

Balık Kan Karbondioksitin Taşınması ve Atılmasında Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Fonksiyonları

Olçay HİSAR* Şükriye ARAS HİSAR Telat YANIK M.Sıtkı ARAS
Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü (Ohisar@atauni.edu.tr)

Geliş Tarihi : 14.05.2003

ÖZET: Balıklarda, kan karbondioksitin (CO_2) taşınması ve atılımı omurgalılardakine benzer şekilde meydana gelir. CO_2 , konsantrasyon gradiyenti doğrultusunda dokulardan eritrositlere difüze olur ve eritrositlerde karbonik anhidraz enzimi (CA) tarafından HCO_3^- ve H^+ a katalizlenir. Meydana gelen protonlar hemoglobin tarafından tamponlanırken bikarbonat anyonlarının birçoğu, plazma klorür iyonunun hücre içine girişi ile hücre dışına pasif olarak taşınırlar. Böylece dokulardan solungaçlara taşınan total CO_2 'in çoğu plazma HCO_3^- olarak taşınmış olur. Solungaçların kılcıl damarlarında ise bu siklüs tersine işler. Bu derlemede, CO_2 'in taşınması ve atılmasında iki önemli bileşen olan eritrosit ve solungaç CA izoenzimlerinin fonksiyonları anlatılmıştır.

Anahtar kelimeler: Karbondioksit, karbonik anhidraz, balık, eritrosit, solungaç

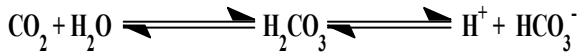
The Functions of Carbonic Anhydrase Isozymes at Fish Blood Carbon Dioxide Transport and Excretion

ABSTRACT: In fish, blood carbon dioxide (CO_2) transport and excretion follows the similar strategy as in vertebrates. CO_2 from the tissues diffuses down its concentration gradient into the erythrocytes where it becomes catalyzed to HCO_3^- and H^+ by carbonic anhydrase (CA). The protons generated are largely buffered by hemoglobin whereas most of the bicarbonate anions are passively transported out of the cell in exchange for plasma chloride. Most of the total CO_2 transported from the tissues to the gill is thus carried as plasma HCO_3^- . At the capillaries of the gill, the cycle is essentially reversed. In this review, it was explained that the functions of two important components, erythrocyte and gill CA, of these blood CO_2 transport and excretion processes.

Keywords: Carbon dioxide, carbonic anhydrase, fish, erythrocyte, gill

GİRİŞ

Balıklarda karbondioksitin (CO_2) taşınması ve atılmasını anlayabilmek için CO_2 'in sudaki kimyasal davranışlarını iyi bilmek gerekir. Sudaki CO_2 su ile direkt reaksiyona girerek bikarbonat ve protona ayrılan karbonik aside dönüşür.



Karbon dioksitin hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonlarının denge sabitleri sırasıyla $3,5 \times 10^{-2}$ ve 20 sn^{-1} 'dir. Bu denge sabitleri reaksiyonların oldukça hızlı ilerlediğini göstermesine rağmen CO_2 'in biyolojik sistemlerde gözlemlenen fizyolojik davranışları için yeterli değildir. Ayrıca, bikarbonat negatif yüklü olup sulu çözeltilerde yüksek, lipitlerde çok düşük çözünürlüğe sahipken CO_2 'in hem sulu çözeltilerde hem de lipitlerdeki çözünürlüğü yüksektir. Bu nedenle CO_2 çok kolay bir şekilde hücre içine ve dışına difüze olurken bikarbonatın hücre membranından geçmesi için taşınması gerekir. pH 6,3'ün üzerinde olduğu zaman, CO_2 ve HCO_3^- arasındaki denge HCO_3^- 'a doğru kayar ve böylece hücre içinde ihtiyaç duyulan CO_2 ve HCO_3^- konsantrasyonlarının sürdürülebilmesinde problemler oluşur (Henry ve Swenson, 2000).

Fizyolojik pH'da CO_2 'in HCO_3^- 'a dönüşümünün çok yavaş olması ve karbondioksitin hem kanda taşınması hem de solungaçlardan atılımı için gerekli olan hidrasyon ve dehidrasyon denge sabitlerinin küçük olması bir enzim tarafından katalizlenmesini gerektirir. CO_2 'in HCO_3^- 'a çevrimi CO_2 'in hücre içinde

tutulmasında önemli iken HCO_3^- 'in CO_2 'e çevrimi bikarbonatın hücre içine girişini kolaylaştırır. Böylece, enzimatik olarak CO_2 ve HCO_3^- 'in çevrilmesi hücrenin enzimlerin ihtiyaç duydukları seviyede hücrenin CO_2 miktarını artırmasının yanı sıra hücrenin proseslerin başarılabilmesi için uygun hücre içi CO_2 ve HCO_3^- seviyelerinin korunmasında da hücreye yardım eder. İşte, karbonik asit meydana getirmeden farklı bir yol izleyerek CO_2 ve HCO_3^- 'in birbirlerine çevrilmesi reaksiyonlarını katalizleyen 'karbonik anhidraz' enzimidir (Smith ve Ferry 2000).



Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında birbirlerinden habersiz olarak Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından keşfedilmiştir. Enzim ilk olarak, eritrositlerden akciğer kılcıl damarlarına bikarbonatın hızlı transferini gerçekleştiren katalitik faktörün arandığı bir çalışma sonucunda karakterize edilmiştir. Keilin ve Mann (1944), CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu bildirmişlerdir. Böylece CA enzimi, tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir.

Günümüzde, karbonik anhidraz (CA, karbonat hidroliz E.C.4.2.1.1) enziminin; bütün hayvanlarda, fotosentetik hücre yapısına sahip canlılarda ve bakteriler gibi bütün organizmalarda bulunduğu ve bağlı olduğu

proteinlere göre 14 farklı izoenziminin olduğu bilinmektedir (Chegwidden vd., 2000; Solís vd., 1999; Clare ve Supuran, 2000). CA, canlılarda CO₂'in hidratasyon ve HCO₃⁻'in dehidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlemesinin yanı sıra, böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi dokularında H⁺ ve HCO₃⁻ birikiminde de rol almaktadır (Supuran vd., 1998). Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve karasal ve sucul bitki kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri ispatlanmıştır (Tsuzuki ve Miyachi, 1989; Badger ve Price, 1994).

Bazı CA izoenzimleri (CA I, CA II, CA III, CA VII) sitozolde, bazıları (CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV) membrana bağlı, CA V yalnızca mitokondride, CA VI tükürükte bulunurken son yıllarda katalitik etkisi olmayan birkaç formu da (CA VIII, CA X ve CA XI) izole edilmiştir (Pocker ve Sarkanen, 1979; Ilies vd., 2000; Supuran ve Scozzafava, 2000; Smith ve Ferry 2000). CA izoenzimleri; moleküler ve kinetik özellikleri, doku ve hücrelerdeki dağılımları ve belirli inhibitörlere olan duyarlılıkları ile birbirlerinden farklılık gösterirler (Maren ve Sanyal, 1983; Sanyal, 1984; Henry vd., 1993, 1997; Hewett-Emmett ve Tashian, 1991).

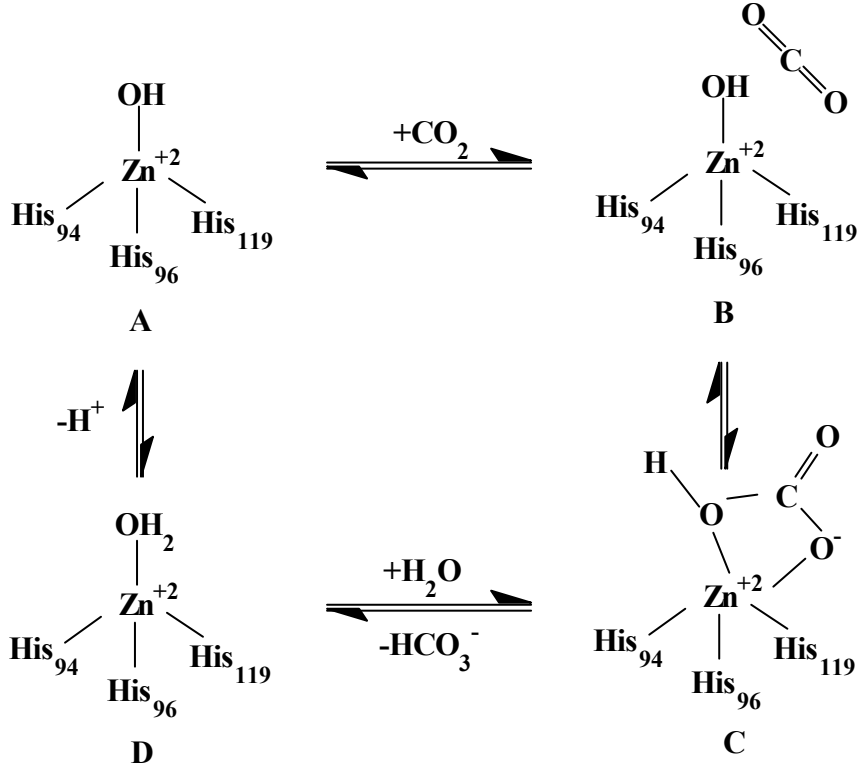
Düşük aktiviteli CA I ve yüksek aktiviteli CA II izoenzimlerinin her ikisi de, omurgalıların eritrosit hücrelerinin sitozolünde bulunmuştur. CA I ve II izoenzimlerinin aktivitelerinin yanı sıra bu izoenzimlerin bakır, iyodür ve asetazolamid gibi inhibitörlere olan duyarlılıkları da bunlar arasındaki farkı ortaya koyar (Maren vd., 1980; Sanyal, 1984). Birçok ilkel omurgalı eritrositlerinde yalnızca bir tip CA izoenzimine sahiptir (Carlsson vd., 1980; Hall ve Schraer, 1983; Kim vd., 1983; Sanyal vd., 1982). Agnatarlar ve kıkırdaklı balıklarda eritrosit CA'sı her iki aktivite ve inhibitörlere olan duyarlılıkta düşük tipteki izoenzim I'e benzemektedir (Carlsson vd., 1980; Henry vd., 1993; Maren vd., 1980). Fakat gelişmiş kemikli balıklar eritrositlerinde hızlı aktiviteli CA II izoenzimine sahiptirler (Hall ve Schraer, 1983; Henry vd., 1993; Kim vd., 1983; Maren vd., 1980). Hava soluyan balıklardan *Amia calva* eritrositlerindeki CA enziminin turnover sayısı, agnata ve kıkırdaklı balıklardaki yavaş tip CA I ile kemikli balıklardaki hızlı tip CA II izoenzimlerinin turnover sayıları arasında bulunmuştur. CA enziminin inhibisyon özellikleri memelilerdeki hızlı CA izoenzimine benzemektedir olduğu gözlenmiştir (Gervais ve Tufts, 1999; Peterson vd., 1997). Balıklarda hem eritrosit hem de solungaç karbonik anhidraz (CA) izoenzimlerinin molekül ağırlıkları 30 kDa civarındadır. Bu CA izoenzimlerinin sülfanilamidlere olan yüksek hassasiyetinden dolayı, solungaç CA enzimi de

