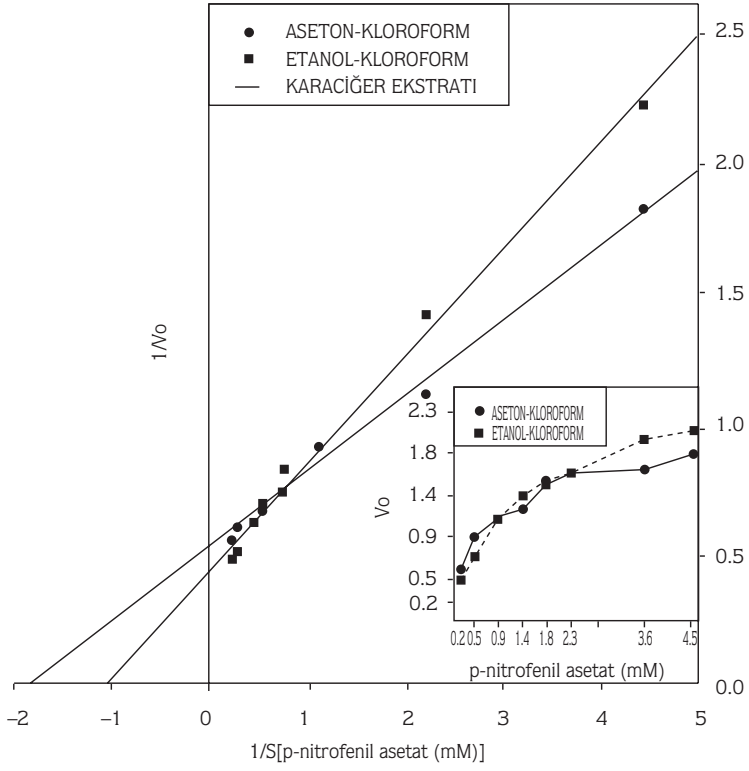
1/4 oranında sulandırılan ekstraktların Biuret metoduyla (26) total proteinleri ölçüldü. Etanol-kloroform ekstraktında total protein karaciğerde 11.6 mg./ml., solungaçta 4 mg./ml., aseton-kloroform ekstraktında total protein karaciğerde 10 mg./ml., solungaçta 4 mg./ml. olarak bulunmuştur.

Van gölü balığı (*Calcalburnus tarichi*) solungaçlarından elde edilen aseton-kloroform ve etanol-kloroform ekstraktlarının sabit tutulmasıyla, Na₂CO₃'ün artan konsantrasyonlarına bağlı olarak ilk hız (Vo) üzerine etkisi, artan p-nitrofenilasetat konsantrasyonu ile esteraz aktivitesi Şekil 3'de gösterilmiştir.

pH'nın Karbonik-anhidraz enzimi üzerine etkisi artan değerleri için pH'sı 3-13,6 ya kadar değişen Tris-SO₄ tampon çözeltilerine karşılık oluşan karaciğer ve solungaç ekstraktlarındaki ilk hız (Vo) değerleri Şekil 4'te gösterilmiştir. Buna göre artan pH ya göre enzimin esteraz aktivitesi doğrusal olarak artar görülmektedir. Enzimin karaciğer ekstraktındaki aktivitesi solungaç ekstraktından fazla olduğu açıktır.

