

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

80851

**İNSAN SERUM BUTİRİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTESİ
ÜZERİNE BENACTYZİNE VE DROFENİNE’NİN ETKİLERİ**

Ebru Bodur

Hacettepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitü Yönetmeliğinin
Biyokimya Programı İçin Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. A. Neşe Çokuğraş

80851

ANKARA

1999

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya programında Bilim Uzmanlığı tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. A. Neşe Çokuğraş
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye : Prof. Dr. E. Ferhan Tezcan
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye : Prof. Dr. Sezai Kuş
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye : Doç. Dr. Ediz Demirpençe
(Hacettepe Üniversitesi)

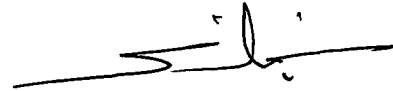


Üye : Yrd. Doç. Dr. Canan Bayar
(Hacettepe Üniversitesi)



ONAY:

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirtilen yukardaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. N. Sezgin İlgi
Enstitü Müdürü

ÖZET

Butirilkolinesteraz (BKE; açilkolin açilhidrolaz E.C. 3.1.1.8) insan serumundan % 55–70 asitli amonyum sülfat kesitlemesi ve Prokainamid–Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Örnek iki kez afinite kolonuna uygulanarak 17813 kez saflık sağlandı. Saflık kontrolü poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile yapıldı.

Substrat olarak butiriltiyokolin (BTK) kullanılarak, saflaştırılan enzimin benactyzine ve drofenine adlı ilaçlarla inhibisyon kinetikleri çalışıldı. Sabit bir BTK derişiminde artan benactyzine ve drofenine derişimlerinde ilk hızlar ölçülerek yapılan ön çalışmada, v değerlerine karşılık bu iki ilacın derişimleri grafikleldiğinde, benactyzine derişiminin artması ile hızın sıfıra ulaştığı gözlemlendi. Bu tip bir davranış kompetitif ya da lineer karışık tipteki inhibisyonlarda gözlenir. Drofenine ile 0.4 mM'ın üzerindeki derişimlerde deney ortamındaki bulanıklık yüzünden ölçüm yapılamadı.

Benactyzine'in inhibisyon tipini saptayabilmek için artan benactyzine derişimlerinde, fakat farklı ve sabit BTK derişimlerinde ilk hızlar ölçülerek $1/v$ değerlerine karşı $[I]$ değerleri grafikleldi. Çizilen grafikte farklı BTK derişimine ait doğruların ikinci bölgede kesiştiği gözlemlendi. Bu tip bir davranış hem kompetitif hem de lineer karışık tipte inhibisyonlarda gözlenir. Bu nedenle $[S]/v$ değerlerine karşı artan $[I]$ değerleri grafiklelenerek, elde edilen doğruların birbirine paralel olduğu saptandı. Bu sonuç inhibisyonun kompetitif olduğunu gösterir.

Artan BTK derişimlerinde drofenine'in farklı derişimleri ile yapılan deneyler sonucunda elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafikleri çizildiğinde doğruların $1/v$ ekseninde kesiştiği saptandı. Bu tip bir davranış kompetitif inhibisyonda gözlenir.

Systat (version 5.03, 1991) non-lineer regresyon analizi programı kullanılarak yapılan hesaplamalar ile benactyzine için K_i değeri 0.010 ± 0.001 mM, drofenine için ise 0.003 ± 0.000 mM olarak bulundu. Buna göre drofenine BKE'ın, benactyzine'den daha etkin bir kompetitif inhibitörüdür.

ABSTRACT

Butyrylcholinesterase (BChE; acylcholine acylhydrolase E.C. 3.1.1.8) was purified from human serum using the procedure including 55 – 70 % acidic ammonium sulfate precipitation and Procainamide-Sepharose 4B affinity chromatography. The enzyme was eluted twice from the affinity column yielding a final purity of 17813 which was verified by Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE).

Using butyrylthiocholine (BTCh) as substrate the inhibition kinetics of the purified enzyme with benactyzine and drofenine were studied. In a preliminary study using a constant concentration of BTCh with increasing concentrations of benactyzine and drofenine, it was found that as the concentration of benactyzine increased the rate of the reaction slowly decreased and finally reached zero. This type of behavior is observed in competitive and linear mixed type inhibition. For drofenine in concentrations above 0.4 mM the enzyme rate could not be determined due to turbidity.

For the determination of inhibition type of benactyzine, the initial velocity of the enzyme at increasing benactyzine concentrations using constant but different BTCh concentrations was determined and they were plotted in a graph of $1/v$ vs. $[I]$. It was found that the lines corresponding to different BTCh concentrations intersected in the second quadrant. This type of behavior can also be observed in both competitive and linear mixed type inhibitions. Therefore to differentiate the type of inhibition, a graph of $[S]/v$ vs. $[I]$ values was plotted, and the type of inhibition benactyzine was determined as competitive because the lines were found to be parallel to each other.

In the study with increasing BTCh concentrations but with constant and different drofenine concentrations, the data were plotted in a $1/v$ vs. $1/[S]$ graph and the lines were found to intersect at the $1/v$ axis. This type of behavior is observed as competitive inhibition.

The K_i values (dissociation constants of benactyzine and drofenine) were calculated to be 0.010 ± 0.001 mM and 0.003 ± 0.000

mM, respectively using Systat (version 5.03, 1991) non-linear regression analysis software package. According to these parameters drofenine is more potent competitive inhibitor of BChE than benactyzine.



TEŞEKKÜR

Yazar çalışmasına olan katkılarından dolayı aşağıda adı geçen kişilere teşekkür eder.

Sayın Prof. Dr. E. Ferhan Tezcan çalışmanın gerçekleşmesi için her türlü desteği sağlamıştır.

Sayın Doç. Dr. A. Neşe Çokuğraş tez danışmanlığımı yapmış ve çalışmanın her aşamasında büyük destek vermiştir.



İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
GİRİŞ.....	1
KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. BKE'ın Fizyolojik Önemi.....	4
2.2. BKE'ın Genetik Özellikleri.....	6
2.3. BKE'ın Protein Yapısı.....	9
2.4. BKE'ın Aktif Merkezi.....	11
2.5. BKE'ın Kinetik Özellikleri	14
2.6. BKE'ın İlaçlarla Etkileşimleri.....	16
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
3.1. Gereçler.....	21
3.2. Yöntemler.....	21
3.3. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	23
BULGULAR.....	24
4.1. BKE'ın Saflaştırılması.....	24
4.2. BKE'ın Elektforetik Özelliklerinin İncelenmesi	26
4.3. Kinetik Çalışmalar.....	31
TARTIŞMA.....	40
SONUÇLAR.....	45
KAYNAKLAR.....	46
EK BİLGİ	
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKE (AChE) :	Asetilkolinesteraz
BKE (BChE) :	Butirilkolinesteraz
BTK (BTCh) :	Butiriltiyokolin
ACh :	Asetilkolin
BCh :	Butirilkolin
DTNB :	5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
EDAC :	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
MOPS :	3-(N-morfolino) propan sülfonik asit
PAGE :	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
HMG-CoA :	Hidroksimetilglutaril-koenzim A
iso-OMPA :	Tetraisopropil pirofosforamid

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan BKE'nin gen yapısı.....	7
Şekil 2.2. BKE'nin monomer ve tetramer yapısı.....	9
Şekil 2.3. İnsan BKE'nin bir dimerinde karbohidrat zincirleri ve disülfid bağlarının yerleşimi.....	10
Şekil 2.4. G ₄ formundaki BKE'nin C ucu kısmi proteolizi ile inaktif hale dönüşümü.....	11
Şekil 2.5. BKE'nin aktif merkez yapısı.....	12
Şekil 2.6. BKE aktif merkez çukurunun içinde bir BTK molekülü ile beraber üstten görünümü.....	12
Şekil 2.7. Benactyzine ve drofenine yapısı.....	19
Şekil 4.1. İnsan serum BKE'nin Prokainamid-Sepharose 4B afinite kolonundan elusyonu.....	27
Şekil 4.2. Afinite kolonundan elde edilen enzim ile yapılan PAGE çalışmaları.....	28
Şekil 4.3. İnsan serum BKE'nin ikinci Prokainamid-Sepharose 4B afinite kolonundan elusyonu.....	29
Şekil 4.4. İkinci Afinite kolonundan elde edilen enzim ile yapılan PAGE çalışmaları.....	30
Şekil 4.5. BTK derişiminin insan BKE aktivitesine etkisi.....	32
Şekil 4.6. İnsan serum BKE'nin Lineweaver-Burk grafiğı.....	32
Şekil 4.7. 4 mM BTK derişiminde Benactyzine'nin insan serum BKE üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.8. Benactyzine'nin Dixon grafiğı.....	35
Şekil 4.9. Benactyzine'nin [S]/v karşı [I] grafiğı	36
Şekil 4.10. Benactyzine'nin Lineweaver – Burk grafiğı.....	37
Şekil 4.11. 4 mM BTK derişiminde serum BKE üzerine Drofenine etkisi.....	38

Şekil 4.12	Drofenine'nin Lineweaver-Burk grafiği	39
Şekil 5.1.	BKE aktif merkez girintisi hidrofobik boynu ve girintinin dibinde yer alan aktif merkezin fonksiyonel gruplarının şematik görüntüsü.....	43
Şekil 5.2.	BTK molekülü bağlamış aktif merkez yapısı.....	44