memelilerdeki hızlı CA II izoenzimine benzemektedir. (Sender vd., 1999; Henry vd., 1997).

Karbonik anhidraz enzimi yapısal olarak iki önemli özelliğe sahiptir. Bunlardan birincisi, aktif bölgede Zn⁺² iyonu ve bu iyonla bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmesidir. İkinci olarak da, aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradiyenti oluşturacak şekilde düzenlenmiş olmalarıdır. Zn⁺² iyonuna, hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif bir formu (A) oluşur. Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO₂ molekülüne saldırır (B). Bu da Zn⁺² iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (C). Daha sonra HCO₃⁻ iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunun sonucunda Zn⁺² iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna (D) dönüşmesini sağlar. Tekrar bazik formuna geçmek için, aktif bölgeden çevresine bir proton transferi gerçekleşir (Şekil 1) (Lindskog ve Silverman, 2000).

CA enziminin işleyiş mekanizması göz önünde bulundurulduğunda hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarının katalizlenmesi protonların sırasıyla aktif bölgeden difüzyon ile çıkması ve girmesine bağlıdır (Coleman, 1980; Tu vd., 1989; Silverman, 1991). Bu sebeple CA aktivitesi, tamponların yerel konsantrasyonları ile doğru orantılıdır (Lindskog, 1980; Tu vd., 1989; Paranawithans vd., 1990). Eritrosit hücrelerinin hücre içi tampon kapasitesi, yüksek konsantrasyonda hemoglobinden dolayı oldukça yüksektir. Düşük hemoglobin konsantrasyonunda bile insan ve sığır eritrosit hücrelerindeki CA aktivitesinin iki kat arttığı belirlenmiştir (Silverman vd., 1979; Backman, 1981). Bu durum hemoglobinin CA enzimine bağlanması ile gerçekleşmiştir. Çünkü, bu şekilde proton transferinin artırılmasının yalnızca hemoglobinin sağladığı tamponlamadan daha güçlü etkisi vardır (Silverman vd., 1978). Ayrıca, eritrosit CA aktivitesinin eritrosit hücre membranı varlığında %300 arttığı bildirilmiştir (Parkes ve Coleman, 1989). Buna sebep olarak da, membran üzerinde bir ya da birden fazla iyon değiştirici proteinin (Na⁺:H⁺ değiştirici ya da Cl⁻:HCO₃⁻ bant-3 anyon değiştirici proteini) (Kifor vd., 1993) varlığı gösterilebilir.

Omurgalılarda eritrosit hücrelerinin sahip olduğu anyon değiştirici proteinlerin sayısında da önemli miktarda değişikliğin mevcut olduğu bildirilmiştir. Örneğin insan ve kaplumbağa eritrositleri az miktarda anyon değiştirici protein içerirler (7000-8000 adet mm⁻²) (Knauf, 1979; Stabenau vd., 1991). Oysa lama ve alabalıkların eritrositleri oldukça fazla anyon değiştirici protein içermektedirler (23000-30000 adet mm⁻²) (Khodadad ve Weinstein, 1983; Romano ve Passow, 1984).