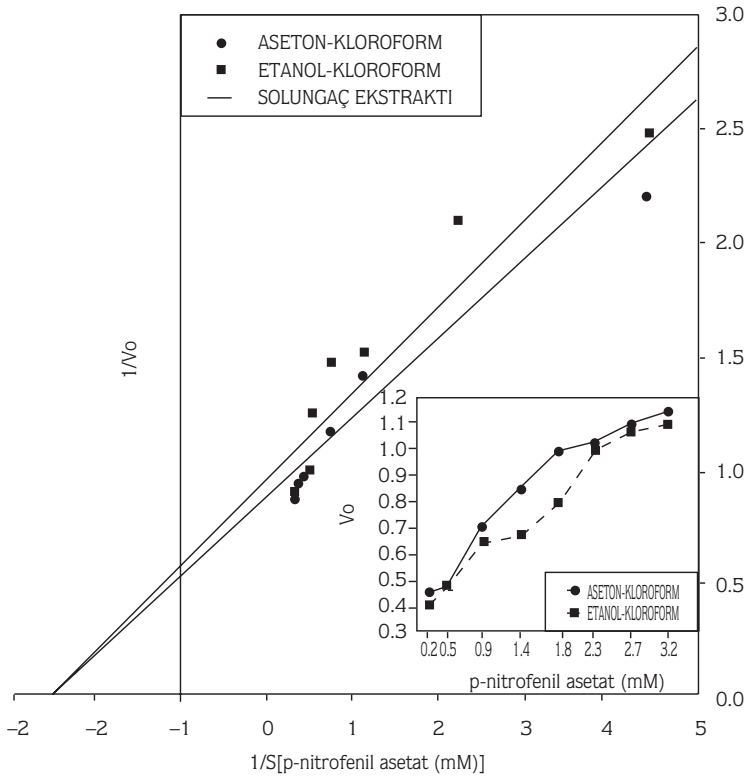
Karbonik-anhidraz enzim ekstraktı olmadan, 2ml 3mM p-nitrofenil asetat üzerine 6.25,50,250,625 mM Na₂CO₃'ten 60 µl'şer ilave edilerek spektrofotometrede zamana karşı p-nitrofenolat oluşumu ölçüldüğünde enzim aktivitesinde belirgin olarak lineer bir yükselme gözlenmedi.

pH'nın Karbonik-anhidraz enzimi üzerine etkisini test etmek amacıyla pH sı 3-13,6 ya kadar Tris-SO₄ tampon çözeltileri, 6 mM'lık substrat çözeltisi, karaciğer ve solungaç süpernatantları kullanılarak yapılan analizde renk değişimi pH = 7.4 üzerinde görüldü. Hazırlanan tampon çözeltilerde aynı hacimde çift distile su eklen-



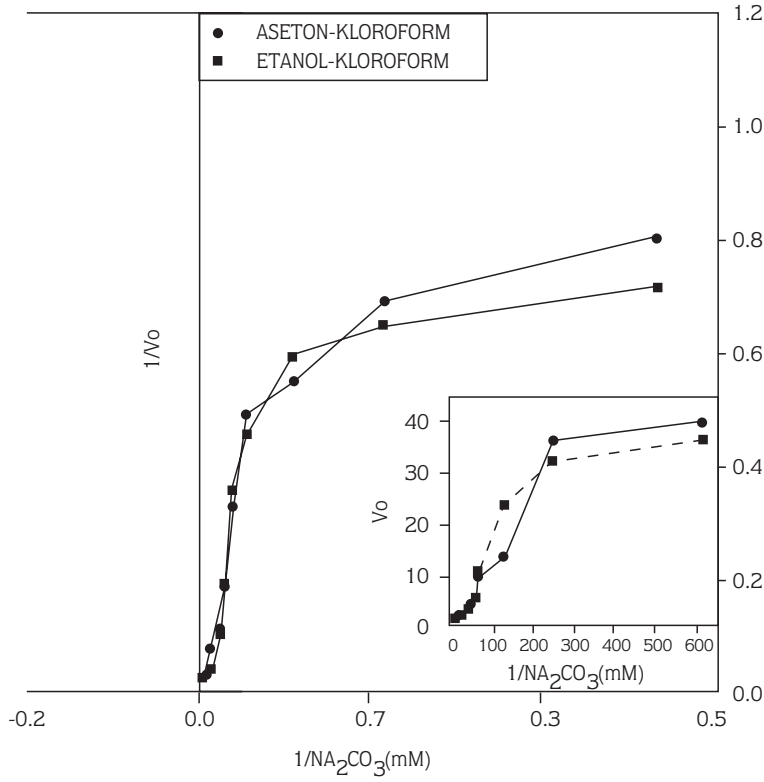
Şekil 1.