ÇİZELGELER DİZİNİ

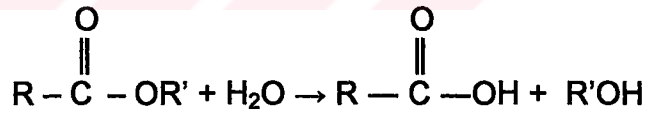
	Sayfa
Çizelge 2.1. İnsan BKE varyantlarının sınıflandırılması.....	8
Çizelge 2.2. Kolinesteraz inhibitörleri ile yapılan klinik denemeler.....	18
Çizelge 4.1. İnsan serum BKE'nin saflaştırılması.....	26
Çizelge 4.2. Benactyzine ve drofenine'e ait inhibisyon parametreleri....	33



GİRİŞ

Motor, otonom ve santral sinapslarda gerçekleşen kolinerjik sinirsel aktarım, süregelebilmesi için iletim maddesi olan asetilkolinin (ACh) hızlı olarak hidrolizini gerektirir. Bu hidroliz işlemi esas olarak sinaptik aralıklarda bulunan ve ACh'i substrat olarak diğer kolin esterlerine tercih eden Asetilkolinesteraz (AKE) (E. C. 3.1.1.7) tarafından gerçekleştirilir. Omurgalı hayvanların dokularında ve serumlarında, sinaps aralığındaki ACh derişiminin düzenlenmesinde yer aldığı düşünölen bir başka enzim tarif edilmiştir. Bu enzim substrat olarak butirilkolin ve diğer kolin esterlerine daha fazla afinite göstermesi nedeni ile butirilkolinesteraz (BKE) (açilkolin açilhidrolaz E.C. 3.1.1.8), psödokolinesteraz, non-spesifik kolinesteraz veya plazma kolinesterazı olarak adlandırılmakta ve substrat inhibisyonuna uğramayışı ile asetilkolinesterazdan ayrılmaktadır Heilborn (1).

İnsan serum BKE'in farklı substratlara olan afinitesi butiril > valeril > propiyonil > asetil > α-etil butiril > α-metil butiril şeklinde sıralanır Brown et al (2). Aşağıda BKE'in katalizlediğı genel tepkime gösterilmiştir. Bu tepkime kolin türevleri R' olarak verilmiştir.



Yapılan çalışmalar ile çeşitli türlerin birçok dokusunun BKE aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Friede (3) insanın da dahil olduğu dört farklı canlı türünün beyinlerindeki BKE dağılımı üzerine yaptığı çalışmasında beyaz madde ve glia hücrelerindeki BKE aktivitesinin, serebral kortekse oranla daha yoğun olduğunu saptamıştır. Ayrıca barsak, akciğer, plasenta, retina, kalp, karaciğer, iskelet kası, tükruk bezi ve böbrekte BKE varlığı belirlenmiştir L'Hermite et al., Walch et al., Layer et al., Chatonet ve Lockridge, Rhynänen et al.(4-8).

BKE varlığı plazma, beyin-omurilik sıvısı, plevra ve tükürük gibi vücut sıvılarında da tespit edilmiştir Chatonnet and Lockridge.; Huff et al.; Garcia – Pachon et al.; (7,9,10). Serum ise BKE'nin en yoğun bulunduğu biyolojik sıvıdır. BKE tüm serum proteinlerinin % 0.1' ini oluşturur Rhynäen et al (8). Karaciğerde sentezlenen enzim buradan dolaşıma salınmaktadır Prody et al (11).

BKE çeşitli dokularda farklı yapılarda bulunur. Çözünür ve sabit tipleri mevcuttur. En sık bulunan şekli, tetramer yapısındaki G_4 çözünür tipidir. Ayrıca G_1 monomerik ve G_2 dimerik formları, hidrofilik veya membrana bağlı biçimleri bulunabilir Massoulie et al (12).

İnsan serum BKE'ı glikoprotein yapısında, benzer alt birimlerden oluşmuş bir tetramerdir Lockridge (13). Tetramerin molekül ağırlığı 340.000'dir. Aktif merkeze yönelik çalışmalarda, BKE'nin her alt biriminde bir adet olmak üzere, enzimin molekülü başına dört aktif merkezin varlığı saptanmıştır Lockridge and La Du (14). BKE'nin aktif merkezi anyonik ve esteratik bölge olarak adlandırılan iki bölgeden oluşmaktadır Main et al (15). Esteratik bölge üzerinde, katalizde görev alan katalitik üçlü Ser 198, His 438, ve Glu 325 bulunur Harel et al (16)

BKE, organofosfatlar, sinir gazları, insektisit olarak kullanılan karbamatlar ve tedaviye yönelik ilaçların verdiği zararın teşhisinde belirleyici rol oynamaktadır. Enzim, karaciğerde sentezlenip dolaşıma salındığından karaciğer fonksiyon testlerinde yeri vardır. Çeşitli hastalıklarda örneğin; kanser, hepatit, nefrotik sendrom ve malnütrisyon gibi durumlarda enzimin serumdaki aktivitesi düşer Jkanović and Maksimovic (17).

BKE organofosfat yapısındaki maddelerin kısmi hidrolizini gerçekleştirebilen bir enzim olması nedeniyle çöpçü enzim (bioscavenger) olarak adlandırılmaktadır Ashani et al.; Broomfield et al (18,19). Son yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından BKE'nin sinir gazları, eroin, kokain gibi toksik

maddelerin detoksifikasyonundaki rolünü inceleyen çalışmalar yapılmaktadır Raveh et al. 1993; 1997; Gorelick (20-22).

Sunulan çalışmada insan serumundan BKE saflaştırılarak, enzimin elektroforetik özellikleri ve drofenine ve benactyzine adlı iki ilaç ile etkileşimleri incelenmiştir.



KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR

2.1. BKE'in Fizyolojik Önemi

Yarım asırdır BKE üzerine yoğun çalışmalar sürdürülmesine rağmen enzimin fizyolojik rolü bugüne dek tam olarak belirlenememiştir. Enzim üzerine yapılan araştırmalar arttıkça BKE'in birden fazla metabolik yolda, birden fazla biçimde yer aldığı düşünülmeye başlanmıştır.

BKE'in klasik rolü lokal anestezik olarak kullanılan süksinilkolini hidroliz etmesidir. BKE organizmada süksinilkolini parçalayabilen tek enzimdir. Süksinilkolin, ameliyatlarda genel anestezi öncesi kısa süreli kas gevşetici olarak kullanılır. BKE, intravenöz olarak verilen süksinilkolinin %90 kadarını çok kısa bir süre içerisinde parçalayarak sinir uçlarının depolarizasyonunu önler. Atipik adı verilen bir BKE varyantına sahip kişilerde süksinilkolin, yeteri kadar hızlı hidrolize edilememekte ve bunun sonucu apne görülmektedir. Literatürde koma ve ölümle sonuçlanan vakalar da bildirilmiştir. Bu nedenle anestezi öncesi kolinesteraz aktivitesi tayini rutin olarak yapılmaktadır Brown et al; Jkanović and Maksimovic (2, 17).

BKE'in lipid metabolizmasında henüz belirlenememiş bir rolü olduğu düşünülmektedir. Kutty et al (23) şişman, diyabetik ve normal fareler ile yaptıkları çalışmalarında, genetik olarak şişman veya diyabetik olan farelerin kontrollere oranla % 100 – 150 kez daha yüksek BKE aktiviteleri olduğunu saptamışlardır. Ayrıca yüksek kalorili bir diyet ile beslenen kontrol grubunda da benzer BKE aktivitesine rastlamışlardır. Diğer bir çalışmada ise hiperlipoproteinemik hastaların serumlarında BKE seviyelerindeki artışa paralel olarak HDL seviyesinin azaldığı saptanmıştır Jain et al (24). Hiperlipoproteinemiye karşı kullanılan ilaçlarla fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, hidroksimetilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörü olan simvastatin'in BKE seviyelerinde azalmaya yol açtığı bulunmuştur (25).

L'Hermite et al (4) yaptığı çalışmada sıçan barsağı epiteli kript hücreleri ve villuslarda BKE varlığını saptamıştır. Bu çalışmada

enterositlerdeki BKE dağılımı, bu dokuda sentezlenip ekzositoz yolu ile hücreler arası boşluğa salınan ve BKE içeren lipid damlacıkları ile gösterilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak araştırmacılar, BKE'nin lipid metabolizmasında ve enterositlerin yenilenmesi ile intestinal villuslara hareketinde rol oynayabileceği kanısına varmışlardır.

Alzheimer hastalığı yaşlı insanlarda zihinsel gerilemeye yol açan sendromlardan biridir. Beyinde gözlenen β -amiloyid plaklar şeklinde biriken β -amiloyid peptit, hastalığın başlıca patolojik bulgusudur. Bu hastalıkta gözlenen β -amiloyid plaklar ve nörofibril düğümlerin dış çevresinde BKE varlığına rastlanmıştır Gomez – Ramos P. and Moran M.A. (26). İnsan beyin beyaz maddesi ve nöroglial hücrelerde BKE aktivitesinin serebral kortekse göre daha fazla olduğu bilinmektedir Friede (3). Alzheimer hastalığında ise BKE varlığının serebral kortekste β -amiloyid plaklar etrafında gözlenmesi, enzimin bu hastalığın ayırıcı tanısında kullanılmasını mümkün kılmaktadır Wright et al (27). Yapılan çalışmalarda plaklar ve düğümler etrafındaki BKE aktivitesinin amiloyidden kaynaklanmadığı saptanmıştır Geula et al (28). Bu plakların Down sendromlu kişilerde de bulunduğu ama BKE içermedikleri gözlenmiştir. BKE'nin ancak olgunlaşmış plakların etrafında kümelendiğini saptayan Guillozet et al (29), enzimin sinirsel dejenerasyon ve klinik demans ile beraber gözlenen kompakt plak oluşumuna yol açabileceğini öne sürmektedir.

