

SERVET DURANAY

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2017



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MİDYE (MYTİLUS GALLOPROVİNCİALİS LAM.)
HEMOLENFİNDEN ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

SERVET DURANAY

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. NURTEN ÖZSOY**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

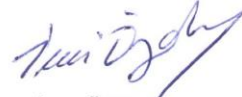
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Biokimya Anabilim Dalı, Biokimya Programında Yüksek Lisans öğrencisi Servet DURANAY tarafından Doç.Dr. Nurten ÖZSOY'un danışmanlığında hazırlanan "Midye (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) Hemolenfinden Asetilkolinesteraz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi" başlıklı tez, aşağıdaki Jüri üyeleri tarafından 05/07/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı
Prof.Dr. Ayşe CAN
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biokimya Anabilim Dalı



Jüri (Danışman)
Doç.Dr. Nurten ÖZSOY
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biokimya Anabilim Dalı



Jüri
Prof. Dr. İnci ÖZDEN
Yeditepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya
Anabilim Dalı



Jüri
Prof.Dr. Nuriye AKEV
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biokimya Anabilim Dalı



Jüri
Doç.Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biokimya Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Servet Duranay



İTHAF

Bu tez çalışmasını bana her zaman güvenen ve beni her konuda destekleyip yalnız bırakmayan Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımda ve tez yazım sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nurten Özsoy'a,

Lisansüstü eğitim sürecinde bilgi birikimlerini bizden esirgemeyen, her koşulda bize yeni bilgiler öğretmeyi hedeflemiş olan Biokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe Can ve Sayın Prof. Dr. Nuriye Akev hocalarıma,

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı'ndan desteklerinden ötürü Doç. Dr. Pınar Aksoy Sağırılı, Doç. Dr. Tuğba Yılmaz Özden, Yrd. Doç. Dr. Özlem Kurt Şirin hocalarıma,

Lisansüstü eğitimimde bana her konuda yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Gözde Hasbal ve Arş. Gör. Gülsüm Altıparmak'a ve ayrıca Anabilim Dalı sekreterimiz Ali Kemal Demir'e,

Beni hedeflerime ulaşmam konusunda maddi ve manevi olarak desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve bana sonsuz güven veren aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21244

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Asetilkolinesterazın Tarihçesi ve Özellikleri.....	4
2.2. Asetilkolinesterazların Fizyolojik Önemi	5
2.2.1. Asetilkolinesterazın Fizyolojik Fonksiyonu (Kolinergik İleti).....	5
2.2.2. AChE'nin Diğer Etkileri	6
2.2.2.1. Nörogenez	6
2.2.2.2. Hücre Adezyonu.....	7
2.2.2.3. Sinaptogenez (Sinaps Yapımı).....	8
2.2.2.4. Dopamin Nöronların Aktivasyonu	8
2.2.2.5. Sinir Hücresi Rejenerasyonu	8
2.2.2.6. Apoptozun Düzenlenmesi	9
2.2.2.7. Hematopoez.....	9
2.2.2.8. Lenfosit Aktivasyonu	9
2.3. AChE'nin Alternatif Splicing'i ve Post Translasyonel Modifikasyonları	9
2.3.1. AChE'nin Moleküler Formları.....	10
2.3.1.1. AChE _R : R 'Readthrough' Formu	11
2.3.1.2. AChE _H : H 'Hidrofobik' Formu.....	11
2.3.1.3. AChE _T : T 'Tailed' (Kuyruklu) Formu	13
2.3.1.4. AChE _S : S 'Soluble' Formu	16

2.3.2. N-Glikozilasyon	16
2.4. AChE'nin Üç Boyutlu (3D) Yapısı.....	18
2.4.1. Enzimin Aktif Bölgesi	20
2.4.1.1. Esteratik (Katalitik) Alt Bölge (Katalitik Triad).....	23
2.4.1.2. AChE'nin Etki Mekanizması	23
2.4.1.3. Oksianyon Deliği	24
2.4.1.4. Anyonik Alt Bölge (Kolin Bağlayan Alt Bölge veya Hidrofobik Alt Bölge)	25
2.4.1.5. Açıl Bağlama Cebi	27
2.4.1.6. Periferik Anyonik Alt Bölge	27
2.4.1.7. Büyük Omega İlmigi (Loop) (Cys69–Cys96).....	27
2.5. Alzheimer Hastalığında Asetilkolinesterazın Rolü.....	28
2.5.1. Kolinergik Hipotez.....	28
2.6. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri	31
2.6.1. Flavonoidler	31
2.7. Midye AChE'leri	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Kullanılan Gereçler	35
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.3. Kullanılan Çözeltiler	36
3.4. Kullanılan Yöntemler.....	37
3.4.1. Hemolenfin Elde Edilmesi	37
3.4.2. Midye Hemolenfinden Asetilkolinesterazı Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Belirlenmesi	37
3.4.3. Midye Hemolenf Asetilkolinesterazın Belirlenen Amonyum Sülfat Kesitinin Elde Edilmesi	38
3.4.4. Protein Miktar Tayini.....	38
3.4.4.1. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi.....	38
3.4.5. Asetilkolinesteraz Aktivite Deneyinin Yapılışı	39
3.4.6. Edrofonyum–Sefaroz 6B Afinit Kolon Kromatografisi.....	40
3.4.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	40
3.4.8. Denatüre Edici SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Tayini.....	41

3.4.9. Midyeden Elde Edilen Asetilkolinesterazın Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi	41
3.4.9.1. pH'nın Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi..	41
3.4.9.2. Temperaturün Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi.....	41
3.4.9.3. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	42
3.4.10. İnhibisyon Deneyleri.....	42
4. BULGULAR.....	44
5. TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Farklı konsantrasyonlarda asetiltiyokolin içeren Ellman ayırıcının hazırlanması.	42
Tablo 4.1: Amonyum sülfat kesitinin belirlenmesi.	44
Tablo 4.2: Asetilkolinesteraz enziminin midye hemolenfinden elde edilme basamakları.	45
Tablo 4.3: Metoksiflavonların inhibisyon aktiviteleri.	49



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: AChE'in kolinerjik sinir iletimdeki rolü .	6
Şekil 2.2: Gliotactin, neuroligin ve neurotactin'in şematik yapısı .	7
Şekil 2.3: AChE'in yapısal homologları	8
Şekil 2.4: AChE'in plazma membranına bağlanmasında GPI çapasının yapısı	11
Şekil 2.5: <i>Torpedo</i> GPI çapasına bağlı AChE dimerinin şematik yapısı	12
Şekil 2.6: AChE ve BChE'ların oligomerizasyon şekilleri .	13
Şekil 2.7: İnsan beynindeki AChE geninin yapısı ve alternative mRNA splicing sonucunda oluşan moleküler formları	14
Şekil 2.8: [WAT] ₄ PRAD kristal yapı diagramı .	16
Şekil 2.9: AChE'in ER ve Golgi aygıtında işlenmesi	18
Şekil 2.10: α/β Hidrolaz katlanmanın topolojik ikincil yapısı.	19
Şekil 2.11: <i>Torpedo californica</i> asetilkolinesterazın yapısının diagramı .	19
Şekil 2.12: AChE'in üç boyutlu yapısı açıklanmadan önce yapılan biyokimyasal çalışmalar ile tespit edilen aktif merkezindeki bağlanma yerleri .	20
Şekil 2.13: AChE'in X-ray yapısı	22
Şekil 2.14: AChE'in aktif merkezinin alt bölgeleri .	22
Şekil 2.15: AChE tarafından asetilkolinin hidrolizi.....	23
Şekil 2.16: AChE'in katalitik mekanizması	24
Şekil 2.17: Transfer durumundaki substratın katalitik triad, tetrahedral ara ürünü ve oksianyon deliği ile etkileşimi.	25
Şekil 2.18: AChE'in anyonik alt bölgesi	26
Şekil 2.19: Asetilkolin hidroliz ürünlerinin aktif çukurdan çıkışı.	26
Şekil 2.20: <i>Torpedo</i> AChE'in yapısındaki iki PAS kalıntısına (Tyr70 ve Asp72)'a bağlı omega ilmiği 69-96 (yeşil).....	28
Şekil 2.21: A. Alzheimer hastalığında öne sürülen nörokimyasal değişiklikler. B. AH'nın tedavi stratejeleri.....	30
Şekil 2.22: Kafeik asidin kolin esterinin AChE'in aktif merkezine bağlanması	32
Şekil 2.23: Flavonoid yapılarında substituentlerin genel yerleşme pozisyonları	33
Şekil 3.1: Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemi	39
Şekil 4.1: Midye hemolenfinden % 45 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürülen fraksiyonun edrofonyum-Sefaroz 6B kolonundaki elüsyon grafiği.	45

Şekil 4.2: SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde görülen protein bantları.....	46
Şekil 4.3: Afinite kromatografisi ile elde edilen AChE elüatının, düşük molekül ağırlıklı standart proteinlerle karşılaştırmalı olarak denatüre edici şartlar altında çalışılan SDS-PAGE'deki protein bantları.	47
Şekil 4.4: Düşük molekül ağırlıklı standart proteinlerin SDS-PAGE standart eğrisi ve regresyon denklemi.	47
Şekil 4.5: Asetiltiyokolin konsantrasyonunun asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkisi ($1/K_m = -742,92$; $1/V_{max} = 5,30$).	48
Şekil 4.6: Temperaturün AChE enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	48
Şekil 4.7: pH'nın AChE enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	49
Şekil 4.8: 5-Hidroksi-6,7,8'-tetrametoksiflavon'a (1 mg/ml) ait Lineweaver-Burk grafiği ($K_i = 10^{-2}$ mg/ml).....	50
Şekil 4.9: Hispiduline (2 mg/ml) ait Lineweaver-Burk grafiği ($K_i = 3,6 \times 10^{-2}$ mg/ml). .	51
Şekil 4.10: Gnafaline (1 mg/ml) ait Lineweaver-Burk grafiği ($K_i = 2 \times 10^{-2}$ mg/ml).	51

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**Semboller**

α	Alfa
β	Beta
μg	Mikrogram
$\text{\AA}$	Angstrom
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molarite
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
N	Normalite
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
U	Unite
V	Volt
μl	Mikrolitre
Π	Pi

Kısaltmalar

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
ACS	Aromatik katyon bağlanma bölgesi
AH	Alzheimer hastalığı
Ala	Alanin
APP	Amiloid Prekürsör Proteini
AS	Anyonik substrat bağlanma bölgesi
Asp	Aspartat
A β	Amiloid beta
BChE	Butirilkolinesteraz
ChAT	Kolin asetiltransferaz
CoLQ	Kollajen benzeri kuyruk
DEAE	Dietilaminoetil
DTNB	5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoic)acid
EC	Enzim Komisyonu
ER	Endoplazmik retikulum
ES	Esteratik bölge
GER	Granüllü endoplazmik retikulum
Glu	Glutamat
Gly	Glisin
GPI	Glikofosfoinozitol
His	Histidin
K _m	Michaelis Menten sabiti
NMR	Nükleer manyetik rezonans
OH	Hidroksi
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PAS	Periferal anyonik bağlanma bölgei
PDB	Protein data bankası
Phe	Fenilalanin

PRAD	Prolince zengin domain
PRİMA	Prolin bakımından zengin membran proteini
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ser	Serin
Trp	Triptofan
V _{max}	Maksimum hız
WAT	Triptofan amfifilik tetramerizasyon domain



ÖZET

Duranay, S. (2017). Midye (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) Hemolenfinden Asetilkolinesteraz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Asetilkolin aracılı sinir iletiminde asetilkolinesteraz enziminin rolü yoğun araştırma konusu olmaktadır. Bu çalışmada *Mytilus galloprovincialis*'den elde edilen hemolenf sıvısından amonyum sülfat çöktürme ve edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak AChE enzimi 13 kez ve % 3 verimle saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı denatürasyon ve indirgeme koşullarında yapılan SDS poliakrilamid jel elektroforezinde 51000 daltonluk olarak belirlendi. Yapılan çalışma sonucunda saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 3 U/mg protein olarak hesaplandı. Enzimin optimum pH'sının 7,5 olduğu belirlendi, en yüksek aktivitesini ise 35°C'de gösterdiği görüldü. Enzimin asetiltiyokolin iyodüre karşı gösterdiği Km (Michaelis sabitesi) değerinin ve en yüksek reaksiyon hızının sırasıyla 1,3 mM ve 0,188 mM/mg/dk olduğu bulundu. Bu çalışmada üç metoksiflavon bileşiğinin AChE'ı inhibe edici etkileri incelendi. IC₅₀ değerleri 0,033 ± 0,005, 0,019 ± 0,002 ve 0,016 ± 0,003 mg/ml olan hispidulin (4',5,7-trihidroksi-6-metoksiflavon), 5-hidroksi,6,7,8'4'-tetrametoksiflavon ve gnafalin (5,7-dihidroksi-3,8-dimetoksiflavon)'ın AChE'I güçlü inhibe edici etkiye sahip oldukları saptandı. Hispidulin, 5-hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon ve gnafalin'in Ki (inhibisyon sabiteleri) sırasıyla 3,6x10⁻², 10⁻² ve 9,4x10⁻³ mg/ml olarak bulundu. 5-hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon'un kompetitif, hispidulinin ve gnafalinin ise ankompetitif inhibitör olarak etki ettiği görüldü. 5-hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon geri dönüşümlü olarak AChE'ı inhibe ettiği için, klinik çalışmalarda potansiyel bir ilaç adayı olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: asetilkolinesteraz, *Mytilus galloprovincialis* Lam., enzim saflaştırma, kinetik özellikler.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21244

ABSTRACT

Duranay, S. (2017). Purification of Acetylcholinesterase from the Haemolymph of the Mollusc (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) and Investigation of its Kinetic Properties. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Master of Science Thesis, Istanbul.

The role of acetylcholinesterase in terminating acetylcholine-mediated neurotransmission made it the focus of intense research. In this study the haemolymph AChE from the mollusc *Mytilus galloprovincialis* was purified to homogeneity by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional precipitation and affinity chromatography on edrophonium-Sepharose 6B. The enzyme was purified approximately 13 fold over the crude extract and was obtained in 3 % yield. The molecule weight of the purified enzyme was calculated as 51000 dalton by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing and reducing conditions. The specific activity of purified enzyme was 3 U/mg protein. The purified enzyme had an optimum pH of 7.5 and showed optimal activity at 35°C. K_m (Michaelis constant) and V_{max} (maximum velocity of enzyme) for acetylthiocholine iodide were 1.3 mM and 0.188 mM/mg/min, respectively. The inhibition of purified AChE by three methoxyflavones was investigated. Hispidulin (4',5,7-trihydroxy-6-methoxyflavon), 5-hydroxy-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon and gnaphalin (5,7-dihydroxy-3,8-dimethoxyflavon) were found to have the strong inhibitory effect on AChE with IC_{50} values of $0,033 \pm 0,005$, $0,019 \pm 0,002$ and $0,016 \pm 0,003$ mg/ml, respectively. K_i (inhibition constant) for hispidulin, 5-OH,6,7,8'4'-tetrametoksiflavon and gnaphalin were found to be 3.6×10^{-2} , 10^{-2} ve 9.4×10^{-3} mg/ml, respectively. 5-hydroxy-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon was determined as competitive inhibitor, while hispidulin and gnaphalin were determined as uncompetitive inhibitors. It was concluded that 5-hydroxy-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon, which inhibited reversibly AChE might be use as potential drug for clinical use.

Keywords: acetylcholinesterase, *Mytilus galloprovincialis* Lam., enzyme purification, kinetic properties.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 21244

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Asetilkolinesteraz (AChE), bir nörotransmitter olan asetilkolini kolin ve asetata hidroliz ederek santral ve periferik sinir sisteminde kolinerjik nörotransmisyonunda görev alan bir enzimdir (Quinn, 1987). Son yıllarda, özellikle AChE enziminin saflaştırılmasında kullanılabilecek yeni metodların geliştirilmesi ve katalitik özelliklerinin incelenmesi, beyindeki biyolojik fonksiyonunun açıklık kazanması ile Alzheimer hastalığında kullanılabilecek daha etkin AChE inhibitörleri ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

Birçok kaynaktan izole edilen AChE'nin etki mekanizması ve 3-D yapı-fonksiyon ilişkisinin aydınlatılmıştır (Wiesner ve ark., 2007). Substrat analogları ve inhibitörlerle yapılan çalışmalar enzimin aktif merkezinin tanımlanmasını sağlamış, enzimin katalitik aktivitesini yok etmeden, doğal substrat spesifitesini değiştirmenin bir yolu olan bölgeye yönelik mutagenез ile amino asit dizilimlerinde mutasyonlar oluşturularak aktif merkezinin fonksiyonundaki kritik amino asitlerin önemi doğrulanmıştır (Sussman ve Silman, 1992; Greenblatt ve ark., 2003). Bu bilgiler veri bankalarında toplanmış ve yoğun olarak simülasyonla enzim modelleri geliştirilmiştir. Enzim yapısını belirlemek için protein data bankasından enzime ait üç-boyutlu yapı koordinatlarını, kristalografik ve NMR yapısal bilgilerini içeren doking (kenetlenme) programlarından yararlanılmıştır (Dvir ve ark., 2010). Yapılan doking işlemlerinde enzimin 3 boyutlu yapısından yola çıkılarak hedeflenen enzim aktif bölgesine ligandın bağlanma sırasındaki konformasyonu ve yönlenmesi tahmin edilmiştir. PDB (Worldwide Protein Data Bank) verilerine göre farklı organizmalardan bugüne kadar 69 AChE enziminin yapısı aydınlatılmış, bunların bazıları *Homo sapiens* (1B41, 1F8U), *Mus musculus* (1N5M, 1N5R, 1JO6, 1JO7), *Torpedo californica* (1EA5), *Electrophorus electricus* (1C2O) ve *Drosophila melanogaster* (1QO9)'dir. Yapı aydınlatma bilgileri, AChE'nin, etkin katalitik etkisinin anlaşılmasında, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaçların, ziraatta ise yeni pestisidlerin tasarımı ve organofosfat zehirlenmelerde terapötik yaklaşımın geliştirilmesinde önem taşımaktadır (Wiesner ve ark., 2007). X-ışınları kristalografisi veya çeşitli NMR teknikleri kullanılarak, enzimin reseptörleri ile etkileşimleri tanımlanmıştır (Sussman ve Silman, 1992).

Son zamanlarda bu tekniklere rekombinant DNA teknolojisi ile klonlama yöntemleri de eklenerek enzimin yapısının aydınlatılmasında kolaylık sağlanmıştır. Amino asitlerin belirlenmesinde yardımcı olabilecek mutasyon noktaları rekombinant DNA teknolojisi ile hedef proteinin amino asit bileşimi değiştirilerek de gerçekleştirilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisinde hücrelerde enzim sentezini sağlayan ve enzime özel mRNA'lar izole edilerek komplementer DNA'lar (cDNA) yapılmış ve enzim sentezi ile ilişkili gen kodlanarak enzim üretilmiştir (Pezzementi ve ark., 2011). İnsan AChE cDNA'sı adeno-İlgili virüs (Adeno-associated virus; AAV) vektörleri aracılığıyla farelerde üretilmiştir (Hrabovska ve ark., 2005).

Doğal ligandların ve ilaçların analogu veya ligand bağlanma bölgesi işaretleyicisi olarak görev yapan ve floresans özellik gösteren floresans problemler (PAS-spesifik ligand olan propidium ve p-N,N-dimetilamino benzen diazonyum florid (DDF) *Torpedo* AChE'nin substrat bağlama bölgesindeki belirli aromatik amino asitlerin varlığının tespitinde kullanılmıştır (Quinn, 1987; Sussman ve Silman, 1992; Dvir ve ark., 2010).

Asetilkolinesteraz enzimi rekombinant hücre kültürü teknikleri kullanılarak insan embriyonik böbrek hücrelerinden (HEK293), *Escherichia coli* ve bitkilerden eksprese edilmiştir (Küçükkılınç, 2014).

Antisens (gen susturumu, "knock down") teknoloji olarak bilinen yöntemde ise, antisens RNA molekülleri hedef genin mRNA'sına spesifik olarak bağlanarak genetik bilginin iletimi bloke edilmektedir. AChE geninin işleyişini saptamak için "knock-down" veya "knock-out" fare modelleri ile çalışılmıştır (Hrabovska ve ark., 2005). Alzheimer hastalığında kullanılan kolinesteraz inhibitörlerinin yerine antisens ajanlarının uygulaması yeni tedavi imkanları yaratabileceği düşünülmektedir (Soreq ve Seiman, 2001).

Asetilkolinesteraz enzimi birçok kaynaktan izole edilerek, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin araştırılmasına rağmen ticari veya bilimsel amaçlı kullanım ihtiyaçlarını karşılayabilecek daha iyi enzim kaynaklarının bulunması, saflaştırılma yöntemlerinin geliştirilmesi ve Alzheimer hastalığı, Myasthenia gravis ve akut glokom tedavisinde, organofosfat ve karbamat pestisidlerin yol açtığı zehirlenmelerde kullanılabilecek daha etkin AChE inhibitörlerinin keşfedilmesi yönünde çalışmalar devam etmektedir.

Deniz ekosistemi potansiyel n tras tik ve farmasötik aktiviteye sahip olan doğal ürünlerinin zengin bir kaynağıdır (Grienke ve ark., 2014). Son yıllarda deniz organizmalarının biyoteknolojik kullanımına yönelik çalışmalar önem kazanmış ve birçok çalışmaya konu olmuştur. Deniz organizmalarından elde edilen biyoaktif bileşiklerin anti-bakteriyel, anti-inflammatuar ve anti-tümoral gibi etkilerinin olması tüm dünyada deniz organizmalarının potansiyel alternatif ilaç kaynağı olarak araştırılmasına neden olmaktadır (Schumacher ve ark., 2011; Grienke ve ark., 2014).