Şekil 1. Karbonik anhidraz enziminin kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi (Lindskog ve Silverman, 2000)

Memelilerdeki durumun aksine kemikli balıkların kan plazmasında karbonik anhidraz aktivitesi yoktur. Bu sebeple, balık eritrositlerinde asit, plazmadan eritrositlere yavaş bir şekilde transfer edilir. Böylece Na⁺/H⁺ pompaları protonları eritrositlerden uzaklaştırırken bu protonlar tekrar hücre içine Jacob-Steward döngüsü (Şekil 2) ile girerler. Bu döngüde, plazmadaki CO₂/HCO₃⁻ hidratasyon veya dehidratasyon reaksiyonları katalizlenmeden gerçekleşir (Rahim vd., 1988; Henry vd., 1993, 1997; Perry vd., 1996; Acierno vd., 1997; Gilmour vd., 1997).

Aşırı egzersiz veya hipoksi (yeterli oksijenin bulunmaması) durumunda kana çok yüksek oranda asit salınımı gerçekleştiğinden, düşen kan pH'sı ile birlikte hemoglobinin oksijen bağlama kapasitesi de düşmektedir (Root etki) ki, bu düşüşle birlikte dokularda oksijen dağılımının azalacağı düşünülebilir. Fakat bu etki, balıklarda salgılanan katekolaminlerin eritrosit pH'sını artırmasıyla en aza indirgenir (Motais vd., 1989; Nikinmaa vd., 1990; Wood ve Munger, 1994).

Lessard vd. (1995), gökkuşağı alabalığına (*Oncorhynchus mykiss*) sığır CA enzimi enjekte ederek alabalık kanında toplam O₂, CO₂, organik fosfat, laktat içeriği, katekolamin seviyeleri, hemoglobin, hematokrit, eritrosit pH'sı ve plazma pH'sını belirlemişlerdir. Sonuçta, enjekte edilen CA enziminin kan oksijen içeriğinde azalmaya sebep olmadığını fakat toplam plazma CO₂ içeriğini önemli bir şekilde etkilediğini bildirmişlerdir.

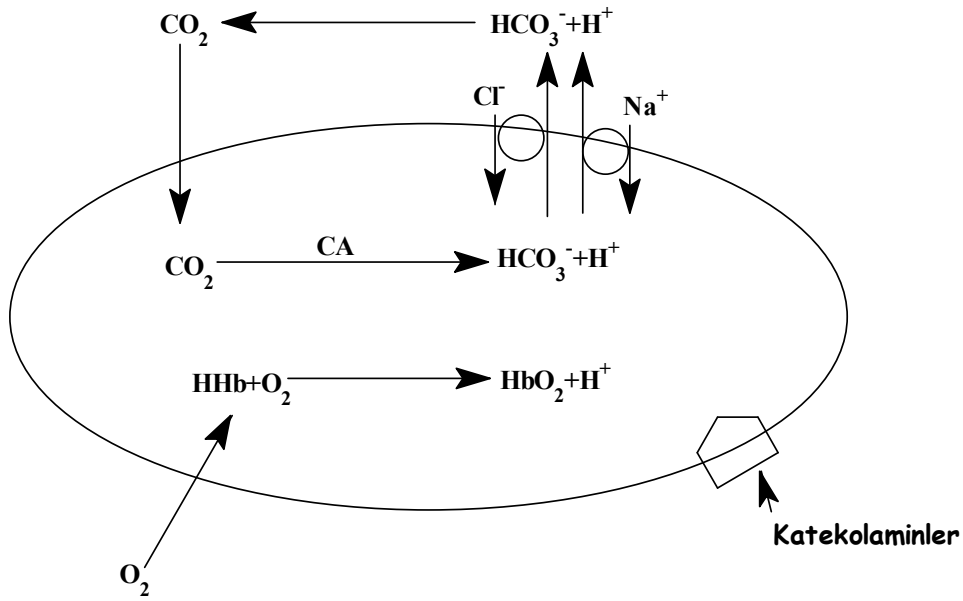
Birçok durumda kanda katekolaminlerin seviyesi yükseltilmez ve eritrosit pH'sında dalgalanmalar meydana gelir. Bu dalgalanmalar eritrositlerdeki hemoglobinin oksijen doygunluğunu etkiler. Ayrıca, hemoglobinin oksijen bağlarken proton salması da (Haldane etkisi) eritrosit pH'sını etkileyebilir. Eritrosit hücrelerindeki bikarbonat dehidratasyonu hemoglobinin oksijen bağlaması esnasında ters etki yapmaktadır. Normalde, bikarbonat dehidratasyonu ve hemoglobinin oksijen bağlaması birlikte olur ve meydana gelen bu değişiklikler birbirlerini dengelerler. Sonuçta eritrosit pH'sındaki değişiklikler minimuma indirgenir. Bu şartlarda kemikli balıklarda görülen Root etkisinin bir dezavantaj olmadığı görülür (Randall ve Brauner, 1998).