Son yıllarda nörogenez ve hücre proliferasyonunda BKE'nin rol oynadığına işaret eden araştırmalar yapılmıştır. Layer et al (30) sinir hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada BKE'nin enzimatik olmayan bir mekanizma ile sinir gelişimini düzenlediğini saptamışlardır. Robitzki et al (31) tavuk retinası hücrelerine transfekte edilen tavşan BKE geni ile yaptığı anti-sens DNA çalışmasında BKE m-RNA'sı ve proteini seviyelerinin azalması ile proliferasyonun durduğunu gözlemiştir. Embriyonik civciv retinası hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise morfogenez sırasında, önce BKE daha sonra AKE ekspresyonu olduğu saptanmış ve bu nedenle embriyogenezde BKE

ekspresyonunun AKE ekspresyonunu düzenleyebileceği öne sürülmüştür Layer et al (6).

BKE, Schwan hücrelerinin miyelin kılıflarında bulunmaktadır. Bazı kolinesteraz inhibitörlerinin demiyelinizasyona yol açtığı gözlenmiş ve bu gözlemden yola çıkarak BKE'nin myelin kılıfının korunması ve hatta tutunmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür Layer (32).

Escalera et al (33) Drosophila'dan nörotaktin adı verilen bir transmembran proteininin BKE'a benzediğini saptamışlardır. Nörotaktin bir sinir hücresi yapışma molekülü olup HNK-1 adı verilen bir şeker epitopu içermektedir. Tavuk serum, beyin BKE'ı ve Torpedo AKE'ı HNK-1 epitopu taşımaktadır. Bu nedenle BKE'ın sinir hücresi yapışma molekülü özelliğine sahip olabileceği düşünülmektedir.

BKE'ın kolinesteraz aktivitesinden ayrı olarak serotonin duyarlı aril akrilamidaz aktivitesine sahip olduğu ilk kez George ve Balasubramanian (34) tarafından gösterilmiştir. Ayrıca Chatonnet ve Masson (12) BKE'nin ikinci bir aktif merkezi olduğunu ve enzimin esas rolünün bu merkezdeki peptidaz aktivitesi olduğunu öne sürmüşlerdir. Ayrıca enzimin aktif merkezi üzerinde bir Zn^{+2} bağlama bölgesi bulunmuş (35) ve anabilim dalımızda Li^{+} , Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Al^{+3} gibi metal iyonları ile yapılan çalışmalarda bu metal iyonlarının hem beyin hem de serum BKE'ı üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu, inhibe edilmiş enzim formlarının ise Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağlayarak aktif forma dönüştüğü saptanmıştır Sarkarati ve ark., Çokuğraş and Tezcan 1991; 1993, Sarkarati et al (36-39).

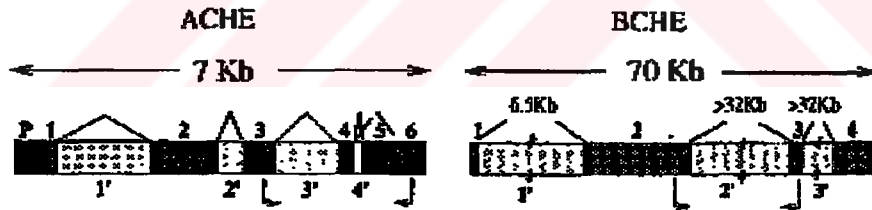
2.1 BKE'ın Genetik Özellikleri

İnsan BKE enziminin katalitik alt ünitesi tek bir gen tarafından kodlanmasına rağmen kromozomlarla yapılan in situ hibridizasyon çalışmalarında 3. ve 16. kromozomlarda lokalize iki bölge bulunmuştur Arparagaus et al.; Soreq et al.(40, 41). 3q2b bandında saptanan ve E₁ adı

verilen lokusun katalitik alt üniteye karşılık geldiği Gnatt et al (42) tarafından belirlenmiştir.

16. kromozomda lokalize E₂ bölgesi C₅⁺ atipik enzimin şifrelendiği bölge olarak düşünülmüştür. Ancak daha sonra yapılan çalışmalar ile C₅⁺ varyantının, BKE alt ünitelerinin farklı proteinler ile oluşturduğu hibrit moleküller olduğu ve 2. kromozomun uzun kolu üzerinde şifrelendiği saptanmıştır Massoulie (12).

BKE geni 70 kilobaz uzunluğunda bir gendir (Bkz. Şekil 2.1.). Gen, yapısında 3 intron ve 4 ekzon içerir. Genin proteine kodlanan kısmı 2416 baz uzunluğundadır. Aktif enzim ise 574 amino asit içerir. Ekzon birde başlama kodonu bulunur. Oldukça uzun olan BKE geninde, olgun proteinin N ucu ve aktif merkezde yer alan Ser 198 dahil 478 amino asit ikinci ekzonda kodlanmıştır. Üçüncü ekzon 167 amino asit uzunluğundadır. Ekzon 4 ise C ucunu şifreler Arparagaus et al (40).



Şekil 2.1. İnsan BKE'nin gen yapısı (Sternfield et al(43)'dan).

BKE çok sayıda allelik varyantı bulunan bir enzimdir. Bir çok varyantın şifreleyici dizideki nokta mutasyonlarından kaynaklandığı bulunmuştur. BKE varyantlarından en çok ilgi uyandıranı Asp70→Gly nokta mutasyonunun görüldüğü ve "atipik" adı verilen varyanttır. Atipik enzimin süksinilkolin yıkım hızı normal enzime göre çok azalmıştır. Ayrıca atipik varyant domates, patates, patlıcan gibi sebzelerde bulunan doğal kolinesteraz inhibitörleri olan α -solanine ve α -chaconine tarafından inhibisyona uğramamaktadır Sternfield et al.; Krasowski et al.; Massoulie et al.; Primo – Pramo et al. (43-45,12).

Asp70→Gly varyantının bu sebzeleri ağırlıklı olarak diyetlerinde kullanan toplumlarda sık görülmesinin evrimsel bir avantaj sağladığı düşünülmektedir.

BKE varyantları gen düzeyinde çalışmalar yapılmadan önce dibukain ve flor ile yapılan inhibisyon çalışmaları ile belirlenmiştir. Bu çalışmalara göre E^U normal enzim, E^A atipik enzim, E^F flor dirençli enzim, E^S sessiz varyant olarak enzim tipleri belirlenmiştir (2). Yapılan genetik çalışmalarda tüm bu enzim tiplerinin E₁ lokusunda şifrelendiği bulunmuştur. Bu enzim tipleri stabil varyantlardır. Ancak ilk kez kararsız bir BKE varyantı Primo- Pramo et al (45) tarafından saptanmıştır. Çizelge 2.1.'de bazı BKE varyantları gösterilmiştir.

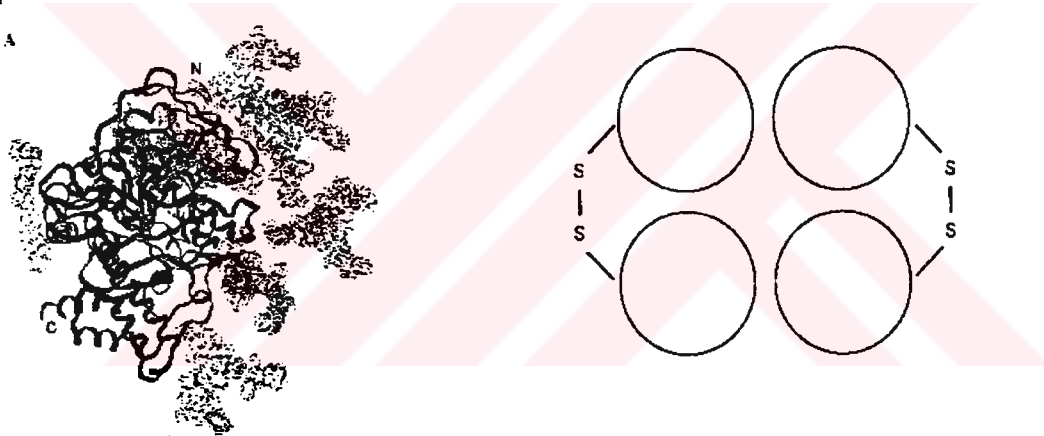
Çizelge 2.1. İnsan BKE varyantlarının sınıflandırılması, (Primo-Pramo et al (45)'dan).