Vangölü balığı *C. tarichi*'nin karaciğerinden elde edilen etanol-kloroform, aseton-kloroform ekstraktlarının, artan substrat (p-nitrofenil asetat, mM) konsantrasyonlarına göre (V_o) ilk hızları değişimi.



Şekil 2.

Vangölü balığı *C. tarichi*'nin solungacından elde edilen etanol kloroform,aseton-kloroform ekstraktlarının, artan substrat (p-nitrofenil asetat, mM) konsantrasyonlarına göre (V_o) ilk hızları değişimi.



Şekil 3. Na₂CO₃'ün artan konsantrasyonlarına bağlı olarak Van gölü balığı *C. tarichi*'nin solungaçlarındaki karbonik anhidraz enziminin aseton-kloroform ve etanol-kloroform ekstraktlarına göre ilk hız (V_o)'larındaki değişim. Enzim konsantrasyonları ve substrat (3mM) sabit tutuldu.

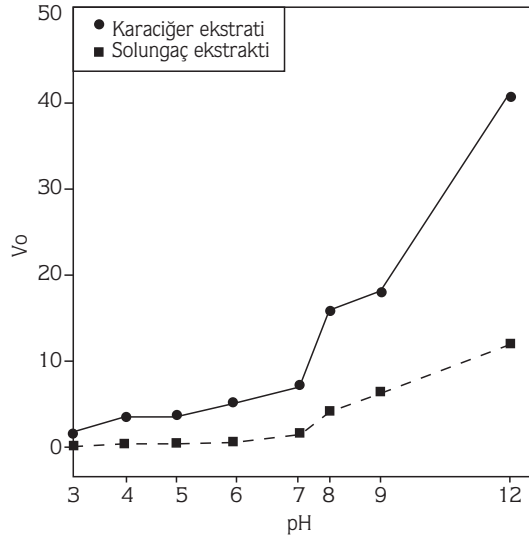
diğinde pH'sının değişmediği gözlemlendi.

Karbonik anhidraz ekstraktı kullanılmadan pH'sı 3-13.6 olan Tris-SO₄ buffer'lerin 6 mM'lık p-nitrofenil ase-

tatin üzerine etkisi araştırıldı. Sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tartışma

Van Gölü balığı tuzluluk oranı %0.9 olan ve pH sı 9.8'in üzerindeki sularda yaşayan tek balıktır. Bu balığın yavru dönemini tatlı sularda ve ergenliğini tuzlu ve yüksek pH'lı Van Gölü suyunda geçirdiği bildirilmiştir (28). Bu balığın vücut pH sın ve tuz dengesini nasıl koruduğu bu güne kadar araştırılmamıştır. Tatlı su balıkları solungaçlarıyla diffüzyonla iyon (H⁺ veya NH₄⁺ ve HCO₃⁻) salgılamak, Na⁺ ve Cl⁻ emilmektedir. Halbuki tuzlu su balıklarında bu durum tersinedir. Tuzlu su balığı NaCl atarken H⁺ ve HCO₃⁻ aldığı bildirilmiştir (5,6,7). Tuzlu su balıklarında iyon regülasyonu daha önem taşımaktadır, çünkü bu balıklar içmek için de tuzlu suyu kullanmaktadırlar bu nedenle fazladan NaCl alımı söz konusudur ve bu fazla tuzun atılması mekanizması oldukça kuvvetli olmalıdır (6, 29). Keza tatlı su balıklarının NaCl dengesini sağlayan Na⁺-K⁺ ATP az enziminin spesifik aktivitesi tuzlu su balığında 4-10 kez daha fazladır (29). Bu yaklaşımla, karbonik anhidraz aktivitesinin Van gölü balığında yüksek olması beklenebilir.