Deniz ekosistemin bir parçası olarak bulunan midyeler çevresel kirlilik ve ani değişimlerde “biyomonitör” olarak kullanılmaları ve enzim çalışmalarında alternatif kaynak oluşturmaları açısından önemlidir (Taleb ve ark., 2007). Özellikle midyenin sindirim sistemi ve karaciğer enzimlerinin saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesiyle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Yalvaç ve Kuşçu, 1993; Ataç ve ark., 1994;  zsoy ve Berkkan, 1997; Somar ve ark., 2000; Can ve ark., 2000). Midyeler doğal AChE inhibitörü kaynağı olarak da bildirilmiştir (Abramson ve ark., 1989).

Bu tez kapsamında, *Mytilus galloprovincialis* Lam. hemolenfinden AChE enziminin ileri derecede saflaştırılarak enzimin kinetik özellikleri ile bazı metoksiflavonların enzim üzerindeki inhibitör etkilerinin incelenmesi ve Alzheimer tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaçların geliştirilmesine katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Asetilkolinesterazın Tarihçesi ve Özellikleri

İlk kez 1914 yılında İngiliz bilim adamı Henry Hallet Dale asetilkolinin otonom gangliyonlarda kimyasal iletimde görev aldığını ileri sürmüştür (Massoulié ve ark., 1993). 1926 yılında ise Loewi ve Navratil adlı bilim adamları kurbağa kalpleri üzerinde yaptıkları deneyler sonucunda, kolinesteraz enziminin fizostigmin (eserin) tarafından inhibe edildiğinde asetilkolin etkisinin daha uzun sürdüğünü görmüşler ve asetilkolin enziminin varlığını doğrulamışlardır. Bu keşif bilim adamlarına 1936 yılında Nobel ödülü kazandırmıştır (Zimmer, 2006). 1932 yılında at serumundan elde edilen ve asetilkolinin hidrolizini gerçekleştirebilme özelliğine sahip enzime “kolinesteraz” adı verilmiştir (Stedman ve Easson, 1932). 1937 yılında Marnay ve Nachmansohn *Electrophorus* ve *Torpedo* elektrik balığının elektrik organlarında ve nöromusküler kavşağında asetilkolinesterazın yüksek konsantrasyonda bulunduğunu gözlemişlerdir (Massoulié ve ark., 1993). 1940 yılında insan serumunda bulunan kolinesteraz ve insan kırmızı kan hücrelerinde bulunan kolinesteraz olmak üzere iki farklı insan kolinesteraz enzimi keşfedilmiştir (Alles ve Hawes, 1940). 1949 yılında Augustinsson ve Nachmansohn "asetilkolinesteraz" terimini asetilkolini diğer kolin esterlerinden daha hızlı hidroliz edebilen esteraz olarak tanımlamışlardır. 1964 yılında Enzim Komisyonu tarafından "gerçek" ve "spesifik" kolinesteraz olarak asetilkolin asetilhidrolaz (E.C.3.1.1.7), diğer kolinesterazlar için ise "pseudo" asetilkolin asetilhidrolazlar (E.C.3.1.1.8) adlarının kullanılması kabul edilmiştir.

Her iki tip enzim farklı substrat spesifisiteleri ve inhibitörlere karşı olan duyarlılıkları bakımından birbirinden ayırtedilebilmektedir (Chatonnet ve Lockridge, 1989; Chen ve ark., 2011).

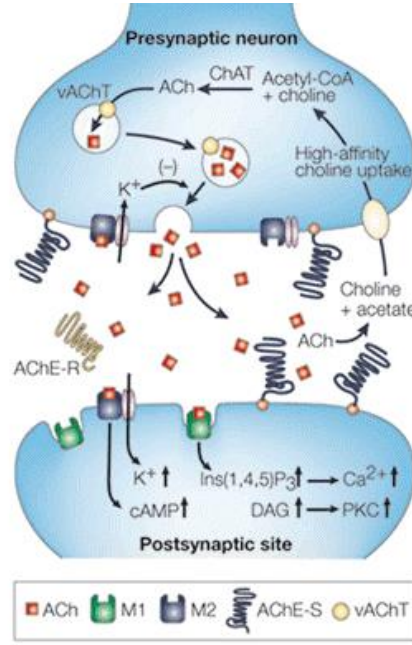
Sistemik adı asetilkolin asetilhidrolaz olan asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) sinir ve kas dokusunda ve kırmızı kan hücre membranında bulunmaktadır (Massoulié ve ark., 1993; Čolović ve ark., 2013).

Sistemik adı açilkolin açilhidrolaz ve diğer adları psödokolinesteraz, plazma kolinesteraz olan butirilkolinesteraz (BChE, EC 3.1.1.8) özellikle karaciğerde bulunmaktadır (Massoulié ve ark., 1993; Čolović ve ark., 2013).

2.2. Asetilkolinesterazların Fizyolojik Önemi

2.2.1. Asetilkolinesterazın Fizyolojik Fonksiyonu (Kolinergik İleti)

Asetilkolin (ACh) presinaptik nöronun akson ucunda kolin ve asetil-koenzim A'dan katalitik bir enzim olan kolin asetiltransferaz (ChAT) aracılığıyla sentez edilmektedir. Asetil-koenzim A, sinir uçlarında bol miktarda bulunan mitokondrilerde yapılmaktadır. Kolin ise ekstraselüler sıvıdan nöron terminaline sodyuma bağımlı bir membran taşıyıcısı tarafından alınmaktadır (kolin uptake'i). Asetilkolin, sentez edildikten sonra bir taşıyıcı vasıtasıyla (vAChT) sitoplazmadan vezikül içine taşınmaktadır. Asetilkolin molekülleri paketlenerek veziküllerde depolanmaktadır (her vezikülde 1 000 – 50 000 molekül vardır). Aksiyon potansiyeli nöron membranında bir depolarizasyon dalgası şeklinde yayılarak nöron terminal ucuna ulaşınca kalsiyum iyonlarının hücre içine girişi artmaktadır. Vezikül membranı ile sinir ucu membranının füzyonu sonucunda asetilkolin ekzositozla sinaptik aralığa boşalmaktadır. Sinaps aralığına salıverilen asetilkolin presinaptik veya postsinaptik membran üzerinde bulunan muskarinik reseptörler ile etkileşmektedir. M1 reseptörleri ön beyinde özellikle hipokampus ve serebral korteksde, M2 reseptörleri ise kalp ve beyin kökünde dağılım göstermektedir. Muskarinik reseptörler diğer G protein kenetli reseptörler gibi protoonkogen p21 ras, mitojenle aktive olan kinaz (MAPK) ve stresle aktive olan kinaz (SAPK) yollarını uyararak hücre büyüme, çoğalma ve farklılaşmasını düzenlemektedir. Sinaps aralığındaki asetilkolin molekülleri, burada bulunan asetilkolinesteraz tarafından hızla kolin ve asetata parçalanmakta ve böylece nörotransmitterin etkisi sona erdirilmektedir. Kolin sinir ucu tarafından asetilkolin yapımında kullanılmak üzere geri alınırken, asetat ise çevredeki kapillerler yoluyla kana difüze olmaktadır. Kolinergik sinapsların çoğu asetilkolinesteraz bakımından zengindir; bu nedenle sinapta asetilkolinin yarı ömrü çok kısadır (Soreq ve Seidman, 2001). AChE'nin kolinergik sinir iletimdeki rolü şematik olarak Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: AChE'nin kolinerjik sinir iletimdeki rolü (Soreq ve Seidman, 1992).

Asetilkolinesteraz çok yüksek spesifik katalitik aktivite göstermektedir. Her bir AChE molekülü difüzyon kontrollü reksiyonların hızına ulaşarak saniyede 25 000 kolin molekülünü parçalamaktadır (Čolović ve ark., 2013).

2.2.2. AChE'nin Diğer Etkileri

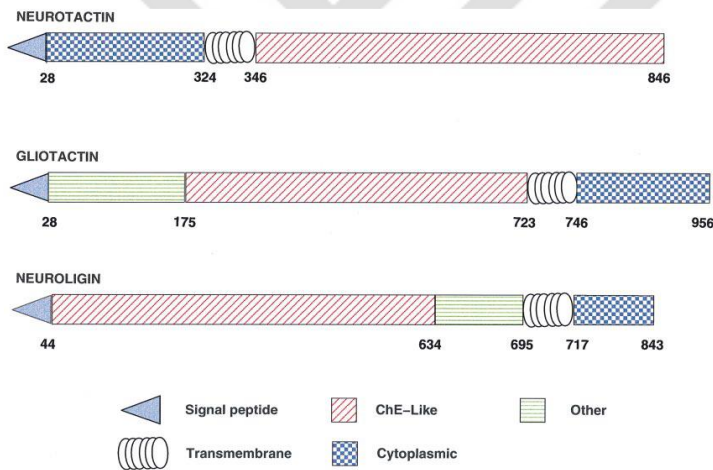
Kolinerjik sinapslardaki nörotransmisyonu sonlandırma etkisinin dışında, kolinerjik sinirlerle inerve edilmeyen dokularda da AChE enziminin bulunması, enzimin kolinerjik olmayan etkilere de sahip olduğunu göstermektedir (Soreq ve Seidman, 2001; Zhang ve ark., 2002; Johnson ve Moore, 2006).

2.2.2.1. Nörogenез

AChE geninin transfeksiyonu ile AChE ekspresyonu veya RNAi transfeksiyonu ile antisens mRNA'nın gen ekspresyonu, nöroblastoma hücrelerinde, feokromositom (PC12) hücrelerinde ve birincil dorsal kök ganglion nöronlarında nöritojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Soreq ve Seidman, 2001). *Xenopus* embriyonik motor nöronlarına aktarılan insan AChE-S'nin, nöritik büyümeyi arttırdığı gözlenmiştir (Sternfeld ve ark.,1998).

2.2.2.2. Hücre Adezyonu

AChE enzimi ile hücre adezyon moleküllerinin yapısında homolog dizilerin bulunması AChE'nin hücre adezyon molekülü olarak fonksiyon gösterebileceğini düşündürmüştür (Johnson ve Moore, 2006). Kolinesteraz ailesi, *Drosophila*'daki neurotactin ve glutactin, omurgalılarıdaki gliotactin ve neuroligin gibi hücre adezyon molekülleri özelliklerine sahip proteinleri de içermektedir (Şekil 2.2) (Johnson ve Moore, 2006). Bu moleküllerin katalitik olarak inaktif oldukları, fakat asetilkolinesterazın dizileri ile yüksek benzerlik gösterdikleri ve protein-protein etkileşiminde görev aldıkları bildirilmiştir (Paraoanu ve Layer, 2008). Bu ailenin bütün üyelerinde AChE benzeri bölgeleri ekstrasellüler alanda bulunur ve diğer ekstrasellüler ligandlara bağlanarak hücre bağlantılarının oluşumuna katkıda bulunabilirler.

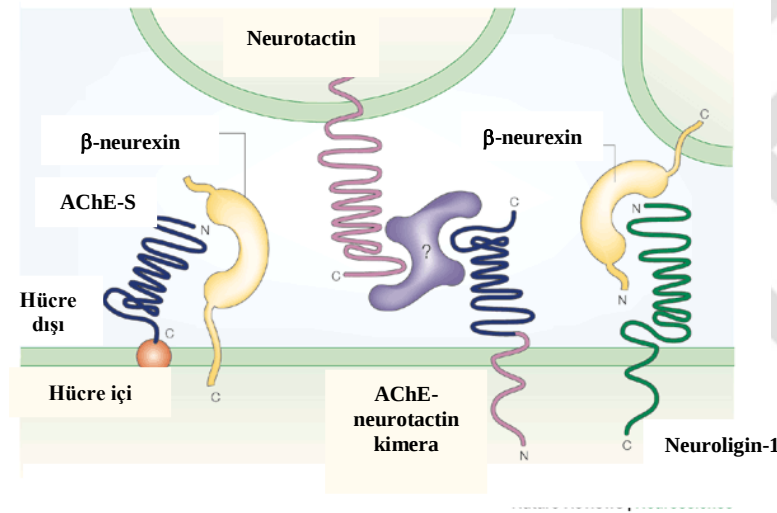


Şekil 2.2: Gliotactin, neuroligin ve neurotactin'in şematik yapısı (Botti ve ark., 1998).

Nöronal hücreler ile fibroblast ve astrosit hücrelerinde de AChE'nin morfolojik düzenleyici görevi olabileceği ileri sürülmüştür. AChE, amiloid prekürsör protein (APP) ve perlikan ile kompleks oluşturarak adherent hücrelerinin polarize göçü ve osteoblast adhezyonunda da görev alabileceği bildirilmiştir. AChE'nin adezyon özelliklerini belirleyen bölgenin bloke edilmesi osteoblastik hücre adezyonunun doza-bağılı olarak azalmaya neden olabileceğini, kemikte hücre-matriks etkileşimini düzenleyebileceği de ileri sürülmüştür (Paraoanu ve Layer, 2008).

2.2.2.3. Sinaptogenez (Sinaps Yapımı)

Yapısında ekstraselüler AChE'a homolog domain (bölge) ve C-terminal sitozolik kuyruğu olan, fakat katalitik etkisi olmayan bir transmembran proteini olan nöroligin'in de sinaptogenik aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Nöronal olmayan hücrelerde eksprese edilen nöroliginin sinaptik veziküllerin kümelenmesini ve komşu aksonlardaki presinaptik diferansasyonu uyardığını bildirilmiştir. AChE'ı da bağlayan, nöroligin'in yüzey hücre reseptörü olan nöroksinin ekstraselüler domaininin ilave edilmesi ile bu olay önlenebilmektedir (Soreq ve Seidman, 2001).



Şekil 2.3: AChE'in yapısal homologları (Soreq ve Seidman, 2001).

AChE, yapısal homologları ile yarışarak nörondaki morfolojik sinyalin iletilmesine veya kesilmesine neden olur.

2.2.2.4. Dopamin Nöronların Aktivasyonu

Holmes ve ark. (1997), saflaştırılmış rekombinant AChE'in dopamin nöronlarından dopamin salgılanmasını uyardığını göstermişlerdir.

2.2.2.5. Sinir Hücresi Rejenerasyonu

Srivastan ve Peretz (1997), Aplysia midye türünün hemolenf AChE'in nörotrofik faktörü olduğu ileri sürmüşlerdir.

2.2.2.6. Apoptozun Düzenlenmesi

Yang ve ark. (2002), apoptotik nöroblastoma hücrelerinde AChE ekspresyonunun arttığını gözlemişler, AChE'nin apoptotik hücre ölümünde önemli rolü olabileceğini ve Alzheimer hastalığının tedavisi ve önlenmesinde AChE'a karşı antisens geliştirilme olasılığını gündeme getirmişlerdir. Zhang ve ark. (2002), AChE ekspresyonunun antisens ile bloke edilerek apoptozun inhibe edildiğini hücre kültüründe göstermişlerdir.

2.2.2.7. Hematopoez

Soreq ve ark. (1994), AChE'nin eritropoez ve megakaryositopoezdeki multipotent stem hücrelerinin proliferasyonunu ve makrofaj üretimini inhibe ettiğini ve apoptozu uyardığını gözlemlemişlerdir. Bu bulgular, AChE gen ekspresyonundaki artışlar ile lösemi arasındaki tümörojenik bağlantıyı açıklayabilmektedir.

2.2.2.8. Lenfosit Aktivasyonu

Sitokinler tarafından düzenlenen immün fonksiyon, aynı zamanda lenfoid kolinerjik sisteminin kontrolü altındadır (Kawashima ve Fujii, 2000).

2.3. AChE'nin Alternatif Splicing'i ve Post Translasyonel Modifikasyonları

Asetilkolinesterazın, hücre dışındaki bir nörotransmitter olan asetilkolini hidrolize edebilmesi için hücre membranının dış kısmına yerleşmesi veya hücre dışına salgılanması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar hücreden salgılanacak olan proteinlerin, granüllü endoplazmik retikulum (GER) → Golgi sistemi → salgı vezikülleri → hücre dışı şeklinde bir yol izlediğini göstermişlerdir (Massoulié ve ark., 1999).

Primer transkript adını alan yeni sentezlenmiş mRNA moleküllerin çoğu olgun yapı ve fonksiyonlarına ulaşmak için transkripsiyon sonrası modifikasyonlara uğramaktadırlar. Endoplazmik retikuluma yönlendirilecek olan proteine ait mRNA sitozolde serbest ribozoma bağlanmakta ve amino ucunda sinyal dizisi adı verilen bir peptid sentezlendiğinde, ER lümeninde bulunan sinyal peptidaz tarafından uzaklaştırıldıktan sonra olgun proteine dönüşmektedir. N-terminal sinyal peptid uzaklaştırıldıktan sonra olgun AChE proteini yaklaşık 500 amino asit kalıntısından oluşan katalitik merkezi ile küçük C-terminal bölgesinden oluşmaktadır. C-terminal bölgelerini kodlayan farklı eksonların varlığı ve dolayısıyla bunların alternatif splicing

olaylarının sonucunda farklı moleküler formlarının oluşumuna yol açmaktadır (Massoulié ve ark., 1999).

Omurgalılarda asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tek bir gen (ache) tarafından kodlanmaktadır. Farklı hayvan türlerinde ve farklı dokularda korunmuş olan değişmeyen katalitik bölgeyi (domain), değişebilen C peptid bölgeleri takip etmektedir. C-terminal bölgenin yapısı enzimin katalitik aktivitesini etkilememektedir, fakat glikozilasyon, glikofosfatidil aracılığı ile membrana tutunmaları, diğer yapısal proteinler ve membran lipidleri ile etkileşimleri, enzim proteinin katlanması ve fonksiyonel olarak aktif hale gelmesi gibi posttranslasyonel modifikasyonlar için çok büyük önem taşımaktadırlar (Nalivaeva ve Turner, 2001).

Translasyon sonrası GER lümeninde proteinin katlanması, disülfid bağlarının oluşumu, protein glikozilasyonun ilk basamakları ve membran proteinine glikolipitlerin eklenmesi gibi işlemler ER lümeninde bulunan enzimler ile gerçekleşmektedir (Nalivaeva ve Turner, 2001). Kuaterner yapıları ve tutunma (anchoring) şekilleri farklı olan birçok moleküler form tek kolinesteraz geninin alternatif splicing ve post-translasyonel olgunlaşma yolu ile oluşabilmektedir.

2.3.1. AChE'in Moleküler Formları

AChE'in moleküler formları üç işlem sonucunda meydana gelmektedir:

- 1- AChE geninin alternatif splicing'i
- 2- Katalitik altbirimlerinin oligomerizasyonu
- 3- Katalitik olmayan altbirimlerinin bağlanması

AChE'lar, kuaterner yapılarına göre asimetrik (A) ve globular (G) olmak üzere iki formda bulunmaktadır. Bu formların katalitik merkezi aynı, C-terminal peptidleri farklıdır.

Bulundukları yere göre ise; plazmada çözünen formu, kırmızı kan hücrelerinin yüzeyinde GPI (glikofosfoinozitol) çapası ile membrana bağlı formu, nöromusküler kavşakta kollajen kuyruklu formu ve beyinde hidrofobik kuyruklu formu bulunmaktadır (Nalivaeva ve Turner, 2001).

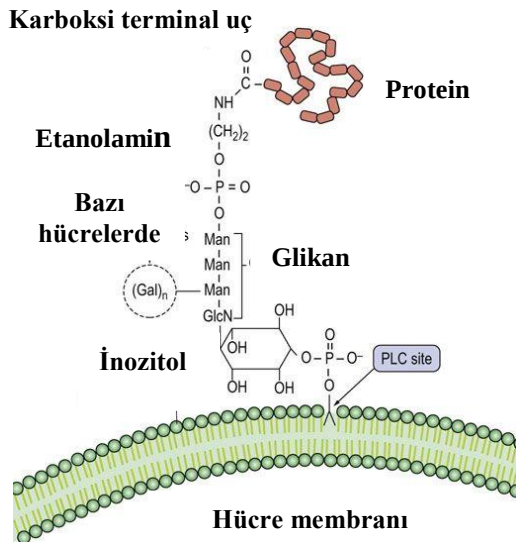
2.3.1.1. AChE_R: R 'Readthrough' Formu

Katalitik bölgeyi kodlayan eksondan sonra 3' ucu splicingi gerçekleşmemektedir. Bu formun nörokoruyucu etki sağladığı düşünülmektedir. R transkriptleri serbest monomer yapısında ve sinaptik boşlukta çözünmüş halde bulunmuştur (Massoulie ve ark., 1999, 2002).

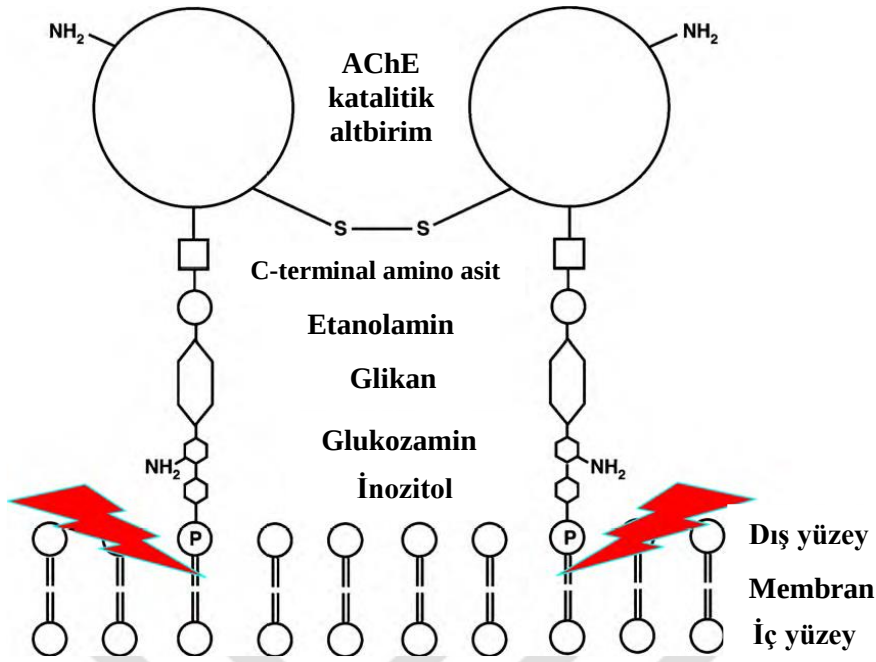
2.3.1.2. AChE_H: H 'Hidrofobik' Formu

Kırmızı kan hücrelerinde ifade edilmektedir (Chen ve ark., 2011). H transkriptlerinin altbirimleri C-terminal bölgelerinde hidrofobik diziler içermektedir. Bu hidrofobik bölgelerdeki iki sistein kalıntısının disülfid bağı ile bağlanmaları sonucunda dimerik olgun protein oluşabilmektedir. Hidrofobik bölgesi, glikofosfatidilinozitol (GPI)'e bağlanmak için bir sinyal içermektedir (Massoulié ve ark., 1999, 2002), bu nedenle bu formlar hücre yüzeyinde bulunmaktadır. H peptidleri omurgasız türlerde bulunmuştur (Chen ve ark., 2011).