Genelde ilkel omurgalıların ekstraselüler sıvılarındaki CA aktivitesinin doğal inhibitörlerin varlığından dolayı çok düşük olduğu düşünülmektedir (Dimberg, 1994; Peters vd., 2000). Plazma CA inhibitörlerinin etkinliği ve oluşumlarının türden türe değiştiği, alabalıkların daha potansiyel bir inhibitöre sahip oldukları ve inhibitörün eritrosit CA'sı ile olan cross-reaksiyonun filogenetik akrabalıkla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Balık plazmasında varolan CA inhibitörlerinin seçimi, birçok farklı fizyolojik etkilerin sonucu olmaktadır. Bu fizyolojik etkilere örnek olarak; eritrositlerin intraselüler pH'larının korunması, solunumun kontrolü ve eritrositlerin kırılabilirliği verilebilir (Henry vd., 1997).

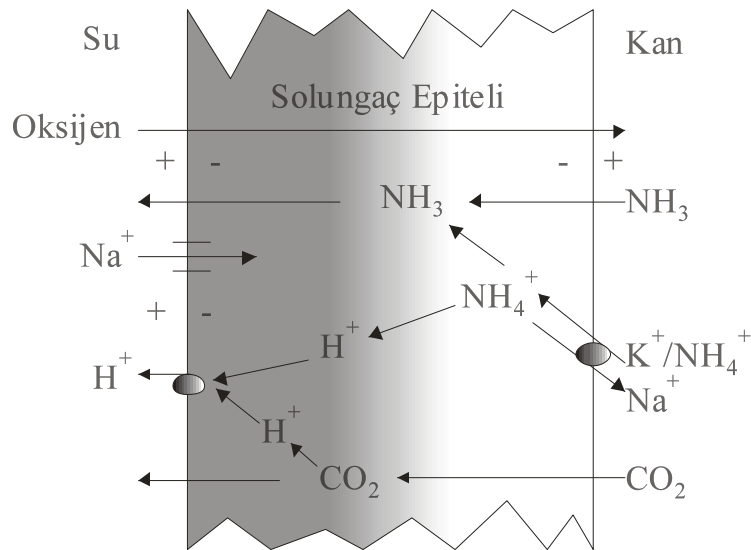
Balık solungaçlarında bulunan CA enziminin gaz değişiminde, asit-baz dengesinin korunması, osmoregülasyon, iyonregülasyon ve nitrojen metabolizmasındaki atık ürünlerin temizlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir (Lionetto vd., 2000). Solungaç dokusunda CA enzim aktivitesi balıkların yaşadığı ortama ve osmoregülasyon ile ilişkili davranışlarına bağlıdır (López-Mañanes vd., 2000).

Tatlı su balıklarının solungaç epitelinin apikal bölgesinde, karbonik anhidraz ve proton ATPaz birlikte bulunmaktadır. Karbonik anhidraz enzimi solungaç epitelinin bazal bölgesinde yoktur (Şekil 3). Bu sebeple,

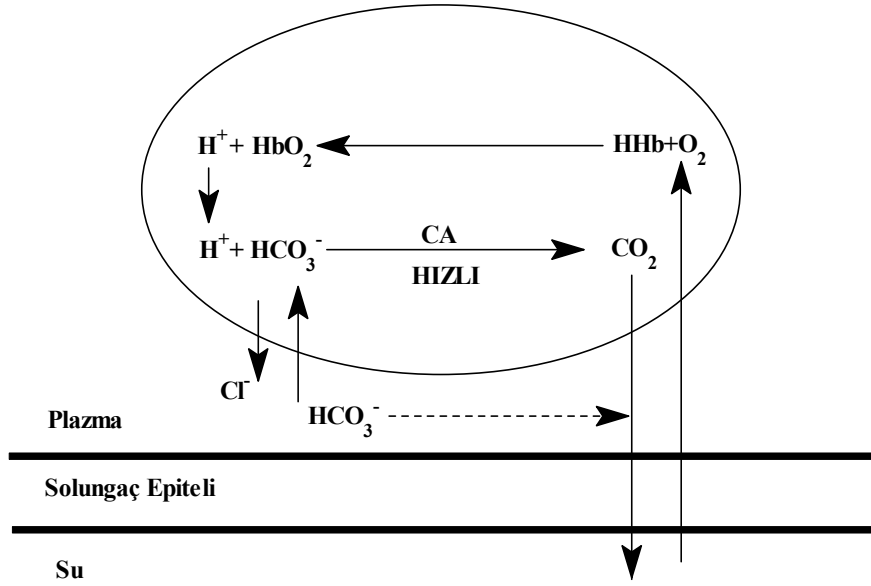
plazma solungaçlar içerisinden geçerken plazma CO₂/bikarbonat reaksiyonları, CA yokluğundan dolayı katalizlenmemekte ve bu reaksiyonlar kanın solungaçlardan geçmesi esnasında eritrositlerde katalizlenmektedir (Şekil 4) (Randall ve Brauner, 1998). Kıkırdaklı balıklar ise, solungaç damar sistemleri içindeki bazal membrana bağlı CA enzimine sahiptirler. Solungaç membranına bağlı CA enziminin, CO₂ atılımının sürdürülmesinden daha çok pH ve/veya solunum sistemindeki CO₂ duyarlılığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Henry vd., 1997).