Allel	BKE molekülü üzerine etkisi
BCHE*70 G (Atipik)	Asp 70 → Gly
BCHE*243 M (Flor dirençli)	Thr 243 → Met
BCHE*390 V (Flor dirençli)	Gly 390 → Val
BCHE*539 T (K varyantı)	Ala 539 → Thr
BCHE*497 V (J varyantı)	Glu 497 → Val
BCHE*142 M (H varyantı)	Val 142 → Met
BCHE*FS 117 (Sessiz)	117. kodonda çerçeve kayması
BCHE*ALU 355 (Sessiz)	355. kodona Alu eklenmesi
BCHE*365 R (Sessiz)	Gly 365 → Arg
BCHE*Fs 315 (Sessiz)	315. kodonda çerçeve kayması
BCHE*418 S (Sessiz)	Phe 418 → Ser
BCHE*515 C (Sessiz)	Arg 515 → Cys
BCHE*465 STOP (Sessiz)	465. kodonda stop kodonu oluşumu
BCHE*F 86 (Sessiz)	6. kodonda çerçeve kayması
BCHE*33 C (Sessiz)	Tyr 33 → Cys
BCHE*37 S (Sessiz)	Pro 37 → Ser
BCHE*125 F (Sessiz)	Leu 125 → Phe
BCHE*170 E (Sessiz)	Asp 170 → Glu
BCHE*198 G (Sessiz)	Ser 198 → Gly
BCHE*201 T (Sessiz)	Ala 201 → Thr
BCHE*271 STOP (Sessiz)	271. kodonda stop kodonu oluşumu
BCHE*471 R (Sessiz)	Trp 471 → Arg
BCHE*500 STOP (Sessiz)	500. kodonda stop kodonu oluşumu
BCHE*518 L (Sessiz)	Glu 518 → Leu
BCHE*12 E3 – 8G (Sessiz)	Intron 2'de farklı splicing

Kanser üzerine yapılan çalışmalarda gen amplifikasyonu olduğu ve bu artışın tümör oluşumuna katkıda bulunduğu gözlenmiştir. Brass et al (46) küçük hücreli akciğer kanserinde 3q2b bandı üzerinde bulunan BKE geninin amplifikasyona uğradığını saptamışlardır.

2.2 Protein Yapısı

BKE, globüler yapıya sahip bir glikoprotein olup birbirlerine disülfid köprüleri ile bağlanmış dimerler dimeridir (Bkz. Şekil 2.2.). G_4 olarak adlandırılan tetramerik yapıda dimerler birbirine kovalent olmayan güçlü hidrofobik bağlarla tutunmaktadır Massoulie et al(12). Enzimin monomer (G_1) ve dimer (G_2) formları da bulunmakla beraber plazma BKE'ı % 90 G_4 formundan oluşur.



Şekil 2.2. BKE'nin monomer (Millard et al (47)'dan) ve tetramer yapısı (Lockridge et al (13)'den).

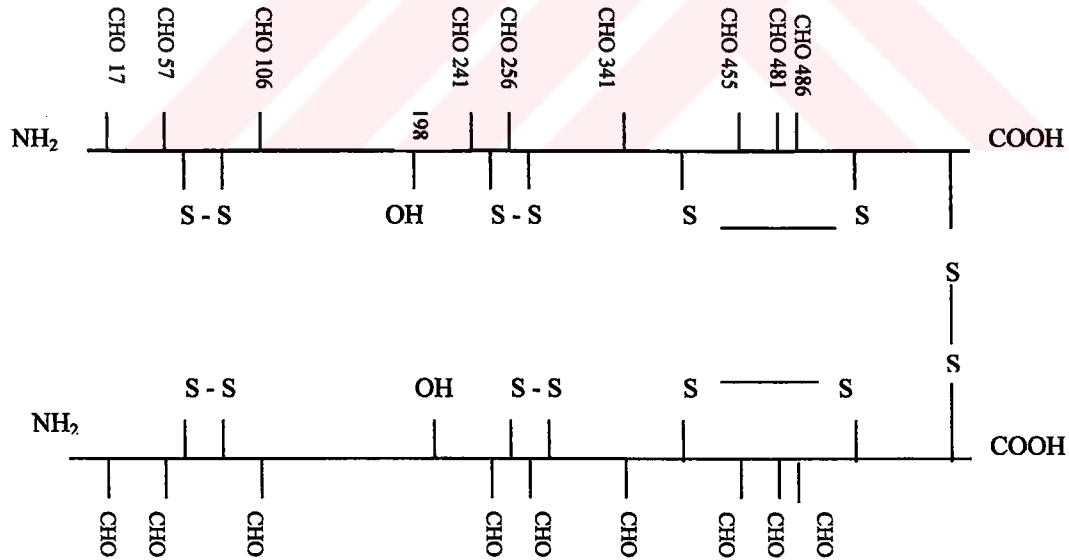
Yapılan dizi analizi çalışmaları ile her alt ünitenin 574 amino asitten oluştuğu bulunmuş ve molekül ağırlığı 85 534 Da olarak saptanmıştır. Molekül ağırlığının % 23.9 kadarını karbonhidrat kısmı oluşturur. Bu incelemeler sonucu enzimin tetrameri 342 136 Da olarak hesaplanmıştır (13).

Tezcan (48), sedimantasyon ve difüzyon çalışmalarına dayanan bir yöntem ile BKE'nin molekül ağırlığını 310 000 Da, Sephadex G-200 jel filtrasyonu yöntemi ile ise $300\,000 \pm 16\,000$ Da olarak saptamıştır.

Çokuğraş ve Tezcan (49), koyun beyininden saflaştırdıkları enzimin molekül ağırlığını jel filtrasyonu ile 290 000 Da olarak bulmuşlardır.

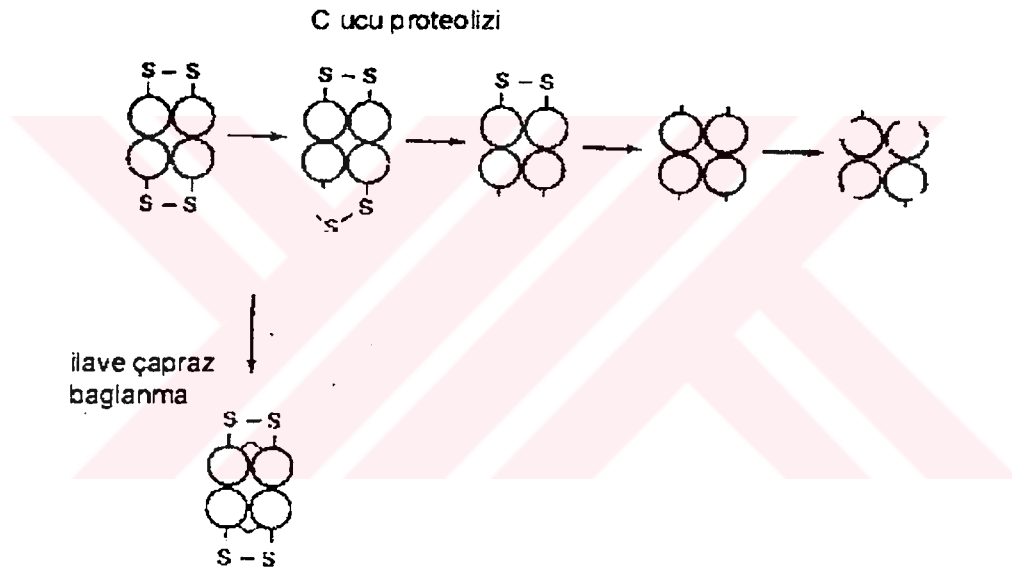
BKE enzimi her alt biriminde dokuz asparajinden N-glikozidik bağ ile tutunmuş karbohidrat zincirleri taşır (Bkz. Şekil 2.3.). Karbonhidrat zincirlerinin bağlandığı asparajinler 17, 57, 106, 241, 256, 341, 455, 481 ve 486. konumlarda bulunmaktadır Lockridge et al (13)

BKE'ın içerdiği karbonhidrat bileşenleri % 9.3 galaktoz ve mannoz, % 8.4 asetil heksozamin, % 6 asetil nöraminik asit ve % 0.2 fukoz olarak bildirilmiştir Brown et al (2). Saxena et al (50), at serumu BKE'ı ile yaptıkları çalışmada karbohidrat ünitelerinin dış uçlarında bulunan tek şekerin sialik asit olduğunu ve bu sialik asit ünitelerinin enzimin dolaşımında kalma süresini arttırdığını saptamışlardır.



Şekil 2.3. İnsan BKE'nın bir dimerinde yer alan karbohidrat ve disülfid bağlarının yerleşimi (Lockridge et al(13)'den).

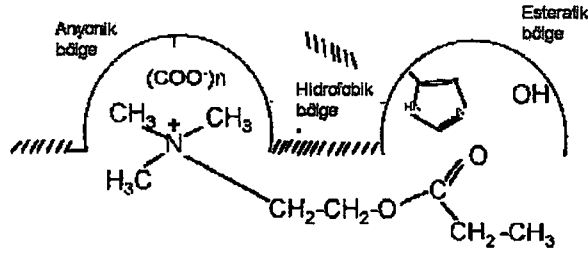
BKE monomerleri, C ucu yakınında bulunan 571. sisteinlerin arasında oluşan disülfid köprüleri ile dimer yapısını kazanırlar. Her monomer, yapısında 3 adet zincir içi disülfid bağı taşır: Cys65–Cys92, Cys252–Cys263 ve Cys440–Cys519. Monomerler arası disülfid bağı tetramer yapısı üzerine etkili değildir. Bağın indirgenmesinin, yapıyı ve aktiviteyi değiştirmedeği gözlenmiştir Lockridge et al(13). Ancak tripsin ile yapılan C ucu proteolizi ve ultrasonla parçalama çalışmaları sonucu, enzimin inaktif hale geçtiği ve G₁, G₂, G₃ formlarına dönüştüğü Froment et al (51) tarafından gösterilmiştir (Bkz. Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. G₄ formundaki BKE'nin kısmi C ucu proteolizi ile inaktif hale dönüşümü (Froment et al (51)'den).