Şekil 4. pH'sı 3-13.6 ya kadar Tris-SO₄ tampon çözeltilerinin karaciğer ve solungaç enzim ekstraktı üzerine etkisi ile oluşan ilk hız (V_o) değişimi.

Tablo 1. Enzim ekstraktı kullanılmadan değişik pH'lardaki Tris-SO₄ tampon çözeltilerinin substrat (p-nitrofenol asetat) ile kinetik etkileşimlerini gösteren Vo değerleri.

PH (Tris-SO ₄)	Vo
3	-
4	-
5	-
6.1	-
7.0	-
7.4	0.05
8	0.3
9	1.6
11.5	7.85
12.2	-
13.3	-
13.6	-

Karbonik anhidraz enziminin keza atlantik kıyılarında bulunan kurbağa başlı balık karaciğerinde üre sentezi için bikarbonat tedarik ettiği bildirilmiştir (30).

Yukarıdaki önemli fonksiyonlara sahip bu enzim üzerinde ilerde yapılabilecek metabolik çalışmalar için laboratuvar şartlarımızda ancak esteraz aktivitesi ölçümü mümkün olmuştur. Bu karbonik anhidrazın esteraz aktivitesinin, ilerde bu enzimin hidrasyon/dehidrasyon etkisini değerlendirmede kullanılıp kullanılmayacağı, bu amaçla pH vb parametrelerin de bu çalışmaya uygunluğu araştırıldı.

Şekil 1'de karaciğerden elde edilen 2 ekstrakt enziminin esteraz aktivitesi üzerine etkisi görülmektedir. Ekstraksiyon sırasında etanol ve aseton elimine edilmediğinden Lineweaver-Burk diyagramı incelendiğinde etanolün asetona göre kompetitif bir inhibisyona sahip olduğu görülmektedir. Dolayısıyla etanol ekstraktı için Km : 0.95 mM , aseton ekstraktı için Km :0.54 mM dir. Bundan da anlaşılacağı üzere aseton ekstraktı ile elde edilen enzim üzerine asetonun inhibe edici etkisi yoktur, bu nedenle Vmax/2 ye ulaşmak için etanol ekstraktında %50 fazla substrat gerekmektedir. Buradan da etanolün p-nitrofenol ile mol bazında yarıştığı açıktır.

Şekil 2 incelendiğinde ise, solungaçtan elde edilen 2 ayrı ekstraktan, etanolün aseton ekstraktına göre kompetitif olmayan bir inhibisyon etkisi gözlenmektedir. Dolayısıyla Etanol ekstraktı ve aseton ekstraktı için Km : 0.39 mM'dur. Buradaki tablo ilginçtir. Enzim, ekstraksiyon ürünü aseton ve etanolden etkilenmemiş görünmektedir. Buda, solungaçların histolojik ve fonksiyonel yapısında bulunan, ekstraktaki diğer enzimlerin (alkol dehidrojenaz vb) etanolü bertaraf etmesi şeklinde yorumlanabilir.

Şekil 1 ve 2 karşılaştırıldığında, bir başka yaklaşımla, solungaç ekstraktında protein miktarı 4 mg/ml, karaciğer ekstraktında protein miktarı 11.6 mg/ml ile yaklaşık 2 kat daha fazla protein bulunmaktadır. Bu nedenle, aynı hacimde kullanılan karaciğer ekstraktında fazla protein bulunması bu ekstraktaki anhidraz enziminin fazlaca olabilmesi nedeniyle etanol ve aseton substrat p-nitrofenil asetat ile kompetitif bir inhibisyona girebildiği düşünülebilir. Solungaçlardan elde edilen ekstrakta ise protein(karbonik anhidraz enzimi) miktarının düşük olması ile açıkça etanolün asetona göre, karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesini inhibe ettiği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle bu enzimin ekstraksiyonlarında literatürdeki etanol yerine asetonlu bir ekstraksiyon daha iyi olacaktır. Keza bu anlamda, Şekil 4 incelendiğinde, karaciğer ekstraktları değişik pH'larda hep solungaç ekstraktından daha fazla aktivite göstermekte olduğu görülmektedir