Şekil 2. Eritrosit hücrelerindeki Jacob-Steward döngüsü (Lessard vd., 1995)



Şekil 3. Tatlı su balıklarının solungaç epitelinin sematik görüntüsü. Gölge alan, epitelin karbonik anhidraz enzimini bulundurduğu bölgeyi göstermektedir (Randall ve Brauner 1998)



Şekil 4. Tatlı su balıklarının solungaçlarındaki gaz değişim diyagramı (Randall ve Brauner 1998)

SONUÇ

Karbonik anhidraz enzimi kofaktör olarak çinko içeren metalloenzimlerin bir üyesidir. Bu enzim, su ve karbondioksitin dönüşümlü hidrasyon ve dehidrasyonunu katalizleyerek reaksiyon içerisinde yer alan bütün kimyasal türler arasındaki dengenin sürdürülmesini sağlar. (Esposito vd., 2000; Chegwidden vd., 2000).

Kemikli balıkların eritrosit hücrelerinde hızlı tip CA izoenzimi (CA II) mevcut iken kıkırdaklı balıkların eritrositlerinde yavaş tip CA izoenzimi (CA I) mevcuttur. İlkel omurgalılarından olan kemikli balıklarda, kan plazmasında CA aktivitesi yoktur. Buna gerekçe olarak plazmada bulunan doğal CA inhibitörlerinin varlığı gösterilmektedir. Plazmada CA aktivitesinin olmaması; kaslardan kana geçen serbest protonların plazma bikarbonatını titre etme hızını azaltır ve oluşan asidin eritrosit hücrelerine transferi çok yavaş olduğundan bu asidik ortamdan eritrositlerin korunması sağlanır. Ayrıca plazmadaki CA aktivitesinin eksikliği solungaç epitelindeki CO₂ atılımını da yavaşlattığından kan pH'sının dengelenmesini kolaylaştırır (Lessard vd., 1995).

Balıkların solungaçlarında hızlı tip CA enzimi mevcuttur ve solungaçlardaki gaz değişiminde, asit-baz dengesinin korunmasında, osmoregülasyon, iyonregülasyon ve nitrojen metabolizmasındaki atık ürünlerin temizlenmesinde rol almaktadır.

Kemikli balıkların solungaç epitel hücrelerinin bazal bölgesinde de CA aktivitesi yoktur. Eğer bu bölgelerde CA aktivitesi olsaydı plazmada meydana gelen pH değişimleri solungaç epitelini de etkileyecekti. Bu durumda solungaç epitelinde bulunan ve pH

değişimlerinden oldukça fazla etkilenen proton pompaları plazma pH'sına bağımlı olacaktı (Randall ve Brauner, 1998).

Kemikli balıkların tersine kıkırdaklı balıkların plazmalarında CA aktivitesi ve solungaç epiteline bağlı CA enzimi mevcut iken, plazma CA inhibitörlerinin bulunmaması bu balıkların plazma tamponlama kapasitelerinin bir hayli yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Böyle bir tamponlama kapasitelerinin olması, aşırı egzersiz durumunda asidik ortam oluşumunu ve plazmada ani pH değişimlerini önlemektedir (Gilmour vd., 2002).

Sonuç olarak; balıklarda CO₂'in taşınması ve atılması ile ilgili CA izoenzimlerinin fonksiyonlarında belirlenen farklılıkların; balıkların kendilerine has fizyolojik özelliklere, yaşadığı ortama ve osmoregülasyona bağlı olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acierno, R., Maffia, M., Rollo M., Storelli, C., 1997. Buffer capacity in the blood of the hemoglobinless Antarctic fish chionadraco hamatus. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A:989-992.
- Backman, L., 1981. Binding of human carbonic anhydrase to human hemoglobin. *Eur. J. Biochem.*, 120:1372-1383.
- Badger, M.R., Price, G.D., 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45:369-392.
- Carlsson, U., Kjellstrom, B., Antonsson, B., 1980. Purification and properties of cyclostome carbonic anhydrase from erythrocytes of hagfish. *Biochim. Biophys. Acta.*, 612:160-170.
- Chegwidden, W.R., Dodgson, S.J., Spencer, I.M., 2000. In the Carbonic anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel. 343-363.