Torpedo AChE'in en büyük kısmı plazma membranına GPI çapası (Şekil 2.4) ile her monomerin C-terminaline kovalent olarak bağlanmaktadır. Dimerler, PI (fosfoinozitol)'ye özgü bakteri *fosfolipaz C* tarafından seçici olarak çözünabilmektedir (Şekil 2.5) (Dvir ve ark., 2010).

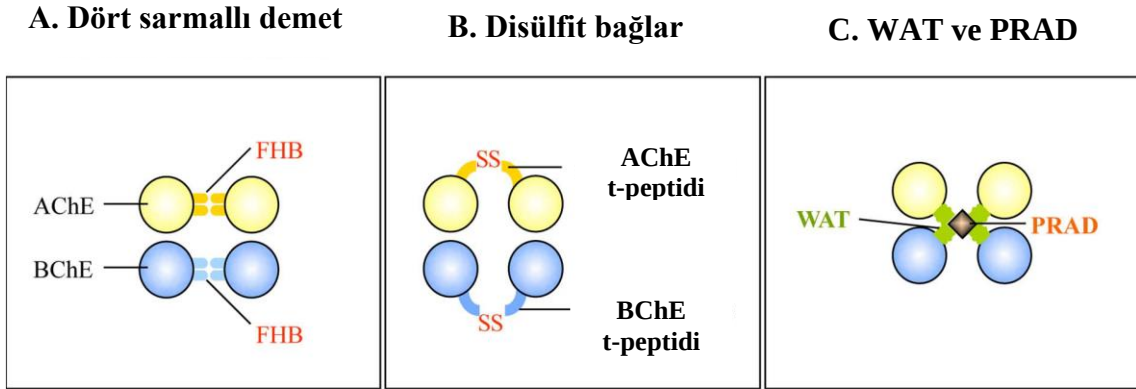


Şekil 2.4: AChE'in plazma membranına bağlanmasında GPI çapasının yapısı (<http://doctorlib.info/medical/biochemistry/30.html>).



Şekil 2.5: Torpedo GPI çapasına bağlı AChE dimerinin şematik yapısı (Dvir ve ark., 2010).

Torpedo AChE dimerlerinin X-kristalografi ile incelenmesi sonucunda, iki AChE_H'ın iki altbirimi arasındaki temas alanında, her bir altbiriminin katalitik bölgesinden ikişer α -heliksin katıldığı “dört sarmallı demet (four-helix bundle)” (FHB)’nin oluştuğu görülmüştür (Şekil 2.6) (Chen ve ark., 2011). Bu motif, RNA-bağlayan Rop proteininde olduğu gibi homodimerlerin birleşme noktasında veya *Rhodopseudomonas viridis* bakterinin fotosentetik reaksiyon merkezinin L ve M alt birimlerinin arasında olduğu gibi benzer yapılar arasında görülmektedir (Sussman ve Silman, 1992).



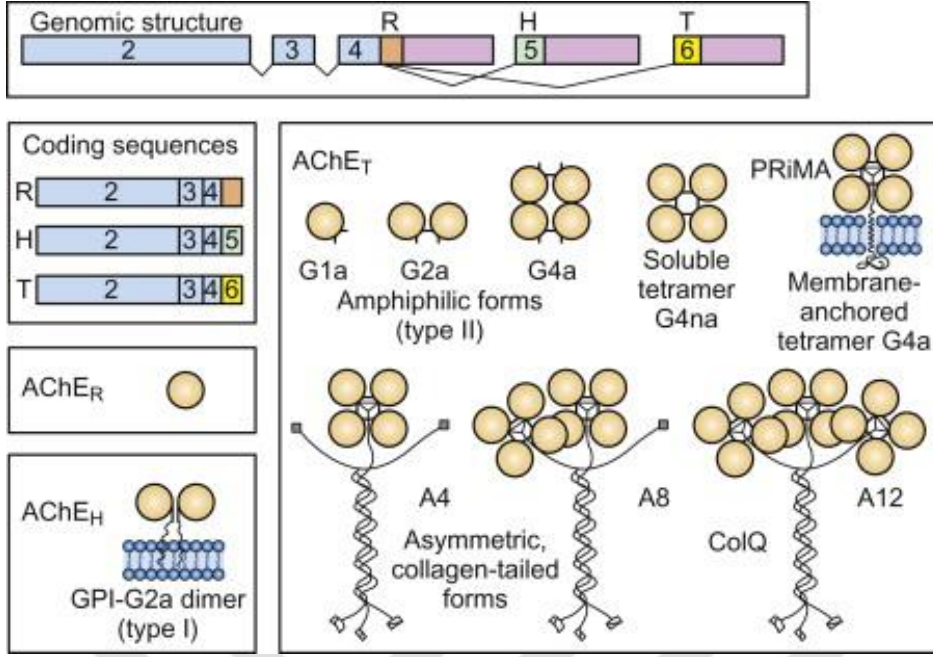
Şekil 2.6: AChE ve BChE’ların oligomerizasyon şekilleri (Chen ve ark., 2011).

- (A) AChE_T veya BChE_T ‘ın FHB bölgeleri dimer oluşumunu yönlendirmektedir
 (B) AChE_T veya BChE_T’lerin t peptidleri interkatener disülfid bağlar oluştururlar
 (C) AChE ve BChE’deki WAT bölgelerinin PRiMA veya CoIQ’deki PRAD ile etkileşimleri

2.3.1.3. AChE_T: T ‘Tailed’ (Kuyruklu) Formu

Altbirimlerinin C-terminal bölgeleri kollajen kuyruklu ve hidrofobik kuyruklu moleküller ile birleşmeleri için gereklidir. C-terminal bölge veya T peptid, C-terminale yakın sistein kalıntısı ve birçok korunmuş aromatik kalıntısı içermektedir. Bu peptid olgun proteinde kısmi olarak korunarak hidrofobik özellik ve birçok kuaterner yapının kazanmasına yol açmaktadır.

Enzimin homomerik ve heteromerik formları bulunmaktadır. Homomerik formlar monomer, dimer ve tetramer formlarını kapsamaktadır. Monomer ve dimer formlar amfifilik (G1a, G2a)’tir, tetramerik formlar ise hem amfifilik (G4a) hem de non-amfifilik olabilmektedir (G4na). Heteromerik formlar ise hem kollajen kuyruklu (A formları: A4, A8 ve A12), hem de hidrofobik-kuyruklu (G4a formu) olabilmektedir. (Şekil 2.7) (Nalivaeva ve Turner, 2001).



Şekil 2.7: İnsan beynindeki AChE geninin yapısı ve alternative mRNA splicing sonucunda oluşan moleküler formları (Massoulé ve ark., 2002).

Kuyruklu formlar, nöromusküler kavşağın bazal laminasına veya hücre membranına bağlanmasını sağlayan çapa (anchor) proteinleri ile katalitik tetramerler oluştururlar. Translasyon sonucunda oluşan ilk ürün G1 formu'dur, G2, G4 gibi daha kompleks formlar G1 formundan türerler. Oluşum sırası G1>G2>G4>A12 şeklindedir.

AChE'in asimetrik formu (A4, A8 ve A12), bir veya üç katalitik tetramerin farklı gen tarafından kodlanan kollajen benzeri kuyruğa (ColQ) bağlanmaktadır. Kollajen ColQ'nin üçlü sarmalı, üç aynı polipeptid zincirinden oluşan bir homotrimer'dir.

Polipeptidlerin N-terminal bölgelerinde bulunan prolinden-zengin domain (PRAD) aracılığı ile AChE'in katalitik altbirimlerinden oluşan tetramere bağlanmaktadır. AChE'in asimetrik formları omurgalıların nöromusküler kavşağında yoğun olarak bulunmaktadır ve kollajen kuyruğu katalitik tetramerin sinaptik bazal laminaya bağlanmasını sağlamaktadır (Nalivaeva ve Turner, 2001).

2.3.1.3.1. PRiMA'ya Bağlı AChE'in Globular Formları

Xenopus oocitleri, COS-7, nöroblastoma ve kas hücrelerinde PRiMA'nın ekspresyonu AChE'in globular formunun oluşumunda, hedef hücrelere yönlendirilmesinde ve membrana yerleşmesinde sınırlayıcı faktör olarak belirlenmiştir. PRiMA'nın yokluğunda AChE'in G4 formu oluşmamaktadır (Chen ve ark., 2011). PRiMA ile kompleks oluşturan AChE_T ise beyinde ve kasta bulunan tetramerik globular formlarını temsil etmektedir.

2.3.1.3.2. CoLQ (Kollajen Benzeri Kuyruğu)'e Bağlı AChE'in Asimetrik Formları

Kollajen benzeri kuyruk, üç kollajen Q altbiriminin üçlü sarmal şeklinde birleşmeleri sonucunda oluşmaktadır. AChE'in kollajen kuyruklu formları sadece omurgalılarda bulunmuştur, omurgasızlarda bulunmamaktadır. CoLQ ile kompleks oluşturmuş AChE_T kasta bulunan asimetrik formlarını (A12) temsil etmektedir.

Ayrıca karışık kolinesterazlar, CoLQ (kollajen Q) veya PRiMA'ya bağlı ve AChE ve BChE homodimerleri içeren AChE–BChE A12 hibrid enzimi de bildirilmiştir (Chen ve ark., 2011).

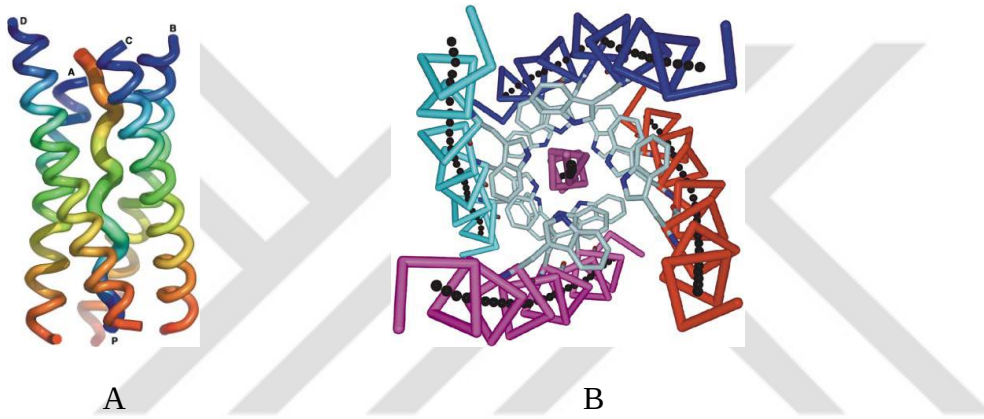
2.3.1.3.3. T Peptidin Hidrofobik Özelliği. Dimer ve Tetramerlerin Oluşumu

T peptidler sulu çözeltilerde, özellikle deterjan veya lipid misellerin varlığında α -heliks konformasyonunda bulunurlar. Korunmuş aromatik yan zincirler amfifilik α -heliksin bir tarafında yoğunlaşmışlardır (Massoulié ve ark., 1999).

AChE'lerin sentezinde, özellikle protein katlanmasında ve hücre dışına taşınmasında T peptidlerin büyük önem taşıdıkları bildirilmiştir. T peptidlerde aromatik kalıntıların varlığı yeni sentezlenen AChE_T polipeptidlerinin aktif konformasyonunu alamamasına sebep olmaktadır. Katlanma doğru olarak tamamlanmazsa, prolinden zengin bağlanma domaini (proline-rich attachment domain; PRAD)-içeren bağlanma proteinleri, T peptid tarafından ERAD “ER-associated degradation”a yönlendirilmektedir ve hatalı bir protein olarak kabul edilmiş bu proteinin sitoplazmaya taşınması ve burada übikitinle etiketlenerek, proteozomda parçalanmasına yol açmaktadır (Chen ve ark., 2011).

T peptidlerin en önemli görevi AChE_T tetramerlerinin oluşmalarını veya CoLQ ve PRiMA gibi yapısal proteinlere bağlanmalarını yönetmeleridir. T peptide triptofan

(W) amfililik tetramerizasyon domain'i (WAT) adı da verilmektedir. AChE_T'nin katalitik altbirimlerinin yapısal proteinlere bağlanması T peptiddeki WAT domainlerin ColQ ve PRiMA'daki PRAD ile etkileşimine bağlıdır. Sentetik T peptid ve PRAD peptid'in oluşturdukları kompleksinin [WAT]₄PRAD kristalografik analizleri, dört paralel WAT α -sarmal bir antiparalel PRAD sarmalın etrafına sarılmış sarmal (coiled coil) şeklinde dolanarak sol el poliprolin II sarmal oluşturmaktadır (Şekil 2.8) (Chen ve ark., 2011). AChE_T oligomerizasyonu ve etki edeceği yeri kollajen kuyruğu (ColQ) veya prolin bakımından zengin membran proteini (PRiMA) ile bağlanmalarına bağlıdır.



Şekil 2.8: [WAT]₄PRAD kristal yapı diagramı (Dvir ve ark., 2004).

A: Tek PRAD heliksin (antiparalel) etrafına dört WAT heliksi dolanmıştır (paralel). Her zincirin N-ucu: mavi; C-ucu: kırmızı ile gösterilmiştir. B: [WAT]₄PRAD kristal yapının yukarıdan bakılarak sarılmış sarmal (coiled coil) görünümü (dört WAT mavi, kırmızı, gri ve kahve rengi, PRAD ise mor gösterilmiştir).

2.3.1.4. AChEs: S 'Soluble' Formu

Çözünen monomerik formu Elapid (Bungarus, Naja, etc.) yılanların zehirinde bulunmuştur. *Bungarus fasciatus* AChE'nin yapısı aydınlatılmıştır. Bu gen H eksonu içermemektedir, yılan kasında eksprese olan T ekson ve venom enziminin C-terminal bölgesini kodlayan S ekson içermektedir. Çözünen monomerik formlarında bulunmaktadır (Massoulié ve ark., 2005).

2.3.2. N-Glikozilasyon

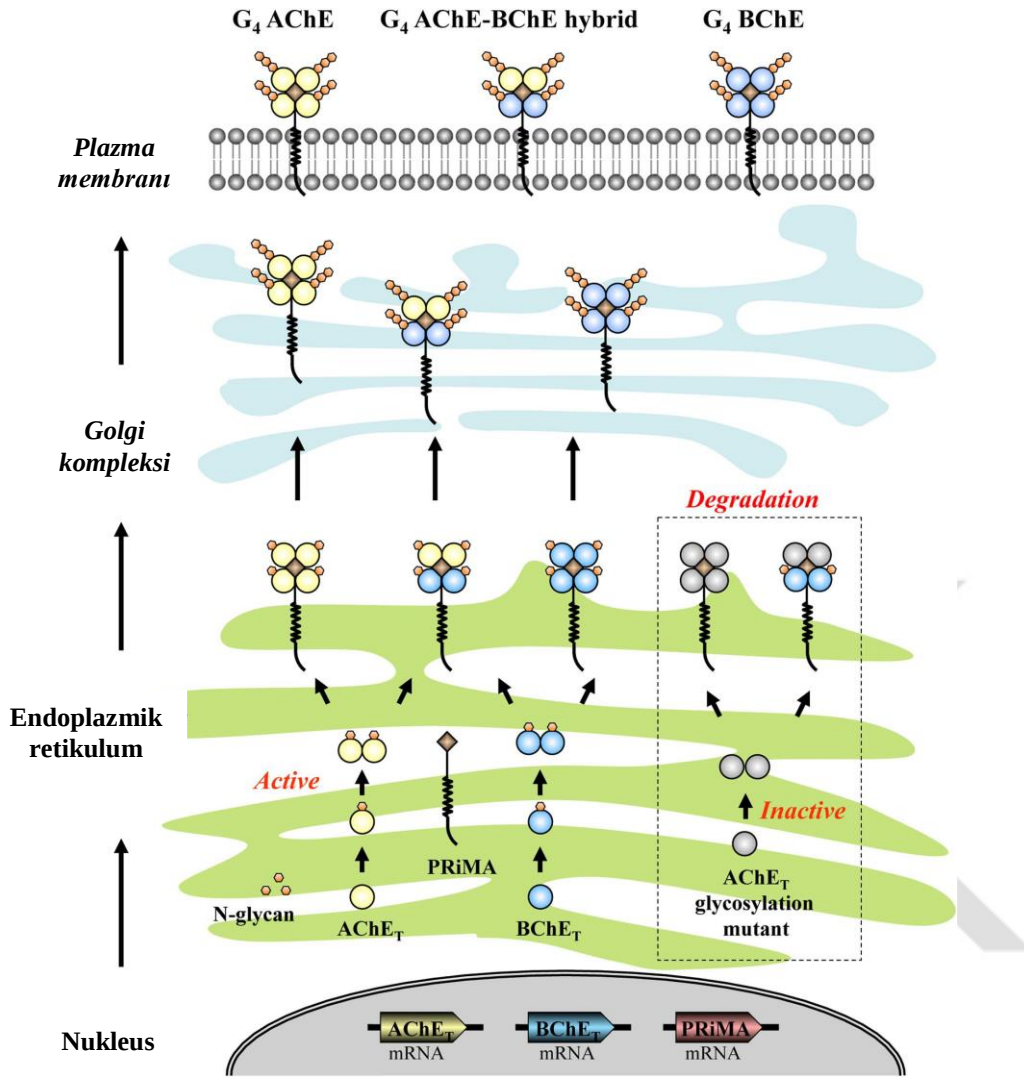
Endoplazmik retikulum membranı ve lümeninde gerçekleşen glikozilasyon, bir proteinin çözünürlüğünü ve dayanıklılığını değiştirmekte, proteinin değişik organel

veya bölümlere yönlendirilmesinde tanıma sinyali olarak işlev görmektedir. Sentezlenen çekirdek oligosakkarid, ER membranının lümeninde bulunan oligosakkarid transferaz tarafından sentezlenmekte olan bir proteindeki uygun asparaginin amid azotuna (N-glikozidik bağlanma) aktarılmaktadır. AChE, çekirdek proteinlerine bağlanan çok sayıda karbohidrat kalıntısı içermektedir. İnsan AChE_T monomeri üç tane N-glikozidik bağlanma yeri içermektedir. Bunlar yüksek derecede korunmuştur ve AChE için çok büyük fizyolojik öneme sahiptirler (Nalivaeva ve Turner, 2001). Golgi aygıtında proteinler hücre membranının belirli bir bölgesine veya salgılanma keseciklerine yönlendirilmektedir.

AChE_T glikozilasyonu sadece protein katlanmasını ve membran trafiğini etkilemektedir, yapısını etkilememektedir. N-glikozilasyon gerçekleşmediği zaman AChE_T katlanması bozulmaktadır ve bu olay enzim aktivitesinin azalmasına yol açmaktadır. Glikozilasyon gerçekleşmez ise, AChE_T polipeptidleri doğru katlanamayacaklar ve aktivite gösteremeyeceklerdir. Glikolize olmayan ve inaktif AChE_T molekülleri PRiMA'ya bağlı G4 oluşturabilirler, fakat Golgi sistemine gönderilemezler ve muhtemelen parçalanırlar (Chen ve ark., 2011).

AChE'nin glikozilasyonu özellikle beynin normal olarak çalışması için önem taşımaktadır. Moleküler formlar, glikozilasyonların bozulması sonucunda Alzheimer hastalarının beyininde ve serebrospinal sıvılarında birikmektedirler (Nalivaeva ve Turner, 2001).

ER'da AChE_T polipeptidlerin N-glikozilasyonu translasyonla eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir. Glikozillenmiş AChE_T spontan olarak birleşerek homodimerler oluşmaktadır. Homodimerler PRiMA'ya bağlanırlar ve ER'da PRiMA'ya bağlı G4 AChE oluşmaktadır. PRiMA, G4 kompleksini Golgi sistemine yönlendirmektedir ve daha ileri derecede glikozillenmektedir (Şekil 2.9).

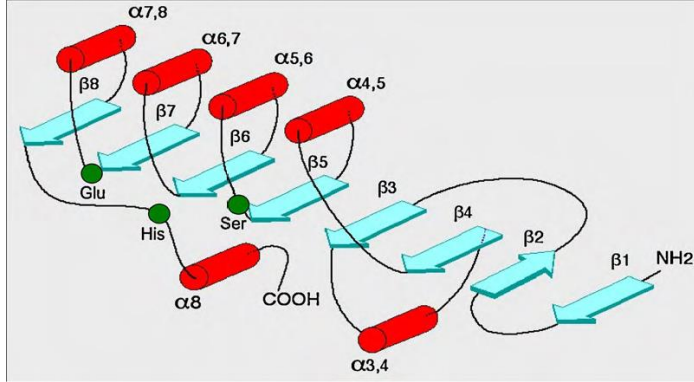


Şekil 2.9: AChE'nin ER ve Golgi aygıtında işlenmesi (Chen ve ark., 2011).