Karbonik anhidrazın CO₂ ve HCO₃⁻ substratı için Km değerleri sırası ile 8.3 ve 32 mM olduğu bildirilmiştir (1). İnsan eritrositinde p-nitrofenol asetat için enzimin B tipi için Km değeri 5.2 mM olduğu, C tipi içinse bu Km değerinin 0.22mM olduğu kaydedilmiştir (15). Van gölü balığında enzimin p-nitrofenol asetat için Km değeri solungaçlarda Km:0.39 mM olduğu karaciğer içinse etanol bazlı ekstraksiyon için Km: 0.95mM ve aseton bazlı ekstraksiyonda Km: 0.54 mM bulunmuştur. Bu bulgular diğer canlılarda bulunanlardan pek farklı olmamakla beraber insan eritrositindeki bu enzimin B tipinden daha az bir Km sahip olmasıyla, balıkta karbonik anhidrazın daha fazla bir esteraz fonksiyonu, ve esteraz reaksiyonlarına daha duyarlı olduğu anlaşılmaktadır. Van gölü balığının karaciğer ve solungaç karbonik anhidraz enzimleri karşılaştırıldığında solungaçlardaki enzimin Km değeri daha düşük olması bu enzimin esteraz aktivitesinin solungaçlarda daha aktif rol aldığı ortaya koymaktadır. Karaciğerdeki enzimin Km değerinin solungaçlardakinden farklı olmasının nedeni bu enzimin izoenzimleri ve bunların dağılımındaki farklılıkla izah edilebilir. İnsanlarda karbo-

nik anhidrazın CA I (B) ve CA II (C) izoenzimi varken ru-minantlarda sadece CA II tipi bulunmaktadır. Bunların yanı sıra 5 adet izoenziminin organlarda farklı dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (31). Van Gölü balığının karbonik anhidraz izoenzimleri ve bunların dağılımı incelenmemiştir.

Karbonik anhidraz'ın substratı Na_2CO_3 'ün Van Gölüdeki konsantrasyonu 51.4 mM'dır. Sığır eritrositinde HCO_3^- için Km değeri 9.6 mM'dır (15). Bu durumda Van Gölü suyunun karbonik anhidraz enzimi için Km değerinin çok üzerinde CO_3^{2-} iyonları ihtiva etmektedir. Şekil 3 incelendiğinde Na^+ ve CO_3^{2-} iyonlarının bu enzimin esteraz aktivitesini stimule ettiği, etanolün inhibisyon etkisinin CO_3^{2-} iyonları ile yarışmadığı açıkça anlaşılacaktır. Aslında etanolün solungaçta gerçekte inhibisyonun kompetitif bir inhibisyon olduğu CO_3^{2-} iyonları ilavesiyle anlaşılmıştır. Şekil 3'ün Lineweaver-Burk diyagramı bu deney sonuçlarına uygulandığında, veriler hiperbolik bir dağılım göstermiştir. Bu hiperbolik eğim daha çok iki enzimin olayda söz konusu olduğunu gösterdiği işaret edilmiştir (27). Segel (1975) böyle hiperbolik Lineweaver-Burk diyagramlarını Şekil 3'dekine benzer şekilde çizerek yorumlamıştır. Burada iki enzimden ziyade, bu enzimin hem esteraz hem de anhidraz etkilerinin kooperatif etkilerinden dolayı bu diyagramın hiperbolik bir şekil aldığı sonucu çıkartılabilir.