- Clare, B.W., Supuran, C.T., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 86. A QSAR study on some sulfonamide drugs which lower intra-ocular pressure, using the ACE non-linear statistical method. *Eur. J. Med. Chem.*, 35:859-865.
- Coleman, J.E., 1980. Current concepts of the mechanism of action of carbonic anhydrase. In: Bauer, C., Gros, G., Bartels, H. (Eds.), *Biophysics and Physiology of Carbon Dioxide*. Springer Verlag, New York.
- Dimberg, K., 1994. The carbonic anhydrase inhibitor in trout plasma: purification and its effect on carbonic anhydrase activity and the Root effect. *Fish Physiol. Biochem.*, 12:381-386.
- Esposito, E.X., Baran, K., Kelly, K., Madura, J.D., 2000. Docking of sulfonamides to carbonic anhydrase II and IV. *J.Mol.Graphks Med.*, 18:283-289.
- Gervais, M.R., Tufts, B.L., 1999. Characterization of carbonic anhydrase and anion exchange in the erythrocytes of bowfin (*Amia calva*), a primitive air-breathing fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 123 A:343-350.
- Gilmour, K.M., Henry, R.P., Wood, C.M., Perry, S.F., 1997. Extracellular carbonic anhydrase and acid-base disequilibrium in the blood of the dog fish *Squalus acanthias*. *J. Exp. Biol.*, 200:173-183.
- Gilmour, K.M., Shah, B., Szebedinszky, C., 2002. An investigation of carbonic anhydrase activity in the gills and blood plasma of brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*), longnose skate (*Raja rhina*), and spotted ratfish (*Hydrolagus colliei*). *J. Comp. Physiol.*, 172 B:77-86.
- Hall, G.E., Schraer, R., 1983. Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75B:81-92.
- Henry, R.P., Gilmour K.M., Wood, C.M., Perry, S. F., 1997. Extracellular carbonic anhydrase activity and carbonic anhydrase inhibitors in the circulatory system of fish. *Physiol. Zool.*, 70:650-659.
- Henry, R.P., Tufts, B.L., Boutilier, R.G., 1993. The distribution of carbonic anhydrase type I and II isozymes in lamprey and trout: possible co-evolution with erythrocyte chloride/bicarbonate exchange. *J. Comp. Physiol.*, 163:380-388.
- Henry, R.P., Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Respir. Phys.*, 121:1-12.
- Hewett-Emmett, D., Tashian, R.E., 1991. Structure and evolutionary origins of the carbonic anhydrase multigene family. In *The Carbonic Anhydrases* (ed. S.J. Dodgson, R.E. Tashian, G. Gros and N.D. Carter) Plenum Press, New York.
- Ilies, M., Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Capriou, M.T., Maganu, M., Banciu, M.D., 2000. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Sulfonamides Incorporating Furan-, Thiophene- and Pyrrole-carboxamido Groups Possess Strong Topical Intraocular Pressure Lowering Properties as Aqueous Suspensions. *Bioorg. Med. Chem.*, 8:2145-2155.
- Keilin, D., Mann, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature*, 153:107-108.
- Khodadad, J.K., Weinstein R.S., 1983. The band 3-rich membrane of lama erythrocytes: sties on cell shape and the organization of membrane proteins. *J. Memb. Biol.*, 72:161-71.
- Kifor, G., Toon, M.R., Janoshazi, A., Solomon, A.K., 1993. Interaction between red cell membrane band-3 and cytosolic carbonic anhydrase. *J. Memb. Biol.* 134:169-179.
- Kim, J.S., Gay, C.V., Schraer, R., 1983. Purification and properties of carbonic anhydrase from salmon erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76B:523-527.
- Knauf, P.A., 1979. Erythrocyte anion exchange and the band 3 protein: transport kinetics and molecular structure. In: F. Bronner, A. Kleinzeller (eds.) *Current Topics in Membranes and Transport*, vol 12. Academic, New York.
- Lessard, J., Val, A.L., Aota, S., Randall, D.J., 1995. Why is there no carbonic anhydrase activity available to fish plasma? *The J. Exp. Biol.*, 198:31-38.
- Lindskog, S., 1980. Rate-limiting steps in the catalytic action of carbonic anhydrase. In: C. Bauer, G. Gros, H. Bartels (Eds.) *Biophysics and Physiology of Carbon Dioxide*. Springer-Verlag, New York.
- Lindskog, S., Silverman, D.W., 2000. In the carbonic anhydrase. *New Horizons*, Basel. 175-196.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S., Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquat. Toxicol.*, 48:561-571.
- López Mañanes, A.A., Magnoni, L.J., Goldemberg, A.L., 2000. Brancial carbonic anhydrase (CA) of gills of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, Part 127 B:85-95.
- Maren, T.H., Sanyal, G., 1983. The activity of sulfonamides and anions against the carbonic anhydrases of animals, plants, and bacteria. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23:439-59.
- Maren, T.H., Freidland, B.R., Rittmaster, R.S., 1980. Kinetic properties of primitive vertebrate carbonic anhydrase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 67B:69-74.
- Meldrum, N.N., Roughton, F.J.W., 1933. Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *Nature*, 80:113-142.
- Motais, R., Fievet, B., Garcia-Romeu, F., Thomas, S., 1989. Na⁺/H⁺ exchange and pH regulation in red blood cells: role of uncatalyzed H₂CO₃ dehydration. *Am. J. Physiol.*, 256:C728-C735.
- Nikinmaa, M., Tithonen, K., Paajaste, M., 1990. Adrenergic control of red cell pH in salmonid fish: roles of the sodium/proton exchange, Jacobs-Stewart cycle and membrane potential. *J. Exp. Biol.*, 154:257-271.
- Paranawithans, S.R., Tu, K., Laipis, P.J., Silverman, D.N., 1990. Enhancement of the catalytic activity of carbonic anhydrase III by phosphates. *J. Biol. Chem.*, 265:22270-22274.
- Parkes, J.L., Coleman, P.S., 1989. Enhancement of carbonic anhydrase activity by erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 275:459-468.
- Perry, S.F., Wood, C.M., Walsh, P.J., Thomas, S., 1996. Fish red blood cell carbon dioxide excretion in vitro: a comparative study. *Comp Biochem. Physiol.*, 113A:121-130.
- Peters, T., Papadopoulos, F., Kubis H-P., Gros G., 2000. Properties of a carbonic anhydrase inhibitor protein in flounder serum. *J. Exp. Biol.*, 203:3003-3009.
- Peterson, R.E., Tu, C., Linser, P.J., 1997. Isolation and Characterization of a Carbonic Anhydrase Homologue from the Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Mol. Evol.*, 44:432-439.
- Pocker, Y., Sarkanen, S., 1979. *Carbonic Anhydrase: Structure, Catalytic Versatility and Inhibition*, *Advances in Enzymology*, Interscience, New York.
- Rahim, S. M., Delaunay, J.P., Laurent, P., 1988. Identification and immunocytochemical localization of two different carbonic anhydrase isoenzymes in the teleostean fish erythrocytes and gill epithelia. *Histochemistry*, 89:451-459.
- Randall, D.J., Brauner, C., 1998. Interaction Between Ion and Gas Transfer in Freshwater Teleost Fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119A (1): 3-8.
- Romano, L., Passow, H., 1984. Characterization of anion transport system in trout red blood cells. *Am. J. Physiol.*, 246 (Cell Physiol. 15):C330-338.
- Sanyal, G., Pessah, N.I., Swenson, E.R., Maren, T.H., 1982. The carbon dioxide hydration activity of purified teleost red cell carbonic anhydrase. Inhibition by sulfonamides and anions. *Comp Biochem Physiol.*, 73B:937-944.
- Sanyal, G., 1984. Comparative carbon dioxide hydration kinetics and inhibition of carbonic anhydrase isozymes in vertebrates. *Ann. NY Acad. Sci.*, 429:165-178.
- Sender, S., Bottcher, K., Cetin, Y., Gros G., 1999. Carbonic anhydrase in the gills of seawater- and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: Purification, characterization, and immunohistochemical localization. *J. Histochem. Cytochem.*, 47 (1): 43-50.
- Silverman, D.N., 1991. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *Can. J. Bot.*, 69:1070-1078.