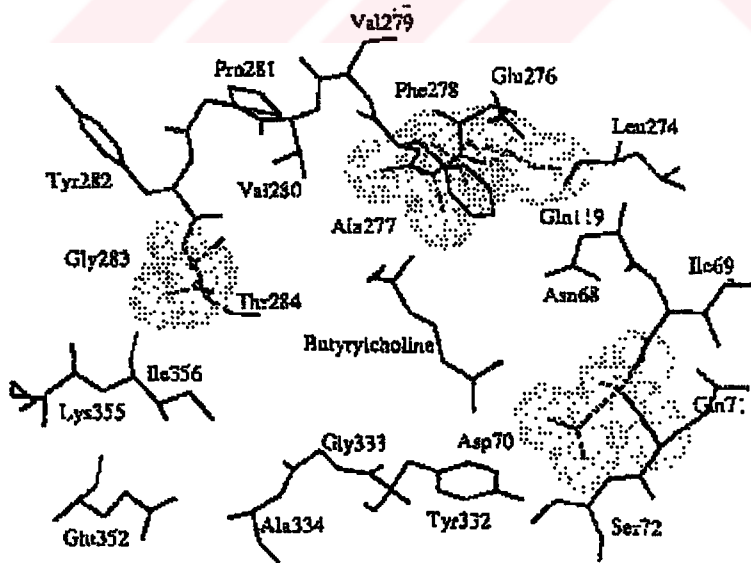
3.3 Aktif Merkez Yapısı

BKE aktif merkezinde anyonik ve esteratik bölge olarak adlandırılan iki bölge mevcuttur. (Bkz. Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. BKE'in aktif merkez yapısı (Çokuğraş and Tezcan(52)'dan).

BKE'in moleküler ve aktif merkez yapısı, Torpedo AKE'ı kristal yapısı biçimlendirildikten sonra bu molekül model alınarak aydınlatılmaya çalışılmıştır Millard and Broomfield (53). BKE aktif merkezinde katalitik üçlü olarak adlandırılan Ser 198, His 438 ve Gly 325 aminoasitleri bulunmaktadır. BKE aktif merkezi, aktif merkez çukuru olarak adlandırılan bir girintinin dip kısmında yer alır. Girintinin boynu dört farklı katmandan oluşan 22 aminoasit ile çevrelenmiştir. Şekil 2.6.'da çukurun dibine yerleşmiş bir butirilkolin molekülü ile birlikte aktif merkez çukuru görünmektedir.



Şekil 2.6. Çukurun dibine yerleşmiş bir BTK molekülü ile beraber aktif merkez girintisinin yukardan görünüşü Masson et al (54)'dan.

Boynun en üst tabakası yan zincirleri dışı dönmüş olarak konumlanmış 4 amino asit içerir ; Leu274, Phe278, Glu352 ve Lys355. Bir alt tabakada ise Gln71, Ser72, Ala277, Val280, Pro281, Tyr282, Gly283, Thr284, Gly333, Ala334 ve Ile356 yer alır. En alt tabakada ise Asn68, Ile69, Asp70, Glu276 ve Tyr332 vardır. Gln119 ise yan zincirleri aşağı, çukurun dibine uzanmış biçimde kendine ait bir tabakada bulunmaktadır. Glisinin AKE'daki homologu olan Tyr121 yan zincirleri aktif merkez çukurunun içine uzanır ve bu amino asit AKE periferik bölgesinin bir parçası sayılmaktadır Masson et al (54).

BKE aktif merkezinde bir periferik anyonik bölgenin var olup olmadığı tartışma konusudur. AKE'da bulunan periferik anyonik bölge, aromatik aminoasitlerden zengin oluşu, aktif merkez çukurunun ağzında yerleşmiş bulunması, Asp70 yan zincirinin bu bölgeye substrat bağlanmasında etkin olarak görev alması ve bölgeye bağlanan ikinci bir substrat molekülünün inhibisyona neden olması ile belirlenir. BKE'nin olası periferik bölgesinde, aromatik amino asitlerin, özellikle de AKE periferik anyonik bölgesinde önemli rol oynayan Trp279'un eksik olması BKE'da bu bölgenin olmadığı kanısına yol açmıştır. Ancak yapılan araştırmada, BKE'nin de bir periferik anyonik bölgesi olduğu ve bu bölgede Asp70'in önemli bir görevi bulunduğu saptanmıştır. Asp70 substrat molekülünü bağlar, bu bağlanma hidrofobik boyunda konformasyon değişimine neden olur ve substrat molekülü aktif merkez çukurunda kolin bağlayan anyonik bölgedeki Trp82'ye yöneltilir ve aktarılır. Atipik varyant olan Asp70→Gly'de substrat hidrolizi hızındaki düşüş Asp70'in bu rolünü desteklemektedir Masson et al (55).

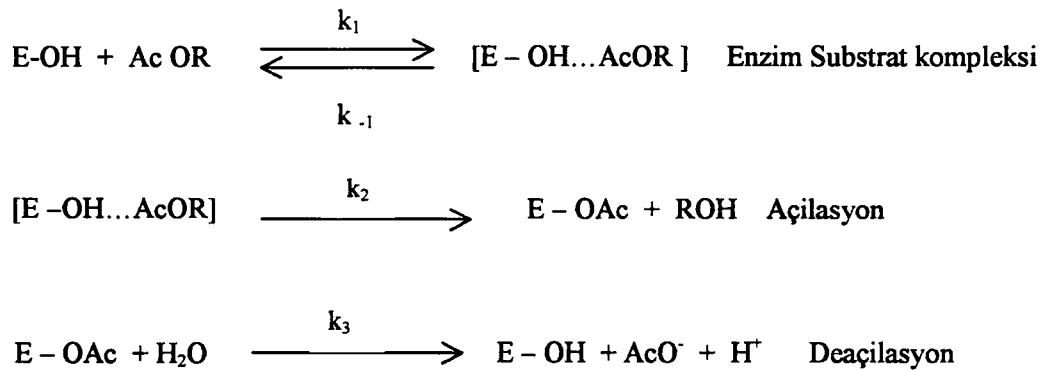
Moleküler modelleme ve kimerik çalışmalar ile kolinesteraz moleküllerinin ligand bağlamasında katkıda bulunan üçüncü bir bölge daha saptanmıştır Radić et al (56). Memeli AKE'ındaki bu bölge Phe295 ve Phe297 içeren bir açıl ceptir. Bu amino asitler AKE'nin butiriltiyokolin hidrolizini belirgin olarak azaltmaktadır. Asetiltiyokolin hidrolizini ise molekülü açıl

gurubunun metil kısmı etrafından sıkıştırıp özgür hareket etmesini engelleyerek arttırmaktadır. BKE'da bu amino asitler alifatik amino asitler ile yer değiştirdiği için hem BTK hidrolizi hemde BKE'a özgü büyük yapılı bir inhibitör olan tetraisopropil pirofosfamid'e (iso-OMPA) duyarlılık artmaktadır Vellom et al (57).

İnsan BKE'nın Ala328 yan zincirinin nokta mutasyonları ile Phe, Tyr gibi farklı amino asitlere değiştirilmesi ile moleküler yapılanmasının incelendiği bir çalışmada, BKE aktif merkez çukurunun AKE'inkinden yaklaşık 200 Å³ daha büyük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle BKE'a özgü inhibitörler AKE'a özgü inhibitörlerden daha büyük molekül yapısına sahiptirler Saxena et al (58).

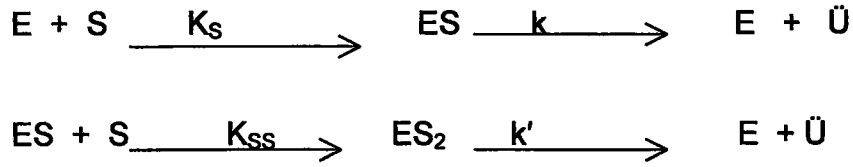
2.3. BKE'nın Kinetik Özellikleri

BKE, kolin türevi bileşiklere afinitesi daha fazla olmakla birlikte oksiesterler, fosforil esterleri, karbamoil esterleri, amidler, anilinler gibi geniş bir substrat ailesini kataliz etme potansiyeline sahiptir. Enzimin rol aldığı genel tepkime mekanizması aşağıda verilmiştir.



AcOR enzimin açıl – kolin substratını göstermektedir. Tepkimenin hız kısıtlayıcı basamağı açıl-enzim kompleksinin oluştuğu açılasyon basamağıdır. Deaçilasyon basamağı çok hızlı gerçekleşir.

Yapılan kinetik çalışmalar sonucu enzimin Michealis – Menten eşitliğine uymadığı, substrat derişimindeki artış ile daha hızlı aktive olduğu gözlenmiştir. Bu aktivasyon iki mol substratın aşağıda verilen tepkimeye uygun olarak enzime bağlanması ile açıklanmaya çalışılmıştır La Du (59).



K_s ve K_{ss} enzim-substrat komplekslerinin dissosiasyon sabitleridir. İlk hızlar için aşağıdaki eşitlik önerilmiştir.

$$v = \frac{(V / K_{ss} S) + V_{ss}}{1 + (K_{ss} S)^{-1} + (K_s K_{ss} S^{-2})^{-1}}$$

Eşitlikte $V = k E_0$ ve $V_{ss} = k' E_0$ 'dır.