2.4. AChE'nin Üç Boyutlu (3D) Yapısı

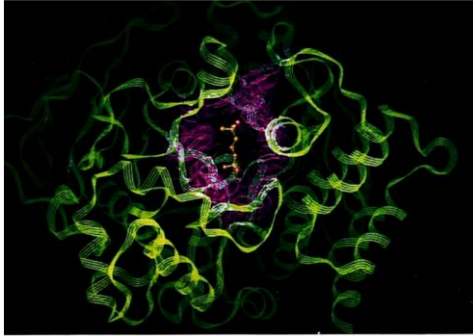
AChE paralel β -tabakalarının α -helikslerle çevrelenerek oluşturulduğu α/β hidrolaz katlanması gösteren enzim ailesine ait bir enzimdir (Şekil 2.10) (Sussman ve Silman, 1992; Greenblatt ve ark., 2003). Farklı primer yapı, substrat spesifitesi ve fiziksel özelliklere sahip olan bu enzimlerin tek ortak özelliği birbirine 14 alfa sarmal ile bağlı 12 beta tabakadan oluşan α -heliks/ β -kırmalı tabaka yapısında olmalarıdır. α -heliks/ β -kırmalı tabaka yapıları, üst üste katlanarak, sarılarak veya kendi etrafında kıvrılarak elipsoit globuler tersiyer yapı oluştururlar. *Torpedo californica* AChE'ı, buğday karboksipeptidaz II (CPW), *Pseudomonas* sp. B13 dienlakton hidrolaz (DLH),

Xanthobacter autotropicus haloalkan dehalojenaz ve *Geotrichum candidum* lipazı (GLP) örnek olarak verilmiştir (Sussman ve Silman, 1992).



Şekil 2.10: α/β Hidrolaz katlanmanın topolojik ikincil yapısı (Dvir ve ark., 2010).

X-ray kristalografi ile *Torpedo californica* (Sussman ve ark.,1991) (Şekil 2.11), fare (Bourne ve ark., 2003), *Drosophila* (Harel ve ark., 2000) ve insan (Kryger ve ark., 2000) AChE'in üç boyutlu yapısı elde edilmiştir.



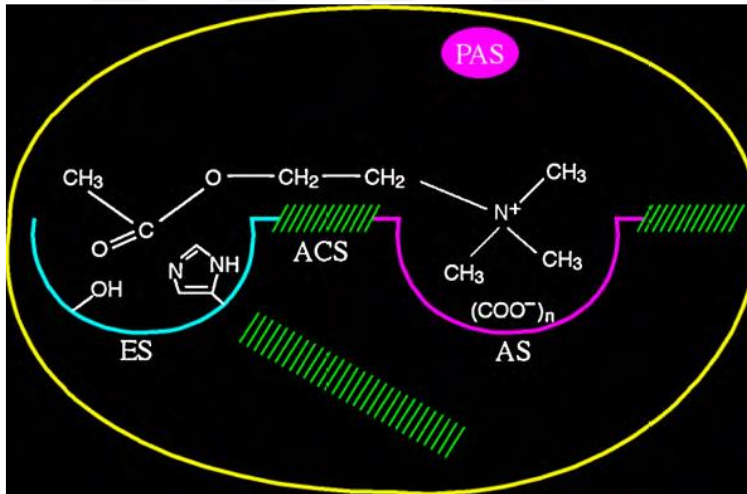
Şekil 2.11: *Torpedo californica* asetilkolinesterazın yapısının diagramı (Sussman ve Silman, 1992).

Enzim monomerini oluşturan 537 amino asit içeren polipeptid zinciri yeşil, dibinde aktif merkezi bulunan çukurun yüzeyinde yer alan 14 aromatik amino asit kalıntısı pembe, doğal substratı olan ve aktif merkez ile kenetlenen asetilkolin ise altın sarısı ve mavi ile gösterilmiştir.

2.4.1. Enzimin Aktif Bölgesi

Enzimin aktif bölgesi, yaklaşık 20 Å uzunlukta, dar, temeline doğru genişleyen bir çukur şeklindedir. Bu çukurun dibine yakın bir yerde katalitik triad yer aldığı için aktif bölge çukuru olarak adlandırılmaktadır (Sussman ve Silman, 1992). Yukarıdan bakıldığında enzimin en dar kısmının çapı 4,4 Å olduğu saptanmıştır (Şekil 2.14).

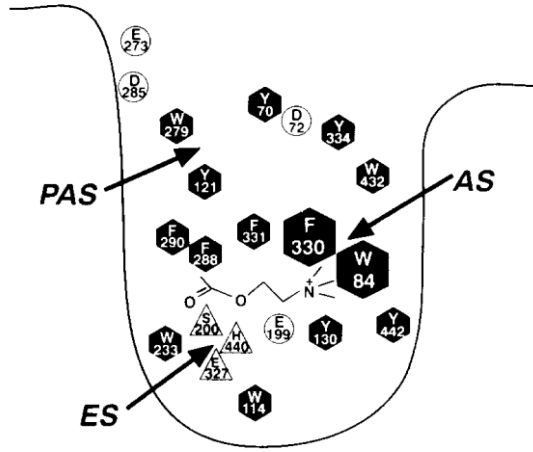
AChE'nin 3 boyutlu yapısı açıklanmadan önce yapılan ilk kinetik çalışmalar sonucunda AChE'nin aktif merkezinin katalitik bölge ve kolin bağlayıcı cebe tekabül eden esteratik ve anyonik olmak üzere iki alt bölgeden oluştuğu kabul edilmiştir (Şekil 2.12). Esteratik alt-bölgenin diğer serin proteazların katalitik alt bölgesine benzer olduğu görüşüne varılmıştır. Hem kinetik hem de kimyasal çalışmalar ile *Torpedo californica* AChE'nin aktif bölgesindeki amino asitlerden ikisinin serin ve histidin olduğu tespit edilmiştir (Dvir ve ark., 2010). Anyonik alt bölge ise asetilkolinin kolin kısmındaki yüklü kuaterner grubu ile etkileştiğini, kompetitif inhibitörü olarak davranan edrofonyum ve N-metilakridinyum ile organofosfatlar ile inhibe edilmiş AChE'nin reaktivatörleri olan kuaterner oksimler için bağlanma bölgesi olarak düşünülmüştür.



Şekil 2.12: AChE'nin üç boyutlu yapısı açıklanmadan önce yapılan biyokimyasal çalışmalar ile tespit edilen aktif merkezindeki bağlanma yerleri (Dvir ve ark., 2010).

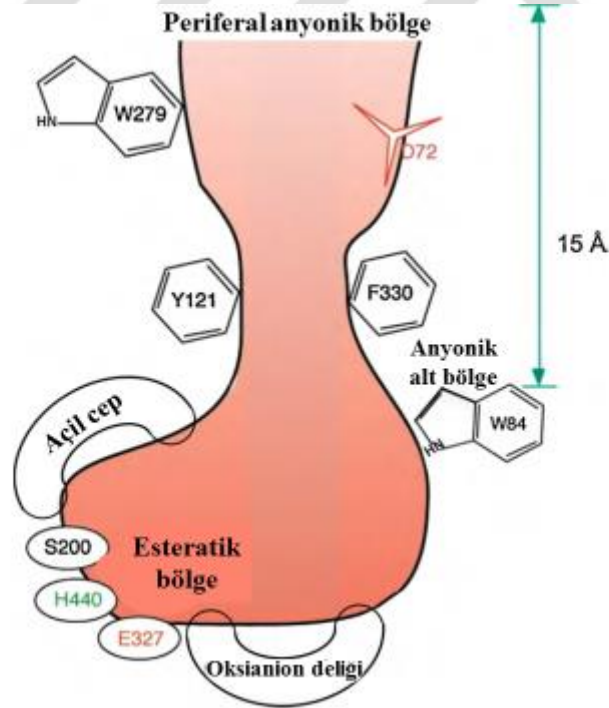
ES, esteratik bölge; AS, anyonik substrat bağlanma bölgesi; ACS, aromatik katyon bağlanma bölgesi; PAS, periferik anyonik bağlanma bölgesi

Kimyasal modifikasyonlar ve spektroskopik çalışmalarla AChE'nin aktif merkezindeki aromatik amino asitlerin varlığı kanıtlanmıştır (Dvir ve ark., 2010). X-ışını kristal yapısının açıklanması ile esteratik bölgenin aktif merkez çukurunun dibinde bulunduğu ve Şekil 2.13'de üçgen şeklinde gösterilen S200 (serin), H440 (histidin) ve E327 (glutamat) amino asit kalıntılarından oluştuğu, aktif çukur merkezinin dibinde aynı şekilde yuvarlak içinde gösterilen asidik amino asitlerin bulunduğu, fakat siyah altıgen ile gösterilen aromatik amino asit kalıntıları ile döşendiği, bunlardan iki tanesi W84 (triptofan84) ve F330 (fenilalanin) anyonik bölgesine katkıda bulunduğu, W279 (triptofan279) ise PAS bölgesinde yer aldığı, 14 aromatik kalıntı ise aktif çukur yüzeyinin % 40'nı çevrelediği gözlenmiştir (Tyr70, Trp84, Trp114, Tyr121, Tyr130, Trp233, Trp279, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331, Tyr334, Trp432 ve Tyr442) (Dvir ve ark., 2010). Bu diziler birçok farklı organizmalarda korunmuştur. Aktif bölge çukurunun en üst kısmında Asp 285 ve Glu 273 asidik amino asit kalıntıları bulunurken, Tyr334'e hidrojen bağı ile bağlı Asp 72 dibe doğru yarı yolda yer aldığını, Glu 199 ise dibe yakın bir yerde bulunduğu ileri sürülmüştür. Ligand ile protein arasındaki bağlanma sırasındaki etkileşimleri ve hareketleri (protein aktif bölgesine ligand yapısının bağlanma konformasyonunu ve bağlanma sırasındaki yönelmenin tahminini) inceleyen docking (kenetlenme) işlemi ile edrofonyum ve takrin'in kuaterner grubu ile AChE'nin Trp 84'ün indol halkası ile direkt iletişim gösterdiği görülmüştür. Katyonik substratların ise aktif merkeze 14 aromatik amino asit kalıntıları ile etkileşerek bağlandıkları çeşitli inhibisyon deneylerinde gözlemlenmiştir (Sussman ve Silman, 1992).



Şekil 2.13: AChE'nin X-ray yapısı (Sussman ve Silman, 1992).

En son bulgulara göre AChE'nin aktif bölgesinde esteratik, anyonik ve periferel anyon alt bölgelerine ilave olarak oksianyon deliği, açıl bağlama cebi ve omega ilmiği bulunduğu tespit edilmiştir (Dvir ve ark., 2010).



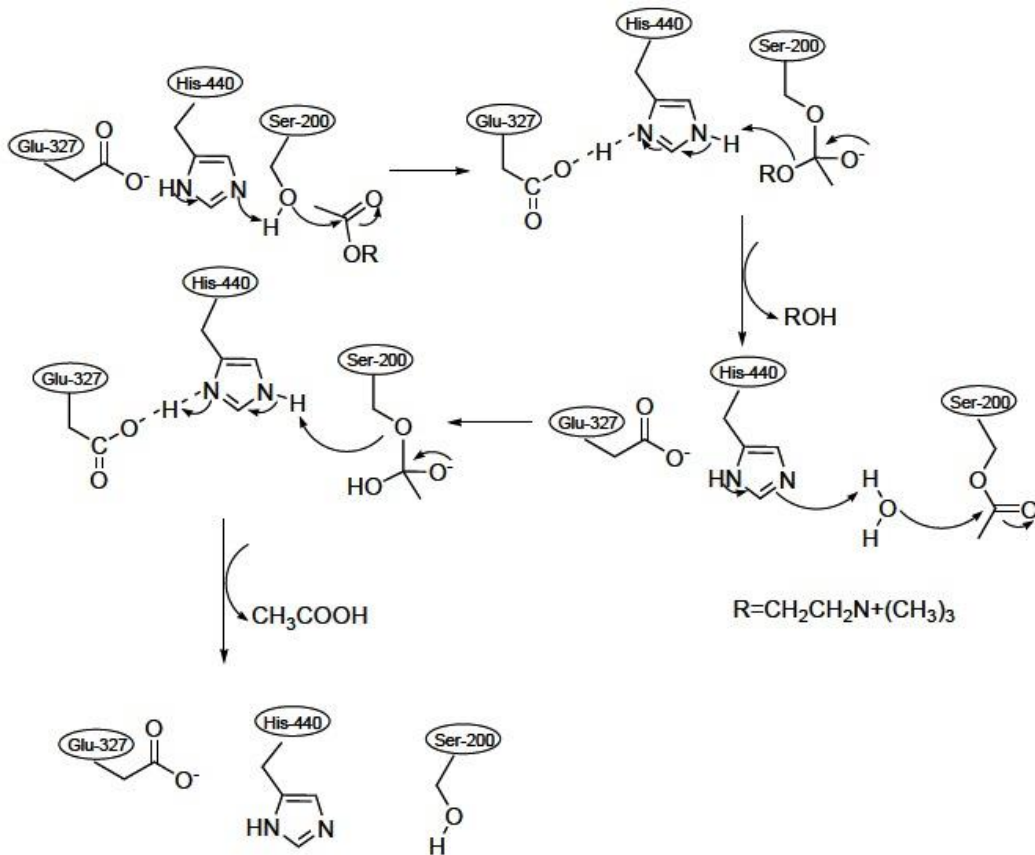
Şekil 2.14: AChE'nin aktif merkezinin alt bölgeleri (Dvir ve ark., 2010).

2.4.1.1. Esteratik (Katalitik) Alt Bölge (Katalitik Triad)

TcAChE Ser 200 (203), His 440 (447) ve Glu 327 (334) (Parantez içindekiler insan AChE enzimine ait bulgulardır.) diğer serin hidrolazların katalitik alt bölgesi ile yapısal benzerlik göstermektedir. Aktif merkezlerinde birbirine çok yakın bulunan S200, H440 ve Glu 327 amino asitleri hidrojen bağlarıyla bağlanarak katalitik üçlüyü (triad) oluşturmaktadır. Serin, ACh'deki ester bağlarının hidrolizinden sorumludur. Diğer gruplar ise hidrojen bağı oluşturarak geçici durumun yükünü stabilize etmektedir. Histidinin imidazol grubu tetrahedral ara ürünün oluşumu ve parçalanmasında asit-baz katalizatörü olarak etki etmektedir. Glutamat ise imidazol halkasının azotuna bağlı hidrojen atomuna bağlanarak halkayı stabilize etmektedir.

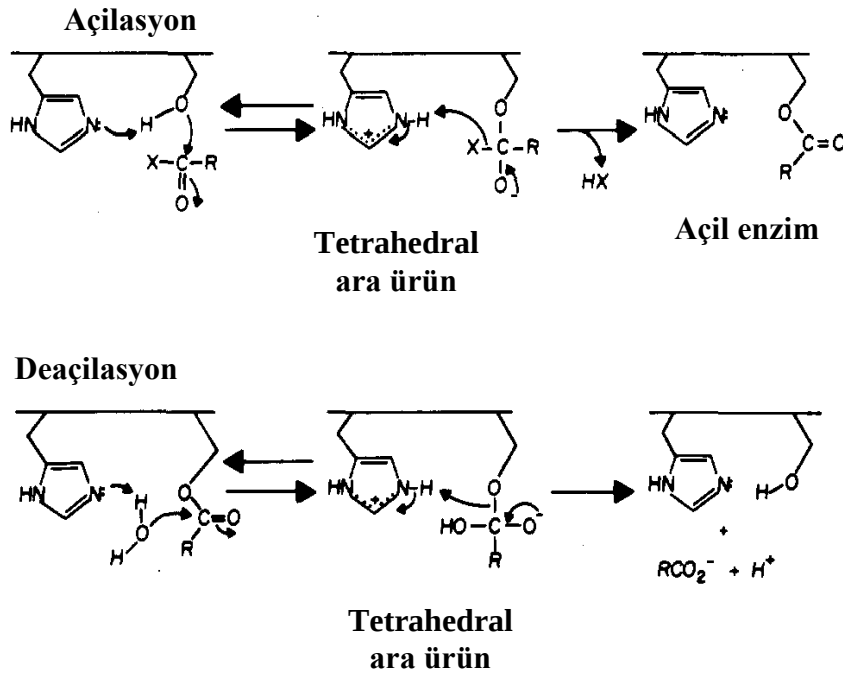
2.4.1.2. AChE'in Etki Mekanizması

AChE, diğer serin hidrolazların etki mekanizmasına benzer şekilde etki etmektedir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15: AChE tarafından asetilkolinin hidrolizi (Čolović ve ark., 2013).

Ser, Glu'e hidrojen bağı ile bağlı olan His'e hidrojen bağıyla bağlıdır. Ser oksijeni bir substratın (ACh) karbonil karbonunu hedef aldığı anda hidrojen bağı His, serin protonunu uzaklaştırmak için genel bir baz olarak davranır ve negatif yüklü Glu, His kalıntısında oluşan pozitif yükü stabilize eder. Ser200 yan zincirinden proton çekilmesi sonucunda meydana gelen kuvvetli bir nukleofil, substratın (ACh) karbonil grubuna saldırarak geçici bir kovalent tetrahedral geçiş durumu oluşur. Geçiş durumunda karbonil oksijeni negatif yüklü duruma geçer. Sonuçta meydana gelen asetil serin ara ürünü, ikinci bir tetrahedral geçiş durumu oluşturabilmek için bir su molekülü ile bağ yapar. Su molekülü, imidazol yan zincirine proton vererek açıl ara ürünüyle ikinci bir tetrahedral geçiş ara ürününü oluşturur. Bu ara ürün His'den Ser'e proton transferinin bir sonucu olarak hidrolizlenir. Glu-327 ise tetrahedral geçiş durumunda histidin katyonu stabilize eder (Şekil 2.16) (Houghton ve ark., 2006).

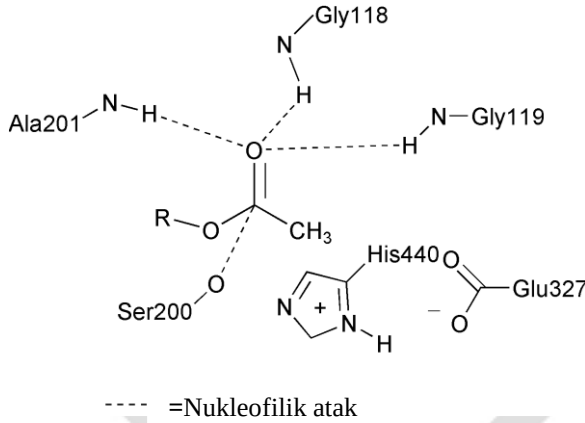


Şekil 2.16: AChE'nin katalitik mekanizması (Quinn, 1987).

2.4.1.3. Oksianyon Deliği

[TcAChE Gly 118 (121), Gly 119 (122) ve Ala 201 (204)] (Johnson ve Moore, 2006). Bu üç peptid kalıntısı hidrojen bağı donörü olarak davranırlar ve ACh'in katalitik

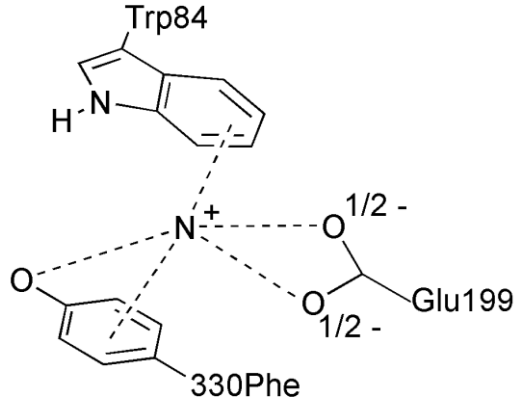
işlemi sırasında oluşan tetrahedral ara şeklini stabilize ederler (Şekil 2.16) (Houghton ve ark., 2006).



Şekil 2.17: Transfer durumundaki substratın katalitik triad, tetrahedral ara ürünü ve oksianyon deliği ile etkileşimi (Houghton ve ark., 2006).

2.4.1.4. Anyonik Alt Bölge (Kolin Bağlayan Alt Bölge veya Hidrofobik Alt Bölge)

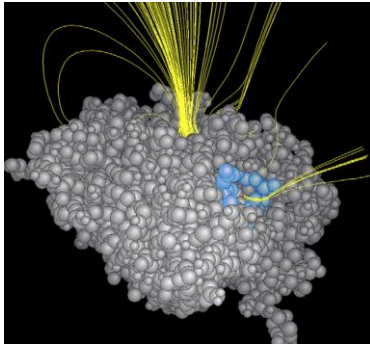
[Trp 84 (86), Tyr 130 (133), Tyr 330 (337) ve Phe 331 (338)]. Büyük bir kısmı aromatik kalıntıdan oluşur ve içerdiği Trp84, Phe330 ve Glu199, katyon- π etkileşimi ile ACh'in kuaterner amonyum grubunu bağladıkları düşünülmektedir (Şekil 2.18). Trp84 ACh substratının bağlanmasında büyük önem taşır, yerine alanin gibi alifatik bir amino asidinin geçmesi enzimin ACh'e karşı reaktiviteyi azaltmaktadır (Johnson ve Moore, 2006).



----- = Hidrojen bağı oluşumu ve katyonik N ile aromatik halkanın π elektronları arasındaki etkileşim.

Şekil 2.18: AChE'in anyonik alt bölgesi (Houghton ve ark., 2006).

Asetilkolin'in aktif bölgeye ne şekilde ulaştığı ve oluşan ürünler ne şekilde dışarıya çıktığı henüz netlik kazanmamıştır. Enzimde "arka kapı" bulunduğu ileri sürülmüştür. Trp84 kalıntısı etrafında substratın girişine ve ürünün çıkışına izin veren bir yolun varlığı tahmin edilmektedir (Şekil 2.19) (Houghton ve ark., 2006).



Şekil 2.19: Asetilkolin hidroliz ürünlerinin aktif çukurdan çıkışı (Silman ve Sussman, 2008).