- Silverman, D.N., Backman, L., Tu, C., 1979. Role of hemoglobin in proton transfer to the active site of carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 254:2588-2591.
- Silverman, D.N., Tu, C., Wynns, G., 1978. Proton transfer between hemoglobin and the carbonic anhydrase active site. *J. Biol. Chem.*, 254:2563-2567.
- Smith, K.S., Ferry, J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24:335-366.
- Solís, C., Olivera, A., Andrade, E., Ruvalcaba-Sil, J.L., Romero, I., Celis, H., 1999. PIXE analysis of Zn enzymes. *Nucl. Instrum. Meth.*, 150 B:222-225.
- Stabenau, E.K., Vanoye, C.G., Heming, T.A., 1991. Characteristics of the anion transport system in sea turtle erythrocytes. *Am. J. Physiol.*, 261: R1218-1225.
- Stadie, W.C., O'Brien, H., 1933. The catalysis of the hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid by the enzyme from red blood cells. *J. Biochem.*, 103:521-529.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors - Part 94. 1,3,4-Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents? *Eur. J. Med. Chem.*, 35:867-874.
- Supuran, C.T., Ilies, M., Scozzafava, A., 1998. Carbonic anhydrase inhibitors - Part 29¹: Interaction of isozymes I, II and IV with benzolamide-like derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 33: 739-751.
- Tsuzuki, M., Miyachi, S., 1989. The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. *Aquat. Bot.*, 34:85-104.
- Tu, C.K., Silverman, D.N., Forsman, C., Jonsson, B.H., Lindskog, S., 1989. Role of the histidine 64 in the catalytic mechanism of human carbonic anhydrase II studied with a site-specific mutant. *Biochemistry*, 28:7913-7918.
- Wood, C.M., Munger, S., 1994. Carbonic anhydrase injection provides evidence for the role of blood acid-base status in stimulating ventilation after exhaustive exercise in rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 94: 247-270.