Augustinson et al (60) tarafından enzimin tetramerik moleküler yapısı ile kinetik davranışları arasındaki ilişki kooperatif olarak çalışan dimerler dimeri olarak tanımlanmıştır. Dimerlerden birine ait aktif merkezin açılmesi ile eş zamanlı olarak diğer dimerin aktif merkezinin ester molekülü ile kompleks yaptığını ileri sürmüşlerdir. Önerdikleri kinetik model için türettikleri hız eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$v = \frac{V_1(A) + V_2(A)^2}{1 + K_1(A) + K_2(A)^2}$$

Denklemden (A) substrat derişimini göstermektedir. V_1 , V_2 , K_1 ve K_2 bir önceki eşitlikte yer alan kinetik sabitlerle eş anlamlıdır.

Tezcan (61) ve Özen (62) insan serum BKE'ı ile yaptıkları kinetik çalışmalarda enzimin allosterik bir davranışa sahip olup substratlarından birisi olan BTK'e negatif kooperativite gösterdiğini bulmuşlardır.

Çokuğraş ve Tezcan (49) koyun beyininden saflaştırdıkları BKE için de serum enziminde olduğu gibi, pH 7.5'de BTK bağlanmasının Michaelis – Menten kinetiğine uymayıp, enzimin substratına negatif kooperativite gösterdiğini bulmuşlardır.

2.4. BKE – İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ

Çok geniş bir yelpazeye dağılan çeşitli biyolojik aktivitelere sahip ajanlar tarafından inhibe edilmesi, BKE'ın bir çok farklı metabolizmada rol aldığını düşündürmektedir.

Galli et al (63) çeşitli opioidlerle yaptığı çalışmada meptazinol, methadone, profadol, levallorfan ve 1, 2, 3- trimetil-3-(3- hidroksifenil-) piperidin'in at serumu BKE'ı üzerinde inhibitör etkileri olduğunu, ancak bu inhibisyonun serumun seyreltilmesi ile anında ortadan kalktığını gözlemlemişlerdir.

Çokuğraş ve Tezcan (52) migren ve depresyon tedavisinde kullanılan amitriptilin'in BKE üzerinde kısmi kompetitif tipte inhibisyon etkisi olduğunu saptamışlardır.

Grecsi et al (64) neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan bir antrasiklin türevi olan danorubisin ile tavşanlarda yaptıkları çalışmada danorubisin uygulamasından sonra serum, karaciğer ve kardiyak BKE seviyelerinde belirgin bir düşüş olduğunu bulmuşlardır.

Krenic ve Bradamante (65) sıçanlarla yaptıkları çalışmalarında bir β -bloker olan oxprenolol'un oral uygulanmasının BKE seviyelerinde artışa neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

Van Lith et al(25) bir HMG CoA redüktaz inhibitörü olan simvastatin ile fareler üzerine yaptığı çalışmada, uzun süreli simvastatin kullanımı ile serum BKE seviyelerinde azalma olduğunu saptamıştır.

Bambuterol, hidrolizi ile aktif β_2 adrenerjik reseptör agonisti terbutaline dönüşen bir ön bileşiktir. Bir çok ülkede astım tedavisinde kullanılmaktadır. Bambuterol'un hidrolizinden BKE'nin sorumlu olduğu saptanmıştır. Ancak ilacın hidrolizi BKE inhibisyonuna da neden olmaktadır. Bu yüzden ilacın etki süresinin uzadığı rapor edilmiştir Sitar (66).

Masson et al (67) ise BKE'in aspirin hidrolizini kataliz ettiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar BKE'in bu ilacın metabolizmasından sorumlu olduğunu öne sürmektedirler.

BKE üzerine ilaç çalışmalarının çoğu Alzheimer hastalığına yöneliktir. Halen Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların en etkinleri kolinesteraz inhibitörü olan maddelerdir. Güçlü bir BKE inhibitörü olan ve daha düşük seviyede AKE inhibitörü özelliği taşıyan takrin, Alzheimer hastalığı tedavisi için onaylanan ilk kolinesteraz inhibitörü ilaçtır Giacobini (68). Aşağıdaki çizelgede Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan bazı kolinesteraz inhibitörleri ve etkileri gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 Kolinesteraz inhibitörleri ile yapılan klinik denemeler
(Giacobini (68)'den.)

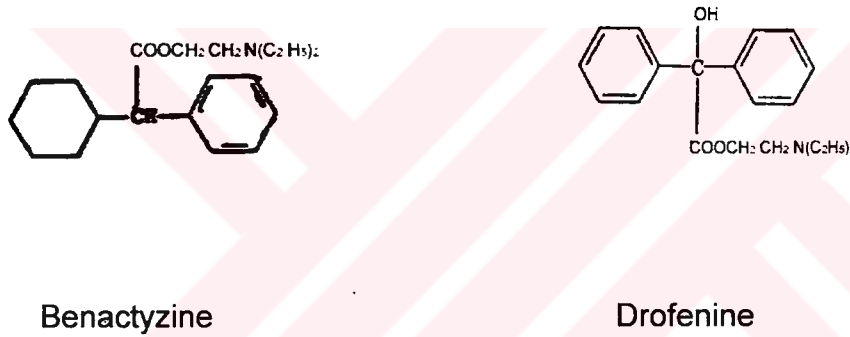
İlaç Adı	İlaç Şirketi	Yan Etkileri
Physostigmine ENA-713 Eptastigmine E -2020 MDL-73,745 Metrifonate Tacrine Velnacrine Galanthamine Huperzine A NX -066 CP-118,954 KA-672 NIK-247 TAK-147	Forest Sandoz Mediolanum Eisai Marion Merrel Dow Bayer/Miles Warner-Lambert Hoechst- Roussel Ciba-Geigy Chinese Acad. Sci. Astra Arcus Pfizer Schwabe Nikken Takeda	Yetersiz veri Düşük yan etki Düşük yan etki Düşük yan etki Düşük yan etki Düşük yan etki Hepatotoksisite Hematolojik bulgular Düşük yan etki Yetersiz veri Yetersiz veri Yetersiz veri Yetersiz veri Düşük yan etki Düşük yan etki

BKE üzerinde inhibitör etkisi bulunan maddelerin başında organofosfatlar ve sinir gazları gelir. Bu iki sınıfa dahil ajanlar yüksek toksisiteye sahip olup etkilerini kolinerjik mekanizma üzerinden gösterirler. BKE soman, sarin, tabun, VX gibi sinir gazları ile inhibisyona uğramasına rağmen bu maddelerin kısmi hidrolizini gerçekleştirebilme özelliğine de sahiptir Ashani et al; Raveh et al (18,20). Organofosfatlar ile zehirlenmelerde klasik tedavi, antikonvulsan ilaçlar ile beraber atropin ve bir oksim reaktivatörünün verilmesi şeklindedir Kassa and Fusek (69).

Son yıllarda çeşitli araştırmacılar organofosfat zehirlenmelerinde profilaktik ajan olarak BKE kullanımını irdelleyen çalışmalar da yapmaktadır. Lockridge et al (70) geliştirdikleri Gly117→His nokta mutasyonuna sahip BKE varyantının bir kolinesteraz inhibitörü olan "echothiopate" ile yaygın olarak kullanılan bir insektisit olan paraoxon'un in vitro olarak hidrolizini gerçekleştirebildiğini göstermişlerdir. Raveh et al (21) maymunlarla yaptığı bir

çalışmada intravenöz BKE uygulaması ile organofosfatlarla zehirlenmelere karşı korunma sağlandığını bulmuşlardır.

BKE üzerine yapılan çalışmaların diğer bir kısmı organofosfat zehirlenmelerinin tedavisine yöneliktir. Soman zehirlenmelerinde antikolinerjik bir ilaç ile birlikte bir reaktif ajan kullanımı yaygındır. Çeşitli antikonvulsanların organofosfatlar ile zehirlenmede etkisi incelendiğinde skopolamin, biperiden, benactyzine ve atropin sülfat gibi anti-muskarinik özellikli ilaçların zehirlenme sonucu oluşan nöbet ve kolinerjik krizi önlediği saptanmıştır Shih et al (71).



Şekil 2. 7. Benactyzine ve drofenine yapısı .

Benactyzine çoğunlukla anksiyete, obsesif kompulsif reaksiyonlarla tarif edilen psikonörotik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan antikolinerjik bir ilaçtır. Ancak ilacın etki mekanizması açıklanmış değildir. İlacın ağız kuruluğu, taşikardi, bulanık görme, kusma ve palpitation gibi yan etkileri olduğu rapor edilmiştir. Kassa ve Fusek (69) benactyzine'i soman zehirlenmesine karşı antidot tedavisi olarak kullanmışlardır. Shih et al (71) soman kökenli konvülsiyonlara karşı tek başına benactyzine kullanımının etkin olduğunu göstermiştir.

Drofenine, atropine benzer etkiler gösteren ve papaverin gibi doğrudan düz kas üzerine etkili antispazmodik bir ilaçtır (72). Etkilerini M_1 ve

Drofenine, atropine benzer etkiler gösteren ve papaverin gibi doğrudan düz kas üzerine etkili antispazmodik bir ilaçtır (72). Etkilerini M_1 ve M_2 muskarinik reseptörler üzerinden gösteren drofenine, M_1 tipte reseptörlerin daha seçici olan ligandıdır. Ayrıca ilacın karbokol uyarısı ile oluşan inozitol trifosfat birikimini non-kompetitif olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir Kunysz et al (73). Drofenine gastrointestinal sistem ve uterus spazmları tedavisinde kullanılmasına rağmen lokal anesteziyelere benzer etkileri nedeniyle duodenal ülser ve gastrit gibi gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında ağrı kesici olarak da kullanılabilir. Artan intraoküler tansiyon, idrar zorluğu, ağız kuruluğu, taşikardi gibi yan etkileri olduğu tarif edilmiştir.