TcAChE'a ait açık "arka kapı"yı gösteren elektrik alan çizgileri sarı ile, aktif bölge çukurunun girişi ise mavi ile gösterilmiştir

2.4.1.5. Açıl Bağlama Cebi

ACh'in asetil grubuna bağlanan TcAChE Phe 288 (295) ve Phe 290 (297) amino asitleri içermektedir. Substrat seçiciliğinden sorumludur, ACh'den daha büyük kolin esterlerinin aktif bölgeye girişini engellemektedir (Johson ve Moore, 2006).

2.4.1.6. Periferal Anyonik Alt Bölge

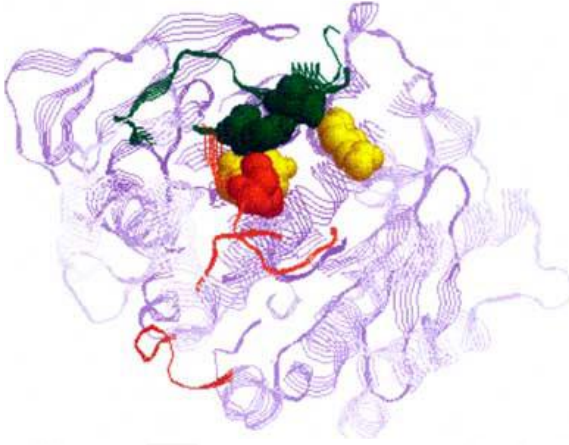
TcAChE Tyr 70 (72), Asp 72 (74), Tyr 121 (124), Trp 279 (286) ve Tyr 334 (341) amino asit kalıntıları demet şeklinde aktif çukurun girişinde yer almaktadır. Katalitik yolunun birinci basamağında ACh'i bağlamakta ve allosterik olarak katalitik reaksiyonunun modülasyonunu sağlamaktadır. PAS ayrıca, AChE'in hücre adezyonu ve nöral hücrelerinin nöritik büyümesi ve amyloidoz gibi non kolinerjik fonksiyonlarını artırmaktadır (Johson ve Moore, 2006). Bazı yüzey ilmiği PAS'a bağlanarak, PAS'ın bazı amino asitlerini yapısına almaktadır.

2.4.1.7. Büyük Omega İlmiği (Loop) (Cys69–Cys96)

PAS bölgesinin Tyr72 ve Asp74 amino asitlerini yapısına dahil etmektedir. Bu ilmiğin sonuncu bölümü aktif çukurun dış tarafını oluşturmakta ve anyonik bölgenin esas amino asidi olan Trp86'ı da yapısına almaktadır. 275-305 yüzey ilmiği ise aktif çukurun karşı tarafında bulunmakta ve Trp 286 amino asidini kapsamaktadır. İlmiğin PAS'ı saran alanında ise 10 asidik amino asit kalıntısı bulunmaktadır (Şekil 2.20).

Torpedo AChE enziminin yüzeyindeki asimetric yük, anlık dipol şeklinde aktif çukurun eksenini boyunca dağılmaktadır. Negatif yüklü kutup çukur girişine yakın bir bölgede lokalizedir. Bu yükten sorumlu olan asidik kalıntılardan sekizi yüzeyde (Asp72, Glu82, Glu282, Glu285, Glu342, Asp351, Asp380, ve Asp381), ikisi ise çukurun dibinde (Glu199 ve Glu443) bulunmaktadır. Bu anyonik yüzey yük katyonik substratların ve inhibitörlerin enzimin aktif bölgesine elektrostatik çekimine neden olmaktadır. Asidik kalıntılarının herhangi birinin mutasyonu enzim-substrat ve enzim-inhibitör etkileşimini azaltmaktadır. İyonik kuvvetin veya pH'nın değişimleri, ligandların PAS'a bağlanmalarını etkilemektedir (Johnson ve Moore, 2006). "Halkalı elektrostatik motif" adı verilen bu negatif yükün yoğunlaşması, AChE ile neurotactin, gliotactin ve neuroligin gibi homolog sinyal moleküllerinde görülmektedir, hücre adezyon etkisi bulunmayan BChE'da ise bu motif bulunmamaktadır. Elektrostatik etkileşim ile adezyona katılan moleküllere elektrotaktins adı verilmiştir. Ekstraselüler

matriks molekülleri, laminin-1 ve kollajen IV, AChE'nin PAS'ına elektrostatik mekanizma ile bağlandıkları bildirilmiştir.



Şekil 2.20: Torpedo AChE'nin yapısındaki iki PAS kalıntısına (Tyr70 ve Asp72)'a bağlı omega ilmiği 69-96 (yeşil) (Johnson ve Moore, 2006).

PAS'ın Trp 279 kalıntısını yapısına dahil eden omega 274-308 ilmiği turuncu ile gösterilmiştir. Geri kalan PAS kalıntıları (Tyr 121 ve Tyr 334) sarı ile gösterilmiştir.

2.5. Alzheimer Hastalığında Asetilkolinesterazın Rolü

Dünyada yaklaşık 36 milyon insanın etkilendiği ve özellikle yaşlı popülasyonunda görülen ve kognitif fonksiyonlarda meydana gelen gerileme, senil amiloid plak ve nörofibriler yumakların oluşumu ile seyreden Alzheimer hastalığı (AH) geri dönüşümü olmayan nörodejeneratif bir hastalıktır. AH en sık görülen demans türüdür. Bu hastalığın patolojik nedenleri ile ilişkin kolinerjik ve amiloid olmak üzere iki hipotez öne sürülmüştür (DallAqua, 2003).

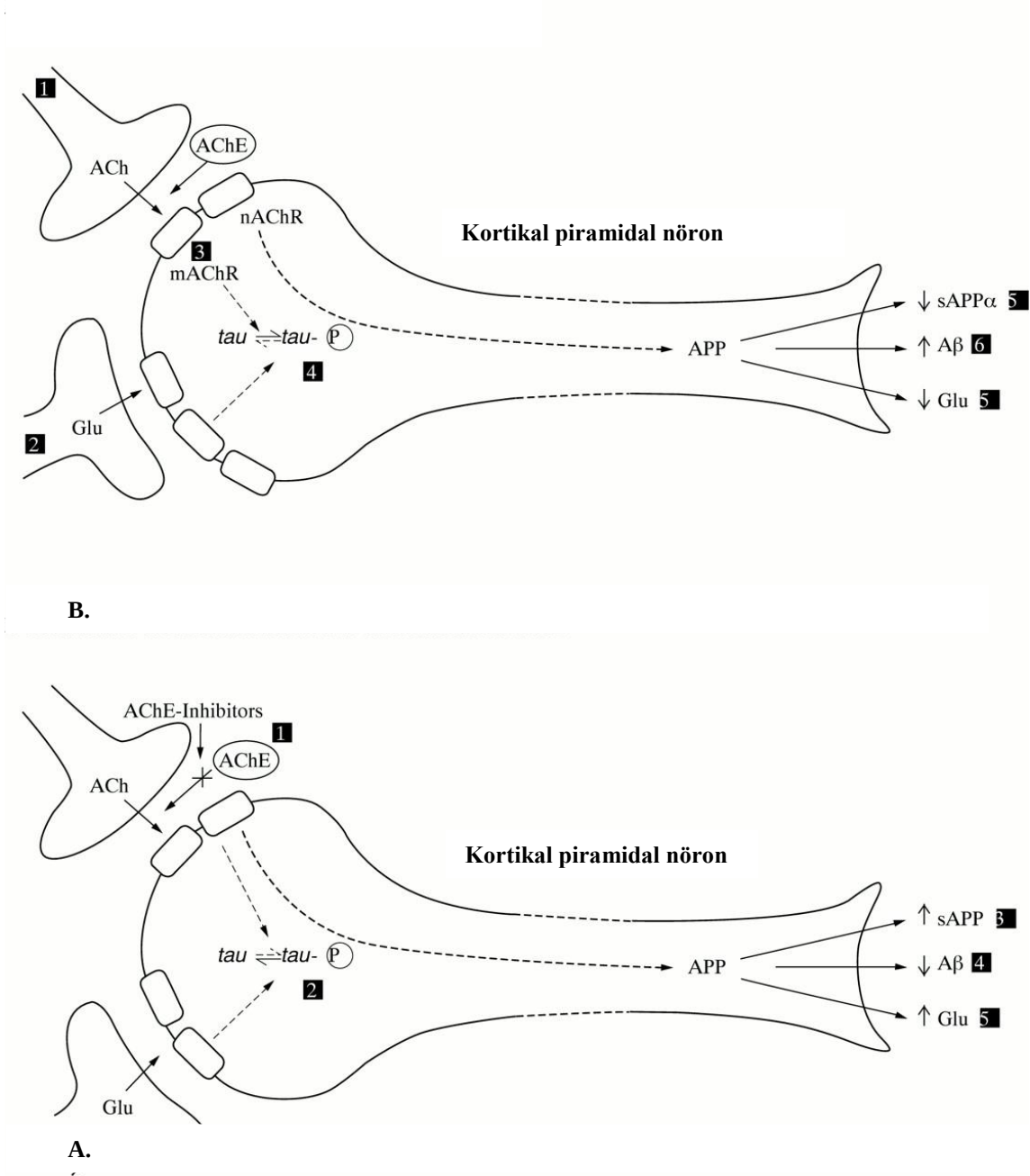
2.5.1. Kolinerjik Hipotez

AH'nin nedenlerinden bir tanesi, beyinde öğrenme ve hafıza ile ilgili bölgelerde kolinerjik sistemin fonksiyonunun bozulmasıdır. ACh sentezini kataliz eden kolin asetiltransferaz enzimin seviyesinin % 90 oranına kadar hipokampus ve neokortekste azaldığı bildirilmiştir (García-Ayllón ve ark., 2011). Presinaptik nöronlardaki veziküllerden sinaptik aralığa difüzyonla salgılanan asetilkolin, postsinaptik membrandaki nikotinik reseptörlere bağlanarak doğrudan, muskarinik reseptörlere bağlanarak G-protein aracılı ikinci haberciler üzerinden etkisini gösterir. Asetilkolinesteraz enzimi ACh'i asetat ve koline hidroliz ederek ACh seviyesinin azalmasına ve buna bağlı olarak hem nikotinik hem de muskarinik reseptörlerin

stimülasyonunun durmasına ve A β oluşumunun artmasına neden olur. Bu nedenle AH'da kolinerjik kaybı amiloid plak oluşumuna katkıda bulunur. Alzheimer hastalarının korteks ve serebrospinal sıvısında G4 formunun azaldığı, G1 ve G2 ile asimetrik A8 ve A12 formlarının arttığı görülmüştür (Nalivaeva ve Turner, 2001). Alzheimer hastalarının beynindeki kortikal AChE aktivitenin en büyük kısmı amiloid prekürsör proteininin (APP) metabolizma ürünlerinden olan amiloid β (A β) proteinin oluşturduğu amiloid plaklarda tespit edilmiştir. AChE'in A β ile bir arada birikmesi senil plakların oluşumuna yol açtığı sonucuna varılmıştır (Inestroza ve ark., 1996).

Alzheimer hastalığında Şekil 2.21'de şematik olarak gösterilen nöron fonksiyonlarında meydana gelen değişiklikler Francis ve ark. 1999 tarafından özetlenmiştir:

- (1) Kortikal kolinerjik inervasyonun azalması (beyindeki kolinerjik nöronların seçici kaybı ve azalmış asetilkolin seviyesi)
- (2) Nöron veya sinaps kaybına bağlı olarak kortikokortikal glutamaterjik nörotransmisyonunun azalması
- (3) Nikotinik ve muskarinik reseptörlerin azalması, M1 muskarinik reseptörlerin G proteinleri ile etkileşiminin bozulması
- (4) Nörofibril yumaklarının öncülü olan tau hiperfosforilasyonu
- (5) Çözünen amiloid prekürsör proteinin (APP) azalmış sekresyonu
- (6) β -Amiloid proteinin artmış üretimi
- (7) Azalmış glutamat üretimi



Şekil 2.21: A. Alzheimer hastalığında öne sürülen nörokimyasal değişiklikler. B. AH'nın tedavi stratejeleri.

ACh = Asetilkolin

mACh R= ACh muskarinik reseptör

APP = Amiloid prekürsör protein

AChE = Asetilkolinesteraz

nAChR= ACh nikotinik reseptör

Glu = Glutamat

Tedavi stratejeleri Şekil 2.21’de Francis ve ark. (1999) ve Dall’Aqua (2007) tarafından aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:

- (1) AChE inhibitörleri endojen olarak salgılanan ACh’in hidrolizini inhibe ederek, postsinaptik ACh reseptörlerinin aktivite artışına neden olurlar.
- (2) Protein kinazların inhibisyonu ile tau proteininin fosforilasyonu azaltılabilir. Katepsin D gibi selektör inhibitörler kullanılarak tau agregatlarının proteolitik olarak parçalanması ve bu şekilde nörofibril yumakların büyümesinin önlenmesi sağlanır.
- (3) sAPP sekresyonunun normal seviyesine dönmesi sağlanır.
- (4) β -sekretaz inhibitörleri ile β -amiloid üretimi azaltılır.
- (5) Nikotinik (nikotin) veya muskarinik (arekolin, pilokarpin) agonistleri kullanılarak nikotinik ve muskarinik reseptörlerinin uyarılması ile glutamaterjik nörotransmisyonunun normale dönmesi sağlanır.

2.6. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri

Katalizli reaksiyonların mekanizmalarının detaylı olarak bilinmesi inhibitör tasarımı için çok önemlidir. Gelişmiş ülkelerde, yükselen yaşam standartları sonucu artan yaşlı popülasyonunun en sık karşılaştığı hastalıklardan birisi olan Alzheimer hastalığının tedavisinde, başarı oranının elde edildiği mekanizmalardan bir tanesi asetilkolinesteraz inhibisyonudur. Özellikle bitkilerden elde edilen etken maddeler modern ilaç araştırmaları için önemli ve yararlı bir kaynak oluşturmaktadır. Fakat fizostigmin, takrin ve donepezil gibi sentetik AChE inhibitörlerin hepatotoksisite ve gastrointestinal şikayetler gibi yan etkileri bildirilmiştir (Roseiro ve ark., 2012). Bitkilerden izole edilen ilk alkaloid olan galantamin, AChE’ı etkili bir şekilde inhibe eder ve bu özelliği sayesinde Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır.

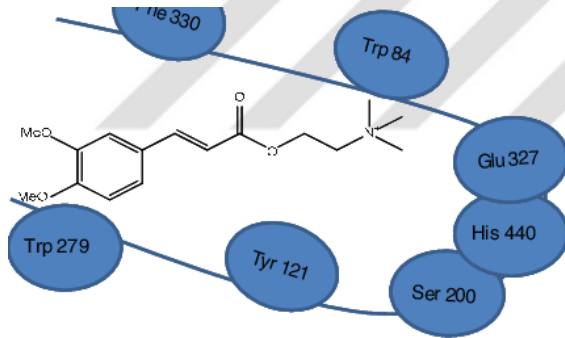
2.6.1. Flavonoidler

Son yıllarda yapılan çalışmalarda flavonoidlerin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiviral (Havsteen, 2002) özelliklerinin yanında AChE inhibe edici özelliklerinin de bulunduğu gösterilmektedir (Orhan ve ark., 2004; Dastmalchi ve ark., 2007; Mukharjee ve ark., 2007). Beyinde nörotoksik amiloid beta ($A\beta$) oluşumunu azaltabilmek amacıyla yapılan çalışmalarda ise, alfa sekretazların aktivasyonunun, beta ve/veya gama sekretazların ise inhibisyonunun amiloid plak oluşumunu azaltmakta etkin oldukları

saptanmış ve söz konusu sekretazların aktivitelerinin düzenlenebilmesi durumunda bu patolojilere bağlı olarak gelişen bellek kaybının düzelebileceği ileri sürülmüştür (Özkay ve ark., 2011; Williams ve Spencer, 2012).

Antikolinesteraz ilaçların etkin olabilmeleri için AChE enziminin aktif merkezine geri dönüşümlü olarak bağlanmaları gerekmektedir, aksi takdirde geri dönüşümü olmayan bir inhibisyon ölüme neden olabilmektedir (Roseiro ve ark., 2012). Bu nedenle antikolinesteraz ilaç olarak kullanılacak olan maddelerin inhibisyon kinetikleri araştırılmalıdır. Bu amaç için farklı kaynaklardan izole edilen, saflaştırılan ve kinetiği incelenen AChE kullanılmaktadır.

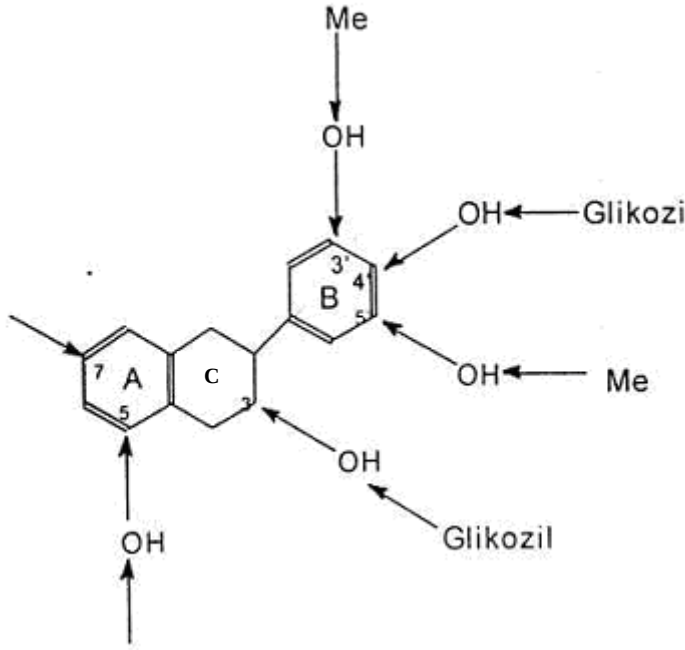
Flavonoidlerin OH grupları içeren aromatik halkası enzimin konformasyonunda değişikliğe yol açmadan yani tersiyer yapısını değiştirmeden PAS bölgesine bağ kurarak yerleşmektedir (Şekil 2.22) (Roseiro ve ark., 2012).



Şekil 2.22: Kafeik asidin kolin esterinin AChE'nin aktif merkezine bağlanması (Roseiro ve ark., 2012).

Flavonoidlerin yapısındaki C halkanın C-3 pozisyonundaki -OH grubu flavonoidlerin inhibe edici aktivitelerini arttırmada önemlidir.

Metoksiflavonoidlerin yapılarında birden yediye kadar metoksil grubuna rastlanmaktadır. Flavonoid yapılarında substituentlerin genel yerleşme pozisyonları Şekil 2.23'te verilmiştir.



Şekil 2.23: Flavonoid yapılarında substituentlerin genel yerleşme pozisyonları (Taşkıran, 2005).

2.7. Midye AChE'leri

Mollusca filumunun Bivalvia sınıfı içinde yer alan Mytilidae familyasının en önemli türleri *Mytilus galloprovincialis* (kara midye veya Akdeniz midyesi) ve *Mytilus edulis* (mavi midye veya Avrupa midyesi), *Modiolus barbatus* (at midyesi) ve *Perna* sp. (Afrika midyesi)'dir (Grienke ve ark., 2014). Deniz kıyılarında yaşayan midye popülasyonları enzim kaynağı olarak bir çok araştırmacının araştırma konusu olmuşlardır. *Mytilus galloprovincialis* Lam. 'ın manto dokusundan glukozidaz enzimi saflaştırılıp kinetik özellikleri incelenmiştir (Yalvaç ve Kuşçu, 1993; Ataç ve ark., 1994; Özsoy ve Berkkan, 1997; Somar ve ark., 2000). Can ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada *Mytilus galloprovincialis* Lam. midye türünden aspartat ve alanin aminotransferazları saflaştırıp kinetik özelliklerini incelemişlerdir. Kuzey Adriatik denizinden toplanan *M. galloprovincialis* ve *Scaphara inaequalvis* midye türlerinden ikisi spontan olarak çözünen biri ise membrana bağlı olmak üzere AChE'in üç formu izole edilmiş ve saflaştırılmıştır (Talesa ve ark., 2001; Talesa ve ark., 2002). AChE'in globular tetramerik [12S] ve globular dimerik [6S] moleküler formlarını temsil spontan olarak çözünen A ve B formları, total AChE aktivitesinin % 80'ninden sorumlu oldukları ve hemolenfte bulundukları bildirilmiştir. Membrana bağlı, deterjanla çözünür hale gelen

üçüncü formu ise AChE'nin GPI'e bağlı amfifilik globular dimerik formunu temsil etmektedir. Her üç form da BW284C51 gibi AChE için spesifik inhibitörler tarafından inhibe edildiği için gerçek AChE (Talesa ve ark., 2001) olarak kabul edilmektedirler.

Aplysia midye türünün hemolenfinin AChE bakımından çok zengin olduğu ve membrana tutunmuş ve çözünen olmak üzere iki formda bulunduğu bildirilmiştir (Giller ve Schwartz, 1971).

Midye hemolenfi AChE aktivitesi deniz kirliliği göstergesi olarak ölçülmektedir. Organofosfat, karbamat veya ağır metallerle maruz kalan *M. galloprovincialis* (Moreira ve ark., 2001; Taleb ve ark., 2007) ve *M. edulis* (Yaqin ve Hansen, 2010) midye türlerinde AChE aktivitesinde azalma görülmüştür.