Balık solungacında karbonik anhidrazın NaCl regülasyonunda rol aldığı bildirilmiştir (6, 8). Fakat köpek balıklarının solungaçlarının NaCl salgılamamasına rağmen solungaçların Na^+ - H^+ (veya NH_4^+) ve Cl^- HCO_3^- değişiminde rol alarak asit baz dengesine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (7, 32). Bu çalışmada Na_2CO_3 kullanıldığından Na^+ ve CO_3^{2-} iyonlarının karbonik anhidraz enzimi üzerine etkisinin birlikte olduğu açıktır. Bu nedenle sadece Na^+ iyonun karbonik anhidraz üzerine etkisi NaCl kullanılarak araştırılması gerekecektir. Şekil 3'deki etki gerçekte Na^+ ve CO_3^{2-} iyonlarının birlikte etkisindedir.

Şekil 4 incelendiğinde karbonik anhidraz enziminin aktivitesinin pH 7.4 e kadar etkilenmediği açıkça görülmektedir. pH 8'in üzerinde enzim aktivitesinde önemli bir artış olmuşsa da, bu değişimin Tablo 1 incelendiğinde bu aktivitenin bir kısmının substratın pH: 8-11.5 arasında buffer ile kinetik reaksiyon vermesi nedeniyle bu pH da enzimin esteraz aktivitesi değerlendirilemez olduğu bu-

lunmuştur. Dolayısıyla substratın etkilenmediği en ideal pH: 7.0 olarak bu enzimin esteraz aktivitesi ölçülebilir kanaatine varılmıştır. Ayrıca karaciğer ekstraktının aktivitesi solungaç ekstraktından fazla olduğu açıkça görülmektedir.

Substratın pH bağımlı olması nedeniyle pH>8 üzerinde değişikliklerine bağlı anhidraz çalışmaları için bu metod uygun olmayacaktır. Fakat karbonik anhidrazın diğer metabolik fonksiyonlarını (30, 31, 33) incelemek için uygun olacaktır. Karbonik anhidraz balık karaciğerinde üre sentezine bikarbonat vermektedir. pH dengesi için önemli olmayan bu metabolik yolda $\text{Km}_{\text{HCO}_3^-} = 1.3\text{mM}$ olarak bildirilmiştir (30). Bu tür çalışmalarda esteraz aktivitesi rahatlıkla kullanılabilir. Keza, Lacy (1983) yaptığı histopatolojik çalışmalarda karbonik anhidrazın NaCl regülasyonunda rolü olacağını belirtmiştir. İlerisi çalışmalarımız bu yönde olduğundan, esteraz aktivitesiyle, bu enzimin NaCl regülasyon rolü rahatlıkla incelenebilir kanaati oluşmuştur.

Sonuç olarak gelişiminin farklı dönemlerinde tatlı ve tuzlu-karbonatlı suda yaşayan tek balık türü olan Van gölü balığının solungaç ve karaciğerinde bu pH değişimini adapte edecek karbonik anhidraz aktivitesinin yine bu enzimin estereaz özelliği ile araştırma yapabilmek mümkündür. Buna göre bu enzimin estereaz aktivitesinin karaciğerden fazla olduğu düşük Km değeriyle ortaya konmuştur. Ekstraksiyon metotları karşılaştırılmış, buna göre aseton-kloroform ekstraksiyonu etanol-kloroform ekstraktına göre daha az inhibe edici bulunmuştur. Na_2CO_3 'ün ilavesi ile elde edilen lineweaver-Burk diyagramından çıkarılan hiperbolik eğri bu enzimin en az iki katalitik etkisinin olduğunu, Na^+ / CO_3^{2-} iyonlarının ortak etkisiyle enzimin esteraz etkisi artmaktadır. Esteraz aktivitesi ve P-nitrofenol substratı için ideal pH çalışması 7.0 olarak bulunmuştur. Bu enzimin esteraz aktivitesine bakarak, diğer katalitik özelliklerini izlemek mümkün olabilir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesinin stimülasyonu CO_3^{2-} iyonları ilavesiyle bu çalışmada gösterilmiştir. Esteraz aktivitesine bakarak, Van gölü balığında solungaç ve karaciğerlerinde göl suyunda bulunan Na^+ ve CO_3^{2-} iyonlarının eliminasyonunda karbonik anhidraz enziminin rolü olduğu ortaya çıkmıştır. Van Gölü balığının iç sistem pH sının regülasyonunda solungaç ve karaciğerlerinde bulunan karbonik anhidrazın önemli rolü olduğu anlaşılmıştır.