Drofenine ve benactyzine 'nin muskarinik reseptörler üzerine etkilerine dair bazı incelemeler olmasına rağmen doğrudan BKE üzerine etkileri ayrıntılı olarak incelenmemiştir. Çalışmamızda bu ilaçların BKE üzerindeki etkilerini araştırdık.

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal Bileşikler

A Rh (+) insan kan numunesi Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Kan Bankasından sağlandı.

3-(N-morfolino) propan sülfonik asit (MOPS), 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)(DTNB), 1-etil-3-(dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür (EDAC), prokainamid hidroklorür, 6-aminohekzanoik asit, Sepharose 4B, N-N' metilen-bis-akrilamid, trizma base, TEMED, gliserol, formaldehit, gümüş nitrat (AgNO_3), benactyzine hidroklorür, drofenine hidroklorür Sigma Chemical Company ABD'den; S-n-butiriltiyokolin iyodür (BTK), akrilamid, sığır serum albumini, British Drug Houses Ltd., İngiltere'den; rubenaik asit, sodyum hidroksit (NaOH), amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), bromfenol mavisi, metanol, sodyum karbonat (Na_2CO_3), % 95 etanol, sodyum klorür (NaCl) Merck Almanya'dan, glisin, hidroklorik asit (HCl), sodyum sülfat (Na_2SO_4), sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) Analar İngiltere'den; potasyum monohidrojen fosfat (K_2HPO_4), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) Pancreac İspanya'dan; asetik asit Riedel De Haën A.G. Almanya'dan; bakır sülfat (CuSO_4) İlsan İstanbul, Coomassie Brilliant Blue G-250 ise Serva, Almanya'dan sağlandı.

3.1.2. Aletler

Kinetik çalışmalarda Beckman Model 25 kinetik spektrofotometresi, A_{280} deki protein taramalarında Shimadzu UV-120-02 spektrofotometresi, pH ölçümlerinde Schott Mainz CG 810 pH metresi, santrifügasyonda Sorvall RC-5B Superspeed santrifüjü, saflaştırmada Tris peristaltik pompası ile Tris 2000 fraksiyon kollektörü, elektroforetik incelemelerde ise Bio Rad elektroforez cihazı kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1 Protein Miktarlarının Saptanması

BKE'in saflaştırılması sırasında protein tayini 280 nm'deki absorbans değişimlerinin takibi ile yapıldı. Protein miktar tayini için ise Bradford'un(74) önerdiği yöntem kullanıldı. Bu yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250'nin seyreltik asit çözeltisinde turuncu olan renginin proteine bağlanması ile mavi

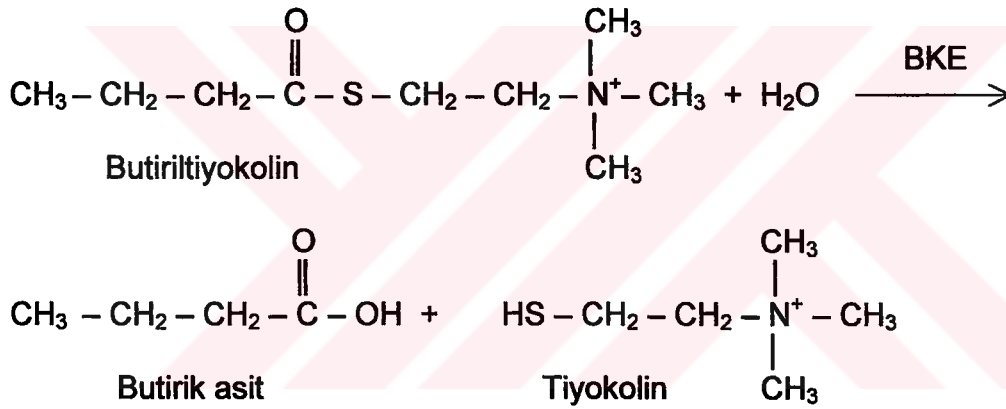
renge dönüşmesi esasına dayanır. Protein miktarları, 595 nm'deki absorbanların 2–60 dakika içinde okunup standart eğriden hesaplanması ile saptandı. Protein standardı olarak sığır serum albumini kullanıldı.

3.2.3 Enzim Aktivitesinin Tayini

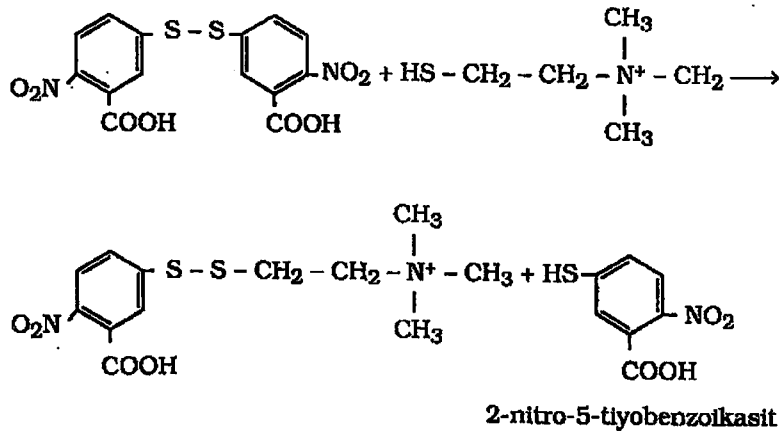
BKE aktivite tayini, Ellman et al. (75) tarafından önerilen yöntem değiştirilerek 37°C'da kolorimetrik olarak yapıldı. Yöntem, substrat olarak kullanılan bir tiyokolin esterinden BKE etkisi ile açığa çıkan tiyokolin miktarının saptanması esasına dayanır.

Çalışmada tiyokolin esteri olarak BTK kullanıldı.

Tepkime aşağıdaki şekilde verilebilir.



Oluşan tiyokolin DTNB ile tepkimeye girer.



Enzimin aktivitesi, DTNB'nin indirgenmesi ile oluşan sarı renkli 5- tiyo-2- nitrobenzoik asit miktarının 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tayin edildi. Bu bileşik için "molar extinction coefficient" $\epsilon_{412} = 1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak alındı.

Saflaştırma işlemleri sırasında kullanılan 0.5 ml aktivite ortamı, nihai olarak 4.0 mM BTK, 0.25 mM DTNB ve 5 mM MOPS tamponu (pH 7.5) içermektedir.

Spektrofotometrede üç dakikalık bir inkübasyon süresinden sonra enzim pipetlenerek başlatılan tepkime 2-3 dakika izlendi.

İlk hızlar mg enzim proteini başına dakikada oluşan μmol ürün (Ünite = Ü) olarak hesaplandı.

Kinetik çalışmalarda aktivite ortamı nihai olarak 0.1- 10.0 mM BTK, 0.25 mM DTNB ve 31.1 $\mu\text{g/ml}$ saflaştırılmış enzim içermektedir.

Bütün saflaştırma işlemleri 4 °C' da yapıldı.

3.2.4 İnhibisyon Çalışmaları

Çalışmalarda benactyzine ve drofenine'in klorür tuzları kullanıldı ve kinetik çalışmalarda aktivite ortamına uygun miktarlarda katıldı.

3.2.5 Elektroforetik İncelemeler

Elektroforez, 0.7 mm kalınlığında 8.5 x 7 cm boyutunda % 5'lik poliakrilamid jelde (PAGE) 100 Volt ve 3 mA sabit elektrik akımı uygulanarak, oda ısısında gerçekleştirildi Davis (76). Çift dökülen jel, iç elektrod tamponu 0.025 M Tris / 0.38 M Glisin tamponu pH 8.3 ve dış elektrod tamponu 0.025 M Tris-HCl tamponu pH 8.3 olan cihazda aynı zamanda elektroforeze tabi tutuldu. Jelin biri proteinleri saptamak için gümüş ile boyandı (77). Diğer jelde ise Juul'un (78) önerdiği yöntemle göre aktivite boyası yapıldı. Aktivite boyasının esası, BKE etkisi ile hidroliz edilen BTK'den açığa çıkan tiyokolinin sodyum sülfat, bakır sülfat ve glisin içeren inkübasyon karışımı ile muamele sonrası bakır tiyokolin oluşumuna dayanır. Bu oluşum jel üzerinde beyaz bantlar halinde görülür. Bu bakır tiyokolin bantları daha sonra rubenaik asit ile okside edildiğinde mavi-yeşil renk kazanır.

3.3 İstatistiksel Değerlendirmeler

Lineweaver- Burk ve diğer grafiklerin analizi, Systat (version 5.03,1991) non-lineer regresyon analizi programı uygulanarak yapıldı ve kinetik parametreler saptandı.

BULGULAR

4.1. BKE'in Saflaştırılması

BKE, insan serumundan aşağıdaki basamaklar kullanılarak saflaştırıldı. Tüm deneyler 4 °C'da yapıldı.

4.1.1. Kan Örneğinin Hazırlanması

Hacettepe Hastanesi Kan Bankasından alınan bir ünite A Rh (+) kan, 1500 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıldı.

4.1.2. Asitli Amonyum Sülfat Kesitlemesi

Elde edilen serum % 35 (NH₄)₂ SO₄ doygunluğuna getirildikten sonra, 16 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 27 000 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek ayrılan süpernatantın pH'sı 1N HCl ile pH 4.5'e ayarlanarak 30 dakika bekletildi. Daha sonra 27. 000 x g'de 30 dakika santrifüj edilen örneğin tekrar süpernatantı alındı.