Türkiye kıyılarında, Akdenize özgü midye türü olan *Mytilus galloprovincialis* Lam. hemolenfinden asetilkolinesteraz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi ile ilgili bir bilgi literatürde yer almamakla birlikte, adı geçen türün hemolenfindeki AChE aktivitesinin tayininin biyomonitör programlarında deniz kirliliğinin değerlendirilmesinde biyomarker olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Moreira ve ark., 2001).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

- Su banyoları (Thermomix BU ve Grant SB2)
- Çalkalayıcı (IKA KS260)
- Cam kolon (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Sweden)
- Derin dondurucu (Bosch)
- ELISA reader (mikroplaka okuyucu) (BioTek Eon)
- Etüv (Heraeus)
- Fraksiyon toplayıcı (Gilson FC 204)
- Görüntüleme cihazı (VILBER LOURMAT Model: FUSION FX)
- Kromatografi kolonları (Pharmacia Fine Chemicals)
- Manyetik karıştırıcı (Kermanlar)
- Otomatik pipet takımı (Gilson ve Eppendorf)
- pH metre (Radiometer 92)
- Soğuk dolap (Nuare)
- Soğutuculu santrifüj (Heraeus-Megafuge 1.OR)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208)
- Ultrafiltrasyon hücresi (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 U.S.A.) ve ultrafiltrasyon membranı (Amicon, PM 10)
- Vertikal jel elektroforezi cihazı ve güç kaynağı (BIO RAD Mini PROTEAN Tetra Cell)
- Vorteks karıştırıcı (VELP Schientifica)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum sülfatla çöktürmede amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$; Merck 101217] kullanıldı.

Protein miktar tayininde Bradford ayıracı (Bradford Reagent; Sigma Aldrich B6916), standart olarak sığır serum albümini (Fluka; 05470), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck; K23145644).

Tamponların hazırlanmasında potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 ; Merck 4871), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4 ; Merck 105101), Tris baz (Merck; 1.08387), sodyum klorür (NaCl ; Merck 1.06404.1000) kullanıldı.

Poliakrilamid jel elektorforezinde N,N'-metilenbisakrilamid (Merck; 10897), akrilamid (Sigma; A8887), sodyum dodesil sülfat (SDS; Fluka; 71725), amonyum peroksodisülfat (Merck; 101200), glisin (Merck; 5.00190), tetrametiletilediamin (TEMED; AppliChem; A1148,0250), 2-merkaptotanol (Merck; 5740), gliserol (Merck; 104093), bromfenol mavisi (Merck; 591037), Coomassie brilliant blue R-250 (Fluka; 221234), Wide range kalibrasyon kiti (Sigma; S8445) kullanıldı.

3.3. Kullanılan Çözeltiler

Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler:

- **Akrilamid Çözeltisi:** 40 g akrilamid ve 1,09 g N, N'-bisakrilamid son hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. 4°C'de saklandı.
- **Ayrıştırma (Resolving) Jeli Tamponu (1 M Tris - HCl Tamponu, pH 8,8):** 12,1 g Tris baz distile suda çözüldü, pH'sı N HCl veya N NaOH ile 8,8'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.
- **Sıkılaştırma (Stacking) Jeli Tamponu (1 M Tris - HCl Tamponu, pH 6,8):** 12,1 g Tris baz distile suda çözüldü, pH'sı N HCl veya N NaOH ile 6,8'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.
- **% 10 Sodyum Dodesil Sülfat:** 10 g SDS distile suda çözüldü. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- **% 1 Amonyum Persülfat:** 1 g amonyum persülfat son hacim 100 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. Taze hazırlandı.

➤ **Örnek Yükleme Tamponu:** 4,8 ml distile su; 2,0 ml % 10 SDS; 1,2 ml 1 M Tris - HCl tamponu (pH 6,8); 1,0 ml gliserol; 0,5 ml % 0.5 bromfenol mavisi karıştırılarak hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

➤ **Elektroforez Yürütme Tamponu (10 x):** 14,4 g glisin, 3 g Tris baz ve 10 g SDS 60 ml distile suda çözüldü. pH'sı N HCl veya N NaOH ile 8,3'e ayarlandı. Hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Kullanılmadan önce 10 kez seyreltilti.

Inhibitör olarak hispidulin, 5-OH,6,7,8'4'-tetrametoksiflavon ve gnafulin İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalından temin edildi.

Inhibisyon deneylerinde satın alınan AChE (Sigma; C3389) kullanıldı

3.4. Kullanılan Yöntemler

3.4.1. Hemolenfin Elde Edilmesi

Mytilus gallaprovincialis Lam. cinsi midyeler deneyin yapılacağı gün (19.12.2016) Yenikapı sahillerinden midyeciler tarafından toplandı. Hemolenf enjektör yardımıyla kasların içine girilerek çekildi. Deneylerde 40 midye ile çalışıldı. 24 ml hemolenf elde edildi.

3.4.2. Midye Hemolenfinden Asetilkolinesterazı Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

1ml hemolenfe, konsantrasyonu % 20 oluncaya kadar, havanda dövülerek toz haline getirilmiş amonyum sülfat küçük porsiyonlar halinde katıldı. Karışım manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldıktan ve bir gece buz dolabında bekletildikten sonra sonra 13.000 devir/dakikada soğukta (4°C) 30 dakika santrifüje edildi ve sıvı ve pellet kısımda asetilkolinesteraz aktivitesi ölçüldü. Sıvı kısım üzerine, ortamdaki konsantrasyonu % 25 olacak şekilde toz amonyum sülfat katıldı ve yukarıdaki işlemler tekrarlanarak elde edilen sıvı kısmında enzim aktivitesi ölçüldü. Bu işlemlere amonyum sülfatın sıvı kısımdaki son konsantrasyonu, kademeli olarak her seferinde % 5 arttırmak suretiyle, % 60'a çıkarılıncaya kadar devam edildi. Her bir amonyum sülfat konsantrasyonunda, elde edilen sıvı kısımdaki asetilkolinesteraz aktivitesi ölçülerek söz konusu enzimin çöktürülebileceği en uygun amonyum sülfat konsantrasyonu %45 olarak saptandı.

3.4.3. Midye Hemolenf Asetilkolinesterazın Belirlenen Amonyum Sülfat Kesitinin Elde Edilmesi

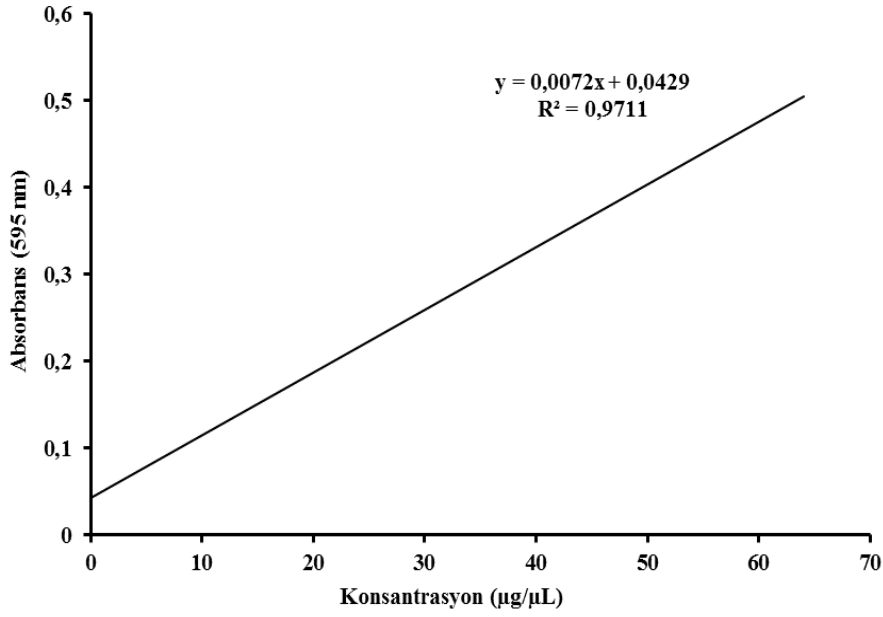
Hemolenfe ortamdaki konsantrasyonu % 45 olacak şekilde havanda toz haline getirilmiş amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edildi. Karışım soğukta manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldıktan sonra bir gece buzdolabında bekletildi, ertesi gün 13.000 devir/dakikada 30 dakika süreyle soğukta santrifüje edildi. Santrifüjle ayrılan sıvı kısım atıldı, çökelti ise çözünebileceği en az miktardaki 10 mM fosfat tamponunda (pH 7,4) çözüldü. % 45 amonyum sülfat fraksiyonu olarak adlandırılan bu çözelti, 4°C’de aynı tampona karşı diyaliz edildikten sonra protein miktarı ile asetilkolinesteraz aktivitesi tayinleri yapıldı.

3.4.4. Protein Miktar Tayini

AChE saflaştırma aşamalarında elde edilen fraksiyonlarda protein miktar tayinleri 96 kuyucuklu mikrolakalarda mikro-Bradford (Bradford 1976) yöntemi ile belirlendi. Kuyucuklara 100 µl örnek ve 150 µl protein boyası konuldu. Örneğin boyayla reaksiyona girmesi için 10 dk. oda sıcaklığında bekledikten sonra mikrolaka okuyucuda 595 nm’deki absorbansı, ayıraç körüne karşı okundu. Bu absorbans değerinin, sığır serum albumini standart eğrisine uygulanmasıyla, protein miktarı µg/ml olarak belirlendi.

3.4.4.1. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Sığır serum albuminin distile sudaki 128 µg/ml’lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml ve 64 µg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, mikro-Bradford deneyi uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile sığır serum albumini standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3.1)



Şekil 3.1: Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemi

3.4.5. Asetilkolinesteraz Aktivite Deneyinin Yapılışı

Asetilkolinesteraz aktivitesi Ellman ve arkadaşlarının önermiş olduğu metoduna göre yapıldı (Ellman ve ark., 1961). AChE aktivitesi, asetiltiyokolin ile DTNB'nin indirgenmesi sonucu dakikada oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin (TNB) absorbansında meydana gelen artışın 412 nm'de 15 dakika süreyle her dakika mikropilaya okuyucuda ölçülmesiyle belirlendi.

Ellman ayırıcı, 1,5 mg NaH_2CO_4 içeren 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,5), 75 mM asetilkolin iyodür ve 10 mM DTNB (3,96 mg/ ml)'nin 100 mM sodyum fosfat tamponundaki çözeltileri (pH 7,5), son konsantrasyonları 95 mM, 1 mM ve 0,3 mM olacak şekilde 150:2:5 oranında karıştırılması ile hazırlandı. 50 µl hemolenf 96 kuyucuklu mikropilaya transfer edildi. 250 µl Ellman ayırıcı ilave edildi. Paralel olarak enzim ve substrat kontrol deneyleri, enzim ve substrat çözeltileri yerine aynı miktarda distile su kullanılması suretiyle gerçekleştirildi. AChE aktivitesi, TNB için $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak belirlenmiş absorpsiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı.

Enzim aktivitesi, dakikada açığa çıkan µmol 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (µmol 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit/dakika) olarak, spesifik aktivite ise dakikada 1 mg enzim

proteininin açığa çıkardığı μmol 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (μmol 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit /dakika/protein) olarak belirtildi.

3.4.6. Edrofonyum–Sefaroz 6B Afinite Kolon Kromatografisi

Edrofonyum-Sefaroz 6B afinite jeli, epoksi-aktive edilmiş Sefaroz jelinin ilk önce deyonize distile su, daha sonra her birinden 10 hacim 100 mM sodyum asetat tamponu (pH 4,5), 12 mM sodyum borat tamponu (pH 10) ve distile su ile yıkandıktan sonra 20 mM edrofonyum klorür içeren 12 mM borat tamponuna (pH 11) $\frac{1}{2}$ oranında aktarılması ile hazırlandı. Karışımın pH'sı 0,1 M sodyum hidroksit ilavesiyle pH 12'ye ayarlandı, 48 saat 50°C'de çalkalanarak inkübe edildikten sonra 1 cm çapında cam kolona yüksekliği 10 cm oluncaya kadar dolduruldu. pH'sı 7,4 olan 10 mM potasyum fosfat tamponundan 3 kolon hacmi (30 ml) geçirilerek kolon dengelendi. Dializ edilmiş % 45 amonyum sülfat kesiti (2ml) kolona uygulandı. Kolondan, sırasıyla pH sı 7,4 olan 10 mM potasyum fosfat tamponunun, daha sonra adı geçen tampona konsantrasyonu 0,5 M olacak şekilde NaCl ilavesiyle hazırlanan tamponunun geçirilmesiyle kolon yıkandı. Elüsyon, kolondan 20 mM edrofonyum klorür ve 0,5 M NaCl içeren 10 mM potasyum fosfat tamponun (pH 7,4) geçirilmesiyle gerçekleştirildi ve elüatlar 1 ml'lik hacimler halinde 60 ml/saat akış hızı ile toplandı. Fraksiyonların 280 nm'deki absorbanları ve enzim aktiviteleri ölçüldü. En yüksek asetilkolinesteraz aktivitesi gösteren tüp içerikleri biraraya getirildikten sonra 10 mM potasyum fosfat (pH 7,4) tamponuna karşı dializ edildi ve ultrafiltrasyon membranından geçirilerek (Amicon, PM 10) konsantre edildi. Elde edilen saflaştırılmış enzim 'Midye AChE' olarak adlandırıldı.

3.4.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Midye hemolenfinden elde edilen asetilkolinesterazın saflık derecesinin incelenmesi ve molekül ağırlığının belirlenmesi amacıyla yapılan poliakrilamid jel elektrofrezinde (Laemmli 1970) iki tip tampon ve iki farklı jel konsantrasyonu kullanıldı. Sistemin alt kısmına 0,25 M Tris - HCl'deki (pH 8,8) % 12,5 akrilamid jeli içeren ayrıştırma (resolving) jeli, üst kısmına ise 0,125 M Tris - HCl'deki (pH 6,8) % 4,5 akrilamid içeren sıkılaştırma (stacking) jeli döküldü (Rybiecki ve Purves, 1996). Elektrofrez yürütme tampon olarak 192 mM glisin; % 0,1 SDS; 25 mM Tris baz içeren elektrofrez tampon (pH 8,3) kullanıldı. Mikropipet kullanılarak 10'ar μl afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisinden kuyucuklara tatbik edildi. Jel 100 ile 150 volt arasında bir voltaj seçilerek jel başına 5 mA akım geçirildi. Elektrofrez

bitiminde jel % 0,2' lik Coomassie brilliant blue R-250'nin metanol: su: asetik asit (45: 45: 10; v/v) karışımındaki çözeltisinde bir gece çalkalayıcıda oda sıcaklığında boyandıktan sonra metanol: su: asetik asit (25: 65: 10; v/v) karışımından oluşan dekoloran çözeltide, çözelti sık sık değiştirilerek yıkandı ve metanol: su: asetik asit (5: 85: 10; v/v) karışımı içeren kaplara yerleştirilerek saklandı.

3.4.8. Denatüre Edici SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Tayini

Denatüre edici SDS-PAGE'de 950 µl örnek yükleme tamponuna (0,125 mM Tris - HCl, % 2 SDS, % 10 gliserol, % 0,02 bromfenol mavisi) 50 µl 2-merkaptotanol ilave edildi ve Midye AChE (20 µl, 0,025mg/ml) ile 1:1 oranında karıştırılarak 95°C'de 5 dakika ısıtıldı.

3.4.9. Midyeden Elde Edilen Asetilkolinesterazın Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

Midye hemolenfinden elde edilen asetilkolinesterazın optimal pH ve optimal temperaturünü belirlemek, asetiltiyokolin substratına karşı Km değerini saptamak için yapılan deneylerde, edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kolonundan 20 mM edrofonyum içeren 10 mM potasyum fosfat tamponu ile elde edilen fraksiyon kullanıldı.

3.4.9.1. pH'nın Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi

Asetilkolinesterazın optimal pH'sını saptamak üzere pH 4-8 sınırları arasında 0,1 M potasyum fosfat tamponu, pH 8-9 arasında ise 0,1 M Tris-HCl tampon çözeltileri kullanıldı. Değişik pH'larda yapılan aktivite ölçmelerinde asetilkolinesteraz aktivitesi ordinatta, pH değerleri absiste gösterilerek asetilkolinesteraza ait optimum pH eğrisi çizildi.

3.4.9.2. Temperaturün Enzim Aktivitesi Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi

Asetilkolinesterazın optimal temperaturünü belirlemek amacıyla, asetilkolinesteraz aktivitesi, 25-60°C'ler arasında değişen temperaturlerde, her defasında 5°C'er derece arttırarak, enzim aktivitesi ölçüldü. Enzim aktivitesi ordinatta, temperatur ise absiste gösterilmek suretiyle adı geçen enzime ait optimum temperatur eğrisi çizildi.

3.4.9.3. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Asetilkolinesteraz enziminin asetiltiyokoline karşı K_m değerinin saptanmasında, aktivite deneyi, enzim konsantrasyonu sabit tutularak, farklı konsantrasyonda asetiltiyokolin içeren Ellman ayırıcı çözeltilerinin kullanılmasıyla gerçekleştirildi (Tablo 3.1). En küçük kareler yönteminin uygulanması suretiyle enzime ait Lineweaver-Burk doğrusu çizildi ve doğru denkleminde yararlanılarak enzime ait K_m ve V_{max} değerleri bulundu.

$$y = 0,0071x + 5,3059 \quad (3-1)$$

Tablo 3.1: Farklı konsantrasyonlarda asetiltiyokolin içeren Ellman ayırıcının hazırlanması.

Tüp No.	1	2	3	4	5	6	7
Asetiltiyokolin konsantrasyonu	$1 \times 10^{-4} M$	$3,16 \times 10^{-4} M$	$1 \times 10^{-3} M$	$3,16 \times 10^{-3} M$	$1 \times 10^{-2} M$	$3,16 \times 10^{-2} M$	$1 \times 10^{-1} M$
Ellman Ayırıcı (fosfat tamponu + DTNB)	1,368 ml	1,368 ml	1,368 ml	1,368 ml	1,368 ml	1,368 ml	2 ml + 70 mg asetiltiyokolin
Aktarılan miktar	632 μl	632 μl	632 μl	632 μl	632 μl	632 μl	632

3.4.10. İnhibisyon Deneyleri

İnhibitör olarak kullanılan metoksiflavonlar; hispidulin, 5-OH,6,7,8'4'-tetrametoksiflavon ve gnafalinin 2 mg/ml alkoldeki çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1mg/ml, 0,5 mg/ml ve 0,25 mg/ml olan çözeltiler elde edildi. Mikroplakadaki kuyucuklara 20 μl inhibitör ve 50 μl AChE enzimi konuldu ve reaksiyona girmeleri için 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra farklı konsantrasyonda asetiltiyokolin içeren Ellman ayırıcı çözeltilerinden 230 μl ilave edildi. Paralel olarak inhibitör içermeyen negatif kontrol deneyleri, inhibitör çözeltileri yerine aynı miktarda distile su kullanılması suretiyle gerçekleştirildi.

Galantamin referans madde olarak kullanıldı. Deneyler üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı. IC_{50} değerleri GraphPad Prism 7.00 programından yararlanılarak hesaplandı. Test edilen maddelerin arasındaki farkın değerlendirilmesinde Student's t testinden yararlanıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edildi. Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

Lineweaver-Burk doğruları çizildi ve K_i değerleri 3-2 ve 3-3 denklemlerden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{Yarışmalı inhibisyon için: } K_M^I = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (3-2)$$

$$\text{Ankompetitif inhibisyon için: } V_{Max} = V_{Max}^I \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (3-3)$$

4. BULGULAR

Midye hemolenfinden AChE'nin çöktürülebileceği en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun saptanması için yapılan deneylerin sonuçları Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1: Amonyum sülfat kesitinin belirlenmesi.

	Aktivite (U/ml)						
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	%25	% 30	% 35	% 40	% 45	% 50	% 55
Supernatant	0,180	0,165	0,126	0,060	0,048	0,028	0,018
Pellet	0,101	0,130	0,151	0,259	0,290	0,290	0,290

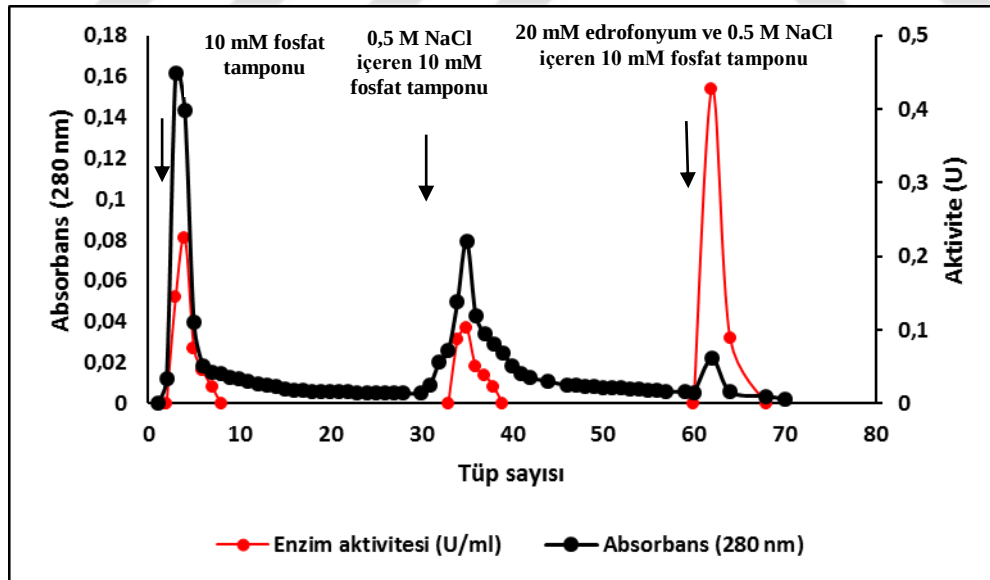
Midye hemolenfinden % 45 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürmek suretiyle elde edilen ve asetilkolinesteraz aktivitesi gösteren 2 mg protein içeren 2,5 ml hacimdeki fraksiyon 60 ml/saat akış hızıyla edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kromatografisine uygulandı ve 20 mM edrofonyum ve 0,5 M NaCl içeren 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile gerçekleştirilen elüsyon sonucu enzim elde edildi. AChE'nin elüsyon grafiğini çizebilmek için her bir tüpteki elüatın enzim aktivitesi ve 280 nm'deki absorpsiyonu ölçüldü.

Ham ekstre % 45 amonyum sülfat kesitinin afinite kolon kromatografisi elüsyon grafiği ise Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Midye hemolenfinden AChE'nin elde edilme sürecindeki işlem basamakları Tablo 4.2'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2: Asetilkolinesteraz enziminin midye hemolenfinden elde edilme basamakları.