Kaynaklar

1. Fersht, A.: Enzyme Structure and Mechanism, W. H. Freeman and Company 1985; 436-439
2. Pocker, Y. and Sarkanen, S.: Carbonic Anhydrase: Structure, Catalytic Versatility and Inhibition. *Advances in Enzymology*.. 1979; 49: 149-273.
3. Carter, M.J.: Carbonic Anhydrase: Isoenzymes, Properties, Distribution, and Functional Significance. *Biol. Rev.* 1972; 42: 465-513.
4. Maren, T.H.: Carbonic Anhydrase: Chemistry, Physiology and Inhibition. *Physiol. Rev.* 1967; 47: 595-781.
5. Foskett, J.K. and Scheffey, C.: The Chloride Cell: Definitive Identification as the Salt-Secretory Cell in Teleosta. *Science* (Washington, D.C.), 1982; 215: 164-166.
6. Conley, D. M. And Mallatt, J.: Histochemical Localization of Na⁺-K⁺ ATPase and Carbonic Anhydrase Activity in Gills of 17 Fish Species. *Can. J. Zool.* 1982; 66:2398-2405.
7. Heisler, N.: Acid-base Regulation in Fishes. In *Fish physiology*. Vol. 10A. Ed by W.S. Hoar and D.J. Randall. Academic Press, New York. 1984; 315-401.
8. Lacy, E. R.: Histochemical and Biochemical Studies of Carbonic Anhydrase Activity in the Opercular Epithelium of Euryhaline Teleost. *Fundulus heteroclitus*. *Am. J. Anat.* 1983; 166:19-39.
9. Maetz, J. and Garcia Romeu, F.: The mechanism of Sodium and Chloride Uptake by the Gills of a Fresh-Water Fish. *Carassius auratus*. II. Evidence for NH₄⁺/Na⁺ and HCO₃⁻/Cl⁻ exchanges. *J. Gen. Physiol.* 1964; 47:1209-1227
10. Henry, R. P. Samtreshk, N. J. Cameron, J. N.: The Distribution of Branchial Carbonic Anhydrase and the Effects of Gill and Erythrocyte Carbonic Anhydrase Inhibition in the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Exp. Biol.* 1988; 134: 201-218.
11. Sböttcher, K. and Siebers, D.: Biochemistry, localization, and Physiology of Carbonic Anhydrase in the Gills of Euryhaline Crabs. *J. Exp. Zool.* 1993; 265: 397-409.
12. Carter, N.D., Hawett-emmett, D., Jeffrey, S., and Tashian, R.E.: Testosterone-Induced, Sulfonamide-Resistant Carbonic Anhydrase Isozyme of Rat Liver is Indistinguishable From Skeletal Muscle Carbonic Anhydrase III. *Febs Letters* 1981; 128: 114-118.
13. Carter, M.J. and Parsons, D.S.: The Isoenzymes Of Carbonic Anhydrase: Kinetic Properties with Particular Reference to its Functions in The Gastrointestinal Tract. *J. Physiol.* 1972; 2220: 464-478.
14. Maren, T.H and Couto, E.D.: The Nature Of Anion Inhibition of Human Red Cell Carbonic Anhydrase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.1979; 196: 501-510.
15. Barman, T.E.: Enzyme Handbook, Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg Tokyo.1985.
16. Lindskog, S., Henderson, L.E., Kannan, K.K., Lijlas, A., Nyman, D.O., and Stranger, B.: Carbonic Anhydrase. *The Enzymes* 5, 3rd ed. (ed. P.D. Boyer), New York, Academic Press, 1971; 587-665.
17. Armstrong, J. McD., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., and Edsall, J.T.: Purification and Properties Of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase. *J. Biol. Chem.* 1966; 214: 5137-5149.