Fraksiyon	Hacim (ml)	Protein (mg)	Total aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma oranı
Ham ekstre	24	21,4	5,0	0,23	100	1
% 45 (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5	2	1,4	0,7	28	3,0
20 mM Edrofonyum-Sefaroz 6B (Midye AChE)	2	0,05	0,15	3	3	13



Şekil 4.1: Midye hemolenfinden % 45 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürülen fraksiyonun edrofonyum-Sefaroz 6B kolonundaki elüsyon grafiği.

Kolon hacmi: 1 x 10 cm (8,6 ml), örnek hacmi: 2,5 ml (2 mg protein), akış hızı 60 ml/saat, Tamponlar: 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,4); 20 mM edrofonyum içeren 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,4); 0,5 M NaCl içeren 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,4).

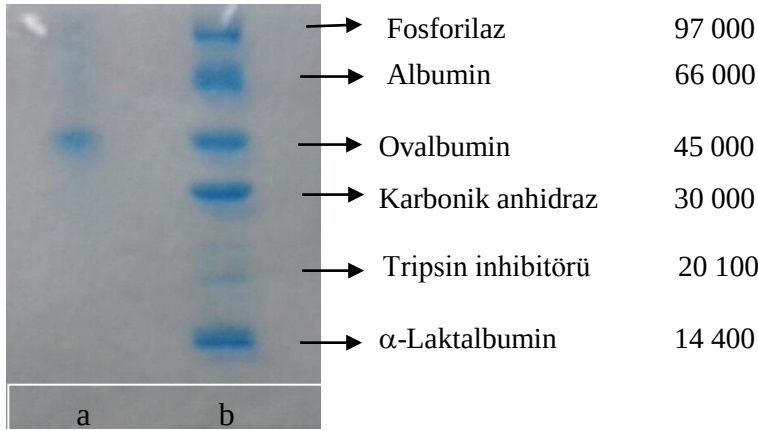
Edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kromatografisi ile elde edilen elüatının saf olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan SDS-poliakrilamid jel elektroforezindeki tek protein bandı Şekil 4.2’de görülmektedir.



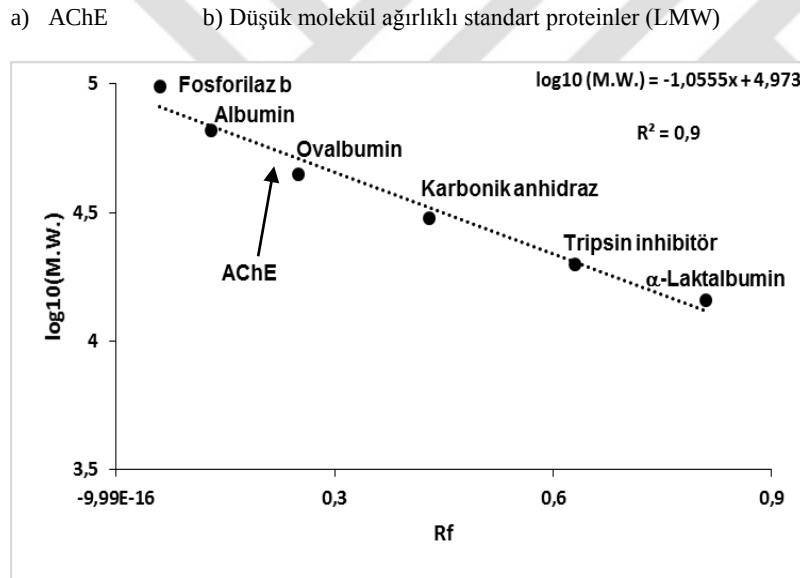
Şekil 4.2: SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde görülen protein bandları.

a) Ham ekstre b) % 45 amonyum sülfat kesiti c) Midye AChE

Denatüre edici şartlar altında çalışılan SDS-PAGE’de saflaştırılan midye AChE tekrar tek protein bandı şeklindeilerledi (Şekil 4.3). Midye AChE’nin molekül ağırlığı 51 000 dalton olarak bulundu (Şekil 4.4).



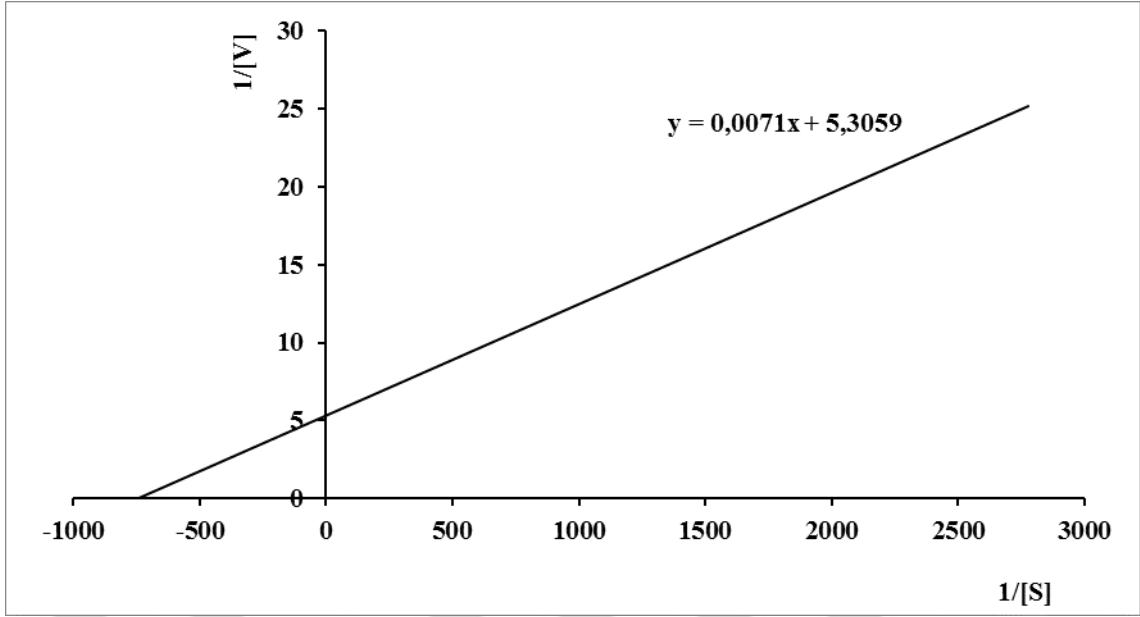
Şekil 4.3: Afinite kromatografisi ile elde edilen AChE elüatının, düşük molekül ağırlıklı standart proteinlerle karşılaştırmalı olarak denatüre edici şartlar altında çalışılan SDS-PAGE'deki protein bantları.



Şekil 4.4: Düşük molekül ağırlıklı standart proteinlerin SDS-PAGE standart eğrisi ve regresyon denklemi.

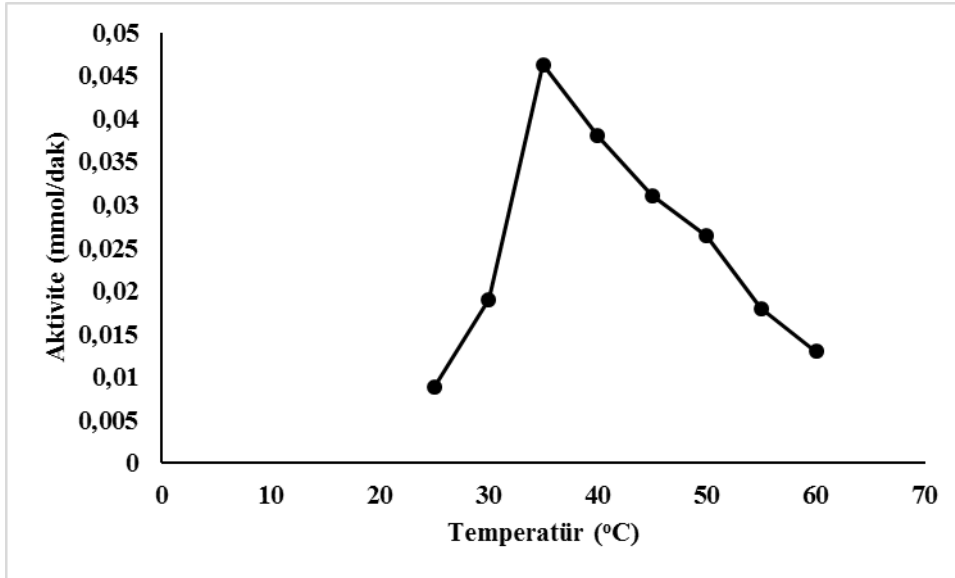
Düşük molekül ağırlıklı standart proteinler (LMW): fosforilaz b (MW 97 000), albumin (MW 66 000), ovalbumin (45 000), karbonik anhidraz (MW 30 000), tripsin inhibitör (MW 20 100) ve α -laktalbumin (MW 14 400).

Substrat konsantrasyonunun asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesinde, bu enzimin asetiltiyokoline karşı K_m değerinin 1,3 mM, V_{max} değerinin ise 0,188 mM/dak/mg olarak bulundu (Şekil 4.5).



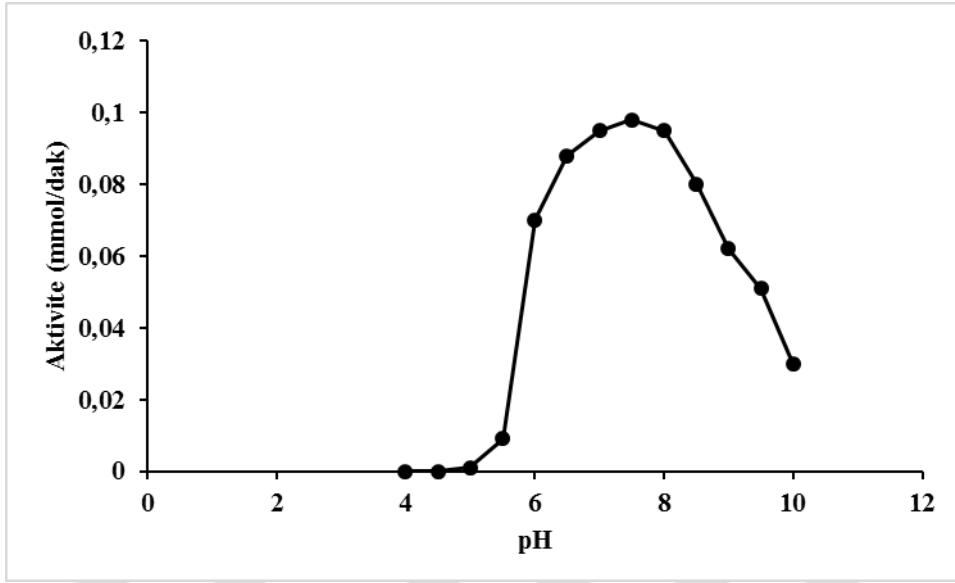
Şekil 4.5: Asetiltiyokolin konsantrasyonunun asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine etkisi ($1/K_m = -742,92$; $1/V_{max} = 5,30$).

AChE enziminin aktivitesi 25-60°C arasında incelenmesi sonucunda, enzimin optimum temperaturünün 35°C olduğu saptandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Temperaturün AChE enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

Asetilkolinesterazın değişik pH'larda (pH 5-10) aktivitesinin incelenmesi sonucunda, enzimin maksimum aktiviteyi pH 7,5'da gösterdiği bulundu (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: pH'nın AChE enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

Metoksiflavonların AChE enzimine karşı IC_{50} ve K_i değerleri Tablo 4.3'te gösterildi.

Tablo 4.3: Metoksiflavonların inhibisyon aktiviteleri.

Substrat	IC_{50} (mg/ml)	K_i (mg/ml)
Hispidulin	$0,033 \pm 0,005^a$	$3,6 \times 10^{-2}$
5-Hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon	$0,019 \pm 0,002^b$	10^{-2}
Gnafalin	$0,016 \pm 0,003^b$	$9,4 \times 10^{-3}$
Galantamin	$0,024 \pm 0,003^a$	2×10^{-2}

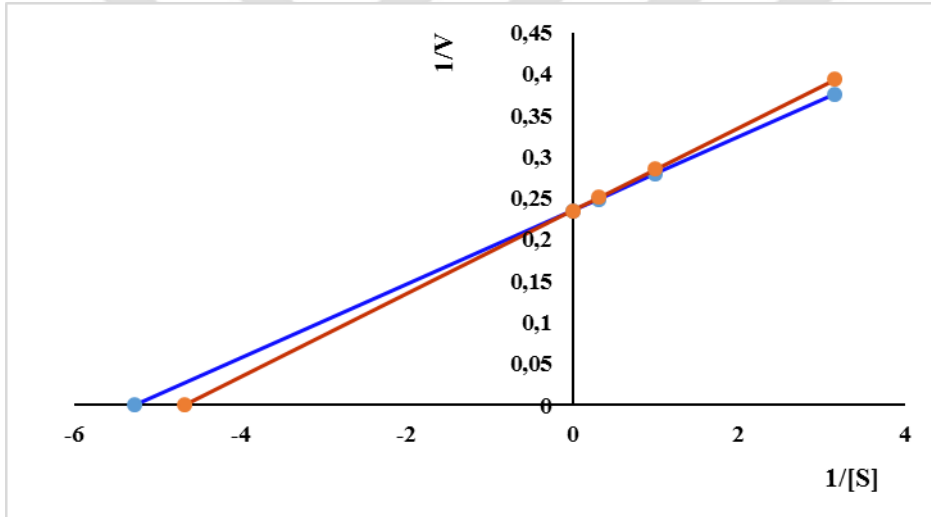
Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

Aynı sütün içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir

IC_{50} değerleri (AChE aktivitesinin % 50'sini inhibe eden inhibitör konsantrasyonu) kıyaslandığında en yüksek aktiviteyi IC_{50} değeri $0,019 \pm 0,002$ mg/ml

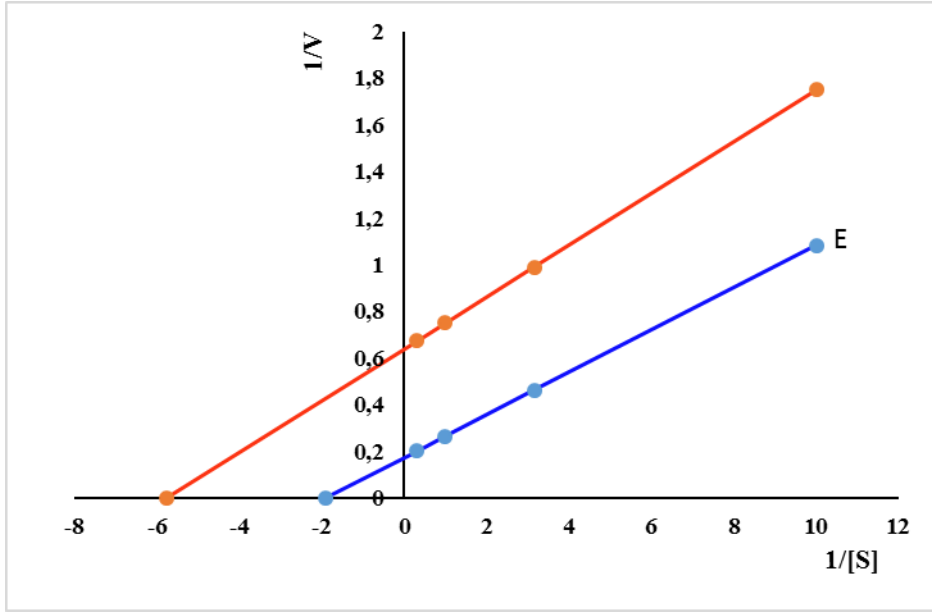
ve $0,016 \pm 0,003$ mg/ml olan ve aralarındaki anlamsız ($p > 0,05$) farklılığından da anlaşıldığı gibi benzer etkiye sahip olan gnafalin ve 5-hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon'un olduğu tespit edildi. Gnafalin ve 5-hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon'un inhibe edici aktivitesi referans olarak kullanılan galantaminin aktivitesinden daha yüksek olduğu saptandı ($p < 0,05$).

İnhibitörsüz reaksiyonla karşılaştırıldığında, 5-hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon varlığında V_{max} 'ın değişmediği, fakat K_m 'in $(1 + [I]/K_i)$ faktörü kadar büyüdüğü görüldü. Bundan dolayı 5-hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon'un kompetitif inhibitör olduğu sonucuna varıldı. 5-hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon'un varlığında Lineweaver-Burk eğrisi Şekil 4.8'de gösterildi.

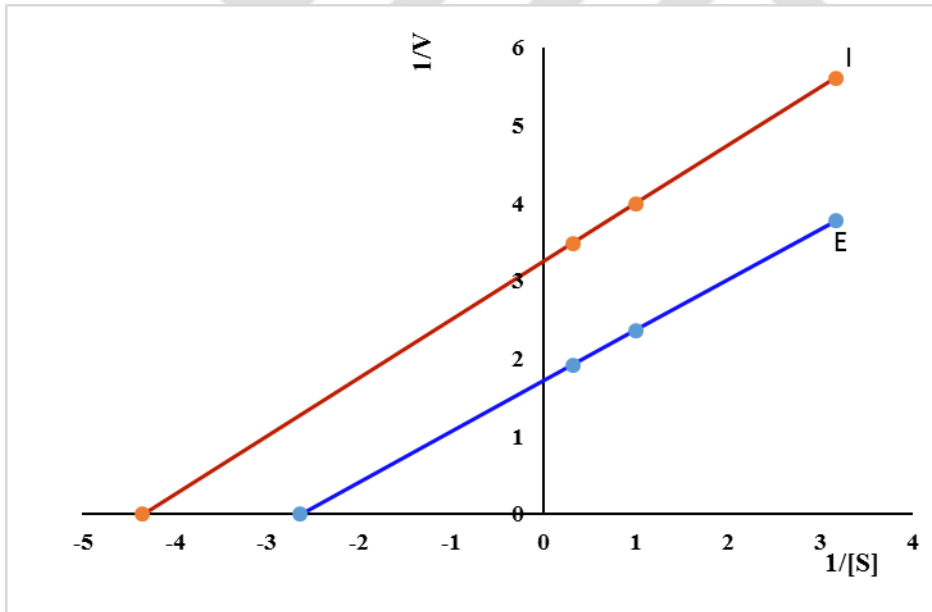


Şekil 4.8: 5-Hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon'a (1 mg/ml) ait Lineweaver-Burk grafiği ($K_i = 10^{-2}$ mg/ml).

İnhibitörsüz reaksiyonla karşılaştırıldığında hispidulin ve gnafalin varlığında V_{max} ve K_m aynı faktörle azaldığı görüldü, doğruların eğiminin inhibitörsüz grafiklerle aynı olduğu, her iki eksen kesim noktalarının $(1 + [I]/K_i)$ faktörü ile arttığı görüldü. Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterilen Lineweaver-Burk eğrilerinin eğiminin değişmediği, fakat her ikisinin kesim noktalarının değiştiği görüldü. Hispidulin ve gnafalinin ankompetitif inhibitörler oldukları sonucuna varıldı.



Şekil 4.9: Hispiduline (2 mg/ml) ait Lineweaver-Burk grafiği ($K_i = 3,6 \times 10^{-2}$ mg/ml).



Şekil 4.10: Gnafaline (1 mg/ml) ait Lineweaver-Burk grafiği ($K_i = 2 \times 10^{-2}$ mg/ml).

5. TARTIŞMA

1939 yılında Nachmansohn ve Lederer elektrik balığı *Torpedo marmorata*'nın elektrik dokusundan hazırlanan özütünde çok yüksek AChE aktivitesi gözlemlenmiştir (Leuzinger ve Baker, 1967). AChE'nin özellikleri hakkındaki ilk bilgiler *Electrophorus electricus* yılan balığının elektrik dokusundan elde edilen ve saflaştırılan AChE eziminden elde edilmiştir (Lawler, 1961). Bugüne kadar insan (Novales ve ark., 1994; Kaya ve ark., 2013), sığır (Ralston ve ark., 1985), koyun (Askar ve ark., 2011), bildircin (Son ve ark., 2002), fare (Marchot ve ark., 1996; Gomez ve ark., 2003), balık (Carroll ve ark., 1995; Ding ve ark., 2011; Tham ve ark., 2014; Sabullah ve ark., 2015), örümcek (Ma ve ark., 2011), parazitik solucanları (Griggs ve ark., 1997; Mohamed ve ark., 2016), yer solucanı (Du ve Dong, 1986) mısır kökü kurdu (Gao ve ark., 1998a), sülük (Talesa ve ark., 1995), pamuk kurdu (Gao ve ark., 1998b), pamuk yaprağı biti (Li ve Han, 2002)'nin çeşitli organ, doku ve biyolojik sıvılarından AChE elde edilmesi ve özelliklerin incelenmesiyle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır.

AChE elde edilmesinde çeşitli biyokimyasal saflaştırma yöntemlerinden yararlanılmıştır. AChE amonyum sülfat ile çöktürme (Ma ve ark., 2011; Ding ve ark., 2011), DEAE sellüloz (Ding ve ark., 2011) iyon değiştirici kolon kromatografisi, Sephadex G-100 (Ding ve ark., 2011); Sephadex G-200 jel filtrasyon (Li ve Han, 2002) gibi ayırma yöntemlerinin kullanılmasıyla çeşitli kaynaklardan elde edilmiştir. Son yıllarda afinite kromatografisinin uygulanması AChE saflaştırma işleminin hızlandırılmasına olanak sağlamıştır. Adsorban olarak Sepharose 4B veya concanavalin A (Son ve ark., 2002; Askar ve ark., 2011), ligand olarak tacrine (Carroll ve ark., 1995; Askar ve ark., 2011), procainamid (Novales, 1994; Li ve Han, 2002), edrophonium (Talesa ve ark., 1995; Son ve ark., 2002; Askar ve ark., 2011; Hodgson ve Chubb, 1983b) *m*-tri methylaminophenylamine (Marchot ve ark., 1996), ve 9-[*N*-β-(ε-aminocaproyl)-β-aminopropylamino]-acridinium bromid (Griggs ve ark., 1997) kullanılmasıyla spesifik aktivitesi yüksek olan AChE elde edilmiştir.

Bu çalışmada midye hemolenfinden AChE enzimi % 45 amonyum sülfatla çöktürülerek, elde edilen fraksiyona afinite kromatografisinin uygulanmasıyla saf olarak elde edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda AChE'nin % 36, 45 ve 58 amonyum sülfat

oranında çöktürüldüğü bildirilmiştir (Du ve Dong, 1986). Bu çalışmadaki sonuçlar, *Oreochromis aurea* balığının beyin dokusundan ve bir örümcek cinsi olan *Pardosa astrigera* L. Koch'ın başı ve uzantısından AChE'nin çöktürülmesinde kullanılan % 45 (Ma ve ark., 2011) ve % 50 (Ding ve ark., 2011) amonyum sülfat konsantrasyon bulguları ile uyum göstermektedir.

Asetilkolinesterazın, bazı inhibitörlere karşı hassasiyeti, yüksek konsantrasyondaki asetilkolin tarafından inhibe edilmesi ve substrat spesifitesi bakımından diğer kolinesterazlardan ayırt edilebilir. Bu nedenle AChE'nin saflaştırılmasında doğru substrat ve inhibitörün seçimi büyük önem taşımaktadır (Hodgson ve Chubb, 1983a).

Enzimin saflaştırılmasında kullanılan afinite kromatografisinin temel ilkesi, suda çözünmeyen, enzimin geçişine izin verecek boyutta gözenekli, küresel tanecikli ve inert dolgu maddesine (Sefaroz), enzimin bir inhibitörünün kovalent olarak bağlanmasıdır. Ligand olarak kullanılan ve kuaterner bir amin olan edrofonyum, epoksi active edilmiş Sefaroz ile alkali şartlarda reaksiyona girerek matrikse bağlanır ve böylece adsorbe olur. Edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kolonuna sadece AChE'nin çözünebilen (G_4H AChE) formu bağlanabilmektedir. Amfifilik formlar, matrikse bağlanmadıkları için bu formların izolasyonunda edrofonyum-Sefaroz afinite kromatografisi uygun bir yöntem değildir. *M. galloprovincialis* hemolenfindeki ChE aktivitesinin % 80'i çözünen formda bulunduğu Talesa ve ark. (2001) tarafından bildirilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada bu yöntem kullanılmıştır.

Kolona tatbik edilen % 45 amonyum sülfat fraksiyonundaki AChE'nin, elüsyon tamponuna tersinir inhibitör olan edrofonyum katılarak elüe olması sağlanır (Berman ve Young, 1971). Bu metod koyun karaciğeri (Askar ve ark., 2011), Japon bıldırcın beyini (Son ve ark., 2002), sülük (Talesa ve ark. 1995) AChE'lerinin saflaştırılmasında da tercih edilen bir yöntemdir.

AChE' lar genellikle pH 7,5 ile 8 arasında optimum pH göstermektedir (Ma ve ark., 2011; Ding ve ark., 2011). Bu çalışmada midye AChE'nin 7,5 olarak bulunan optimal pH değeri literatür bilgileriyle uyum göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda AChE enzimi optimum aktiviteyi 35°C - 40 °C arasında gösterdiği bulunmuştur (Ding ve ark., 2011). Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz AChE enzimi optimum aktiviteyi 35 °C'de göstermiştir. Bu sonuç yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir.

Daha önceki çalışmalarda Adriatik denizinden toplanan *Mytilus galloprovincialis* midye türünün hemolenfinden saflaştırılan 68 kDa'luk molekül ağırlığındaki AChE'dan (Talesa ve ark., 2001) farklı olarak bu çalışmada SDS-PAGE'inde tek bant gösteren saflıkta elde edilen AChE'nin molekül ağırlığı 51 kDa olduğu belirlenmiştir. Japon bıldırcın beyni (62,5 kDa) (Son ve ark., 2002), insan beyni (66 kDa) (Zhu ve ark., 1993), *Pardosa astrigera* L. Koch örümceği (Ma ve ark., 2011) (66,35 kDa) ve *Torpedo californica* (71–82 kDa) (Lwebuga-Mukasa ve ark., 1976) AChE'lerinde daha küçük, elektrik balığın elektrik organındaki AChE'nin molekül ağırlığına (25–59 kDa) (Dudai ve Silman, 1974) yakın bulunmuştur.

Midye hemolenfi AChE'nin asetiltiyokolin'e karşı gösterdiği en yüksek reaksiyon hızı ve Km değeri, *Oreochromis aurea*'balığının beyin dokusunda (0,183 mmol/L) (Ding ve ark., 2011), *Nebia albiflora* kasında (0,10 mmol/L) (Shi ve ark., 1981), *Scomberomorus niphonius* beyin dokusunda (0,311 mmol/L) (Zhu ve ark., 2006), ve *Pseudosciaena crocea* kasında (0,125 mmol/L) (Dong, 1995) bulunan AChE ile kıyaslandığında daha yüksek Km değerine, sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Bugüne kadar yapılan araştırmalar gözönüne alınırsa, özellikle flavonoidler gibi birçok fenolik bileşiğin farklı bitkilerden saf olarak elde edildikten ve özelliklerinin ayrıntılı bir biçimde belirlendikten sonra AChE inhibe edici aktivitelerinin incelendiği görülmektedir (Roseiro ve ark., 2012). Bu tezde incelenen metoksiflavonların (hispidulin, 5-hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon ve gnafalin) AChE inhibe edici etkileri ile ilgili herhangi bir bilgiye literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada her üç bileşik çok güçlü bir AChE aktivitesi göstermiştir, fakat 5-hidroksi-6,7,8'4'-tetrametoksiflavon geri dönüşümlü olarak AChE'ı inhibe ettiği için, klinik çalışmalarda potansiyel bir ilaç adayı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abramson, S.N., Radic, Z., Manker, D., Faulkner, D.J., Taylor, P. (1989). Onchidal: A naturally occurring irreversible inhibitor of acetylcholinesterase with a novel mechanism of action. *Molecular Pharmacology*, **36**, 349-354.

Alles, G.A., ve Hawes, R.C. (1940). Cholinesterases in the blood of man. *Journal of Biological Chemistry*, **133**, 375-390.

Arisan-Ataç, İ., Kuşçu, İ., Berkkan, H. (1994). α -D-Glucosidase activities in the mantle tissue of the mussel *Mytilus galloprovincialis* L., *Acta Pharmaceutica Turcica*, **36**, 53-58.

Askar, K.A., Kudi, A.C., ve Moody, A.J. (2011). Purification of soluble acetylcholinesterase from sheep liver by Affinity chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **165**, 336-346.

Berman, J.D., ve Young, M. (1971). Rapid and Complete Purification of Acetylcholinesterases of electric eel and erythrocyte by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **68**, 395-398.

Botti, S.A., Felder, C.E., Sussman, J.L., ve Silman, I. (1998). Electrotactins: a class of adhesion proteins with conserved electrostatic and structural motifs. *Protein Engineering*, **11(6)**, 415-420.

Bourne, Y., Taylor, P., Radic, Z., ve Marchot, P. (2003). Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *EMBO Journal*, **22**, 1-12.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.

Can, A., Akev, N., Askhasi, A. (2000). Partial purification and characterization of aspartate aminotransferase from the hepatopancreas of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. *İstanbul Ecz. Fak. Mec.* **33**, 37-48.

Carroll, R.T., Grimm, J.L., Hepburn, T.W., ve Emmerling, M.R. (1995). Purification of acetylcholinesterase by tacrine affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, **6**, 389-393.

Chatonnet, A. ve Lockridge, O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal*, **260**, 625-634.

Chen, V. P., Luk, W. K. W., Chan, W. K. B., Leung, K. W., Guo, A. J. Y., Chan, G. K. L., ve ark. (2011). Molecular assembly and biosynthesis of acetylcholinesterase in brain and muscle: the roles of t-peptide, FHB domain, and N-linked glycosylation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **4**, 1-8.

Čolović, M.B., Krstić, D.Z., Lazarević-Pašti, T.D., Bondžić, A.M., ve Vasić, V.M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, **11**, 315-335.

Dall'Acqua, S. (2013). Plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids for the treatment of Alzheimer's disease. *Botanics: Targets and Therapy*, **3**, 19-28.

Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Vuorela, H., ve Hiltunen, R. (2007). Plants as potential sources for drug development against Alzheimer's disease. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, **1**, 83-104.

Ding, Y.H., Wu, X.M. ve Fang, J.B. (2011). Purification and characterization of acetylcholinesterase from brain tissues of *Oreochromis aurea* and its application in environmental pesticide monitoring. *Sciences in Cold and Arid Regions*, **3**, 0339-0343.

Dong, Z.H. (1995). Purification of cholinesterase from *Pseudosciaena crocea* muscle. *Chinese Biochemical Journal*, **11(4)**, 487-489.

Du, Z.H. ve Dong, S.J. (1986). Purification of cholinesterase of earthworm by affinity chromatography. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, **1**, 28-32.

Dudai, Y., ve Silman, I. (1974). The molecular weight and subunit structure of acetylcholinesterase preparations from the electric organ of the electric EEL. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **59**, 117-124.

Dvir, H., Harel, M., Bon, S., Liu, W.-Q., Vidal, M., Garbay, C. ve ark. (2004). The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. *The EMBO Journal*, **23**, 4394–4405.

Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L. ve Sussman, J.L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, **187**, 10-22.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. ve Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88-95.

Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M. ve Wilcock, K.G. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **66**, 137-147.

Gao, J.R., Rao, J.V., Wilde, G.E. ve Zhu, K.Y. (1998a). Purification and kinetic analysis of acetylcholinesterase from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **39**, 118-125.

Gao, X.W., Zhou, X.G., Wang, R.J. ve Zheng, B.Z. (1998b). Distribution and purification of acetylcholinesterase in cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, **41**, 21-25.

García-Ayllón, M.S., Small, D.H., Avila J ve Sáez-Valero, J. (2011). Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross-talk with P-tau and β -amyloid. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **4**, 1-9.

Giller, E. Jr ve Schwartz, J. H. (1971). Acetylcholinesterase in identified neurons of the abdominal ganglion of *Aplysia californica*. *Journal of Neurophysiology*, **34**, 108-115.

Gomez, J.L., Nieto-Cerón, Campoy, F.J., Muñoz-Delgado, E. ve Vidal, C.J. (2003). Purification and properties of hydrophilic dimers of acetylcholinesterase from mouse erythrocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **35**, 1109-1118.

Greenblatt, H.M., Dvir, H., Silman, I. ve Sussman, J.L. (2003). Acetylcholinesterase. *Journal of Molecular Neuroscience*, **20**, 369-383.

Grienke, U., Silke, J. ve Tasdemir, D. (2014). Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. *Food Chemistry*, **142**, 48-60.

Griggs, M.E., Tang, L., Hussein, A.S. ve Selkirk, M.E. (1997). Purification and properties of monomeric (G1) forms of acetylcholinesterase secreted by *Nippostrongylus brasiliensis*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **90**, 513-524.

Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T.L., Mallender, W.D., Lewis, T., Fletcher, R.J. ve ark. (2000). Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science*, **9**(6), 1063-1072.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, **96**, 67-202.

Hodgson, A.J. ve Chubb, I.W. (1983a). A Method for the detection and quantitation of secretory acetylcholinesterase. *Neurochemical Pathology*, **1**, 212-218.

Hodgson, A.J. ve Chubb, I.W. (1983b). Isolation of the secretory form of soluble acetylcholinesterase by using affinity chromatography on edrophonium-Sepharose. *Journal of Neurochemistry*, **41**, 654-662.

Holmes, C., Jones, S.A., Budd, T.C. ve Greenfield, S.A. (1997). Non-cholinergic, trophic action of recombinant acetylcholinesterase on mid-brain dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience Research*, **49**, 207-218.

Houghton, P.J., Ren, Y. ve Howes, M.J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Report*, **23**, 181-199.

Hrabovska, A., Duysen, E.G., Sanders, J.D., Murrin, L.C. ve Lockridge, O. (2005). Delivery of human acetylcholinesterase by adeno-associated virus to the acetylcholinesterase knockout mouse. *Chemico-Biological Interaction*, **157-158**, 71-78.

Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Perez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C. ve ark. (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-*b*-peptides into Alzheimer's fibrils: Possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, **16**, 881-891.

Johnson, G. ve Moore, S.W. (2006). Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells *in vitro*. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **18**, 781-790.

Kawashima, K. ve Fujii, T. (2000). Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology & Therapeutics*, **86**, 29-48.

Kaya, H.B., Özcan, B., Şişecioğlu, M. ve Özdemir, H. (2013). Purification of acetylcholinesterase by 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine from human erythrocytes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **170**, 198-209.

Kryger, G., Harel, M., Giles, K., Toke, L., Velan, B., Lazar, A. ve ark. (2000). Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **56**, 1385–1394.

Küçükkılınç, T.T. (2014). Organofosfat zehirlenmelerinde asetilkolinesterazın biyotemizleyici olarak kullanılma olasılığı. Review Article. *Türk Biyokimya Dergisi*, **39(2)**, 126–131.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*, **227**, 680-685.

Lawler, H.C. (1961). Turnover time of acetylcholinesterase. *The Journal of Biological Chemistry*, **236**, 2296-2301.

Leuzinger, W., ve Baker, A.L. (1967). Acetylcholinesterase, I. Large-scale purification, homogeneity, and amino acid analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **57**, 446–451.

Li, F. ve Han, Z. (2002). Purification and characterization of acetylcholinesterase from cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **51**, 37-45.

Lwebuga-Mukasa, J. S., Lappi, S. ve Taylor, P. (1976) Molecular forms of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: their relation to synaptic membranes. *Biochemistry*, **15**, 1425–1434.

Ma, M., Zhang, B. ve Li, S.-C. (2011). Purification and partial characterization of acetylcholinesterase from *Pardosa astrigera* L. Koch. *Journal of Cell and Animal Biology*, **5**, 11-16.

Marchot, P., Ravelli, R.B.G., Raves, M.L., Bourne, Y., Vellom, D.C., Kanter, J. ve ark. (1996). Soluble monomeric acetylcholinesterase from mouse: expression, purification and crystallization in complex with fasciculin. *Protein Science*, **5**, 672-679.

Marnay, A. ve Nachmansohn, D. (1937). Cholinesterase in voluntary frog's muscle. *The Journal of Physiology*, **89(4)**, 359-367.

Massoulié, J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, **11**, 130-143.

Massoulié, J., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Morel, N. ve ark. (1999). The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chemico-Biological Interactions*, **119-120**, 29-42.

Massoulié, J., Bon, S., Perrier, N. ve Falasca, C. (2005). The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chemico-Biological Interactions*, **157-158**, 3-14.

Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. ve François, M.V. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, **41**, 31-91.

Mohamed, M.A., Mahdy, E.M.E. ve Ghazy, A.M. (2016). The activity of detoxifying enzymes in the infective juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora* strains: Purification and characterization of two acetylcholinesterases. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **180**, 11-22.

Moreira, S.M., Coimbra, J. ve Guilhermino, L. (2001). Acetylcholinesterase of *Mytilus galloprovincialis* LmK. hemolymph: A suitable environmental biomarker. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **67**, 470-475.

Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M. ve Houghton, P.J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, **14**, 289-300.

Nalivaeva, N.N. ve Turner, A.J. (2001). Post-translational modifications of proteins: Acetylcholinesterase as a model system. *Proteomics*, **1**, 735-747.

Novales, L.P. (1994). Comparison of standard chromatographic procedures for the optimal purification of soluble human brain acetylcholinesterase. *Biomedical Chromatography*, **8**, 259-266.

Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M.I. ve Khalid, A. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **91**, 57-60.

Özkay, Ü.D., Öztürk, Y. ve Can, Ö.D. (2011). Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **18(1)**, 35-42.

Özsoy, N., Berkkan, H. (1997). β -Glucosidase activities in the mantle tissue of the mussel *Mytilus galloprovincialis* L. *Acta Pharmaceutica Turcica*, **39(3)**, 99-103.

Paraoanu, L.E. ve Layer, P.G. 2008. Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation. *FEBS Journal*, **285**, 618-624.

Pezzementi, L., Nachon, F. ve Chatonnet, A. (2011). Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: An atypical butyrylcholinesterase from the medaka *Oryzias latipes*. *Plos One*, **6**, 1-16, e17396.

Quinn, D.M. (1987). Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, **87**, 955-979.

Ralston, J.S., Rush, R.S., Doctor, P.B., Wolfe D. (1985). Acetylcholines from fetal bovine serum. *The Journal of Biological Chemistry*, **260**, 4312-4318.

Roseiro, L.B., Rauter, A.P., Serralheiro, M.L.M. (2012). Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. *Nutrition and Aging*, **1**, 99-111.

Sabullah, M.K., Sulaiman, M.R., Shukor, M.S., Yusof, M.T., Johari, W.L.W., Shukor, M.Y. ve ark. (2015). Heavy metals biomonitoring via inhibitive assay of acetylcholinesterase from *Periophthalmodon schlosseri*. *Rendiconti Lincei*, **26**, 151-158.

Schumacher, M., Kelkel, M., Dicato, M. ve Diederich, M. (2011). Gold from the sea: Marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. *Biotechnology Advances*, **29**, 531-547.

Shi, S.P. ve Zhang, J.Y. (1981). Purification and some properties of cholinesterase from *Nebia albiflora* muscle. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **13(1)**, 10–16.

Somar, N., Özsoy, N., Berkkan, H. (2000). β -Galactosidase activity in the mantle tissue of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Acta Pharmaceutica Turcica*, **42(2,3)**, 80-84.

Son, J.Y., Shin, S., Choi, K.H. ve Park, I.K. (2002). Purification of soluble acetylcholinesterase from Japanese quail brain by affinity chromatography. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **34**, 204–210.

Soreq, H. ve Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, **2(9)**, 294-302.

Soreq, H., Patinkin, D., Lev-Lehman, E., Grifman, M., Girzberg, D., Eckstein, F. ve ark. (1994). Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 7907-7911.

Srivatsan, M. ve Peretz, B. (1997). Acetylcholinesterase promotes regeneration of neurites in cultured adult neurons of *Aplysia*. *Neuroscience*, **77**, 9211-9231.

Stedman, E. ve Easson, L.H. (1932). Cholinesterase an enzyme present in the blood serum of the horse. *Biochemical Journal*, **47**, 121-177.

Sternfeld, M., Ming, G., Song, H., Sela, K., Timberg, R., Poo, M. ve ark. (1998). Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein and variable C termini. *Journal of Neuroscience*, **18(4)**, 1240-1249.

Sussman, J.L. ve Silman, I. (1992). Acetylcholinesterase: structure and use as a model for specific cation-protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, **2**, 721-729.

Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. ve ark. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, **253**, 872–879.

Taleb, Z.M., Benghali, S., Kaddour, A. ve Boutiba, Z. (2007). Monitoring the biological effects of pollution on the Algerian west coast using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanologia*, **49** (4), 543-564.

Talesa, V., Grauso, M., Giovannini, E. ve Toutant, J.P. (1995). Solubilization, molecular forms, purification and substrate specificity of two acetylcholinesterases in the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). *Biochemical Journal*, **306**, 687-692.

Talesa, V., Romani, R., Antognelli, C., Giovannini, E. ve Rosi, G. (2001). Soluble and membrane-bound acetylcholinesterases in *Mytilus galloprovincialis* (Pelecypoda: Filibranchia) from the northern Adriatic Sea. *Chemico-Biological Interaction*, **134**(2), 151-166.

Talesa, V., Romani, R., Antognelli, C., Giovannini, E. ve Rosi, G. (2002). Different expressions of organophosphate-resistant AChEs in the bivalve mollusk *Scapharca inaequivalvis* living in three different habitats. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(1), 102-108.

Taşkıran, Ş. (2005). The Synthesis and characteriation of 4'-Didodecylamino-3-hydroxyflavone as a florescence prob. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Tham, L.G., Halmi, M.I.E., Sharif, M.S.A., Perumal, N., Begum, C., Syed, M.A. ve ark. (2014). Sensitivity of crude and partially purified acethylcholinesterase from fish to carbamates and organophosphates. *Journal of Environmental Biology*, **35**, 285-287.

Wiesner, J., Kříž, Z., Kuča, K., Jun, D. ve Koča, J. (2007). Acetylcholinesterases-the structural similarities and differences. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **22**(4), 417-424.

Williams, R.J. ve Spencer, J.P.E. (2012). Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine*, **52**, 35-45.

Yalvaç, S., Kuşçu, İ. (1993). β -D-Galactosidase isoenzymes of *Mytilus galloprovincialis* L. *Acta Pharmaceutica Turcica*, **35**, 45-50.

Yang, L., He, H.Y. ve Zhang, X.J. (2002). Increased expression of intranuclear acetylcholinesterase involved in apoptosis of SK-N-SH cells. *Neuroscience Research*, **42**, 261-268.

Yaqin, H. ve Hansen, P.D. (2010). The use of cholinergic biomarker, cholinesterase activity of blue mussel *Mytilus edulis* to detect the effects of organophosphorous pesticides. *African Journal of Biochemistry Research*, **4(12)**, 265-272.

Zhang, X.J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J.P., He, H.Y., Jin, Q.H. ve ark. (2002). Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death & Differentiation*, **9**, 790-800.

Zhu, M., Xin, Y., Sun, M. ve Fang, Y. (1993). Purification and properties of acetylcholinesterase from human brain. *Life Sciences and Earth Sciences*, **10**, 1207-1215.

Zhu, X.S., Meng, F.P. ve He, D.H. (2006). Purification and partial biochemical characterization of acetylcholinesterase from *Scomberomorus niphonius* (Cuvier). *Journal of Qingdao University (Engineering Edition)*, **21(2)**, 35-41.

Zimmer, H.G. (2006). Otto Loewi and the chemical transmission of vagus stimulation in the heart. *Clinical Cardiology*, **29**, 135-136.