18. Johansen, J.T.: Isolation of Human Carbonic-anhydrase B and C Apocarbonic Anhydrase by Affinity Chromatography. *Carsberg Res. Commun.* 1976; 41:73-80.
19. Pharmacia.: Fine Chemicals, Sephadex Ion Exchangers: A Guide to Ion Exchange Chromatography . Upsola, Sweden. 1970.
20. Wilbur, K.M. and Anderson, N.G.: Electrometric And Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase. *J. Biol. Chem.* 1948; 176: 147-154.
21. Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A.S., Gibbons, B.H., and Edsall, J.T.: Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1964; 239: 1065-1078.
22. Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T.: Esterase activities of Human Carbonic Anhydrase B and C. *J. Biol. Chem.* 1967; 242: 4221-4229.
23. Testereci, H., Yörük, H. O., Akyüz, A. ve Samanlıgil, H.: Retinol Asetat, Vitamin A Palmitat, α - ve β -Tokoferol'ün Geri -Dönüşümlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Ayrılması ve Bu Vitaminlerin Van Gölü Balığında (Chalcalburnus tarichi) Tayini, *Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*, Tr. J. Of Veterinary and Animal Sciences. 1997; 21: 17-22.
24. Ergun, H., Tanyel, B. ve Çamaş, H.: Van Gölü İnci Kefali Balık Etlerinde Ya Asitleri Düzeyleri. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*. 1992; 3(1-2): 165-174.
25. Kandel, M., Gorhall, A.G., Wong, S., and Kandel, S.I.: Some Characteristics of Human, Bovine, and Horse Carbonic Anhydrases as Revealed By Inactivation Studies. *The Journal of Biological Chemistry*. 1970; 245: 2444-2450.
26. Sigma Diagnostics, Total Protein, Quantitative, Colorimetric Determination in Serum or plasma at 540 nm procedure No:540. 1984.
27. Segel, I., H.: Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State of Enzyme Systems. A Willey-Interscience Pub. John Willey & Sons. New York. 1975; 1-956.
28. Akgül, M.: Van Gölü Kapalı Havzasında Yaşayan İnci Kefalinin Chalcalburnis Tarichi (Pallas, 1811) Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar. *Tübitak VII. Bilim Kongresi Aydın*. 1980; 533-544.
29. Jampol, L. M. and Epstein, F. H.: Sodium-Potassium-Activated Adenosine Triphosphate and Osmotic Regulation by Fishes. *Am. J. Physiol.*1970; 218: 607-611.
30. Walsh, P. J., Parent, J. J., Henry, R. P.: Carbonic Anhydrase Supplies Bicarbonate For Urea Synthesis On Toadfish (opsanus beta) Hepatocytes. *Phys. Zoology*. 1989; 62(6): 1257-1272.
31. Dodgson, S. J.: Why are there Carbonic Anhydrase in The Liver ?. *Biochem. Cell. Biol.* 1991; 69: 761-763.
32. Payan, P. And Maetz, J.: Branchial Sodium Transport Mechanism in Scliorhinus Canicula: Evidence for Na⁺/NH₄⁺ and Na⁺/H⁺ exchanges. And for a role of Carbonic Anhydrase. *J. Exp. Biol.* 1973; 58: 487-502.
33. Henry, R. P.: Multiple Function of Carbonic Anhydrase in the Crustacean Gill. *J. Exp. Zool.* 1988; 248:19-24.