1N NaOH ile pH 7.5'e ayarlanan süpernatantın amonyum sülfat doygunluğu % 55'e getirildi. Manyetik karıştırıcıda 16 saat karıştırıldıktan sonra yine 27 000 x g'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant ayrılarak bir sonraki aşamada kullanıldı.

Süpernatantın amonyum sülfat doygunluğu % 70'e getirildikten sonra 16 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 27 000 x g'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra enzimi içeren aktif çökelti 20 mM potasyum fosfat tamponu pH 7.5'de çözüldü. Nihai hacmi 31 ml olan bu örnek üç kez hacminin 100 katı kadar 20 mM potasyum fosfat tamponu pH 7.5 ile diyalize tabi tutuldu. Diyalizat 27 000 x g'de 30 dakika santrifüj edilip süzüldü. Hacmi 41 ml olan bu örnek saflaştırmanın ikinci basamağında kullanıldı.

% 55- 70 arası asitli amonyum sülfat kesitlemesi basamağı ile enzim 3.8 kez saflaştırıldı (Bkz. Çizelge 4.1.).

4.1.3. Afinite Kolon Kromatografisi

4.1.3.1. Prokainamid – Sepharose 4B Afinite Kolonunun Hazırlanması

Sigma firmasından alınan 6 aminoheksanoik asit –Sepharose 4B toz jelinin 2 gramı üretici firmanın önerdiği yöntemine uygun olarak 0.5 M NaCl çözeltisi ile şişirildi. Tuzun fazlası bol bol su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Elde edilen 8 ml şişmiş jele iki katı hacimde 14 mM prokainamid çözeltisi eklenip HCl ile pH 4.5'e ayarlandı. Bu karışıma son derişimi 0.1 M olacak şekilde EDAC ilave edilerek 24 saat oda ısısında yavaşça karıştırılarak prokainamidin jele bağlanması sağlandı.

Sentezlenen afinite jeli 1.7 x 4.8 cm boyutlarındaki kolona doldurulduktan sonra ilk olarak 1 M NaCl içeren alkali ve asidik çözeltiler ile, daha sonra ise 20 mM potasyum fosfat tamponu pH 7.5 ile yıkanarak dengelendi. Kolon yatak hacmi 10.66 ml olarak hesaplandı.

4.1.3.2. Örneğin Afinite Kolonuna Uygulanması

41 ml'lik % 55- 70 asitli amonyum sülfat kesitlemesi örneği afinite kolonuna akış hızı 10 ml/saat olacak şekilde uygulandı. Yine aynı hızla A_{280} okuması sıfır oluncaya kadar 0.2 M NaCl içeren 20 mM potasyum tamponu pH 7.5 ile yıkandı.

Kolona 0.2 – 2.0 M arasında lineer NaCl gradienti bağlandı ve 3.0 ml'lik fraksiyonlar toplandı. BKE aktivitesi 1.0 M NaCl derişiminde tek bir zirve olarak elde edildi (Bkz. Şekil 4.1.). Bu basamakta saflaşma başlangıç basamağına göre yaklaşık 8100 kez olarak saptandı (Bkz. Çizelge 4.1.).

1.0 M NaCl derişiminde elde edilen 7.5 ml yüksek aktiviteli enzim örneği tekrar afinite kolonuna akış hızı saatte 10 ml olacak şekilde tekrar uygulandı. Yine aynı hızla A_{280} okuması sıfır oluncaya kadar 0.2 M NaCl içeren 20 mM potasyum tamponu pH 7.5 ile yıkandı.

Kolona 0.2 – 2.0 M arasında lineer NaCl gradienti bağlandı ve 3.0 ml'lik fraksiyonlar toplandı. BKE aktivitesi 1.4 M NaCl derişiminde tek bir zirve olarak elde edildi. Elüsyon profili Şekil 4.3'de görülmektedir.

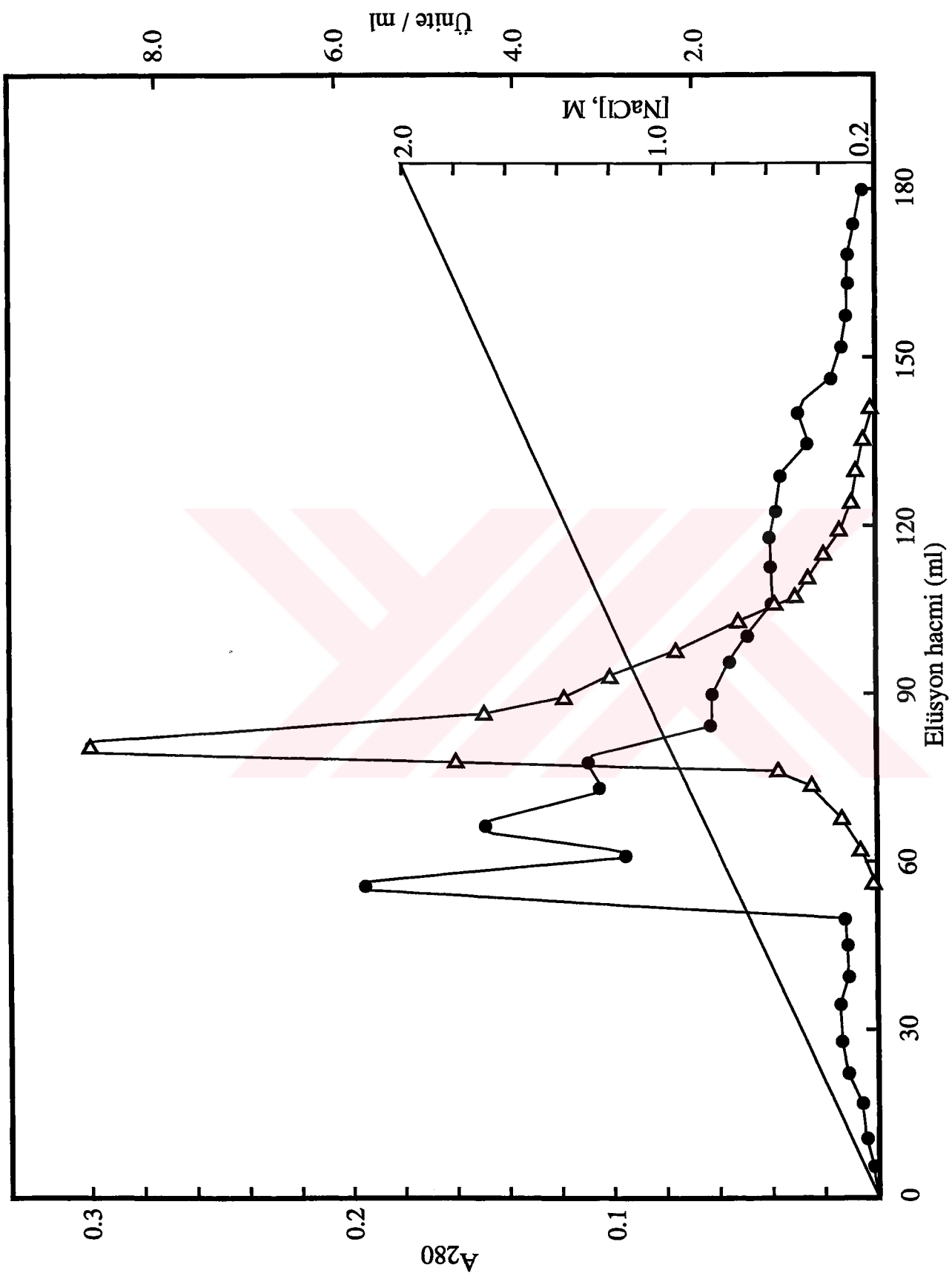
Bu basamakta saflaşma başlangıç aşamasına göre yaklaşık 17813 kez olarak saptandı (Bkz. Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. İnsan serumundan BKE saflaştırılması

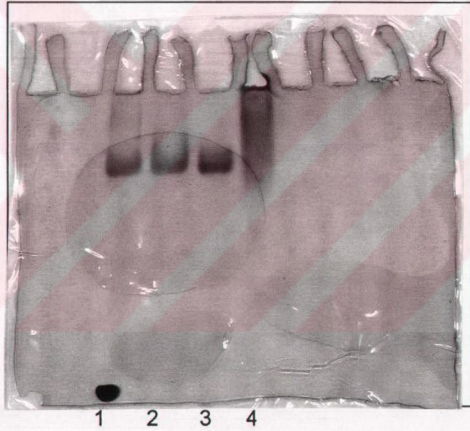
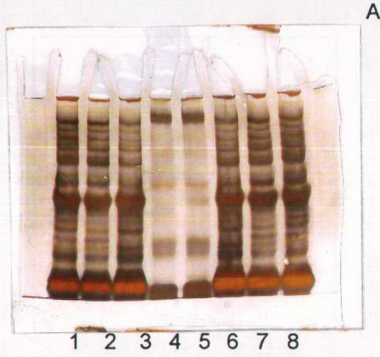
Saflaştırma Basamakları	Total Aktivite (Ü)	Total Protein (mg)	Özgül Aktivite (Ü/ mg)	Verim (%)	Saflaşma (kez)
Serum	791.652	80364.0	0.00985	100	-
% 35 (NH ₄) ₂ SO ₄ kesidi süpernatantı	695.53	47080.0	0.0147	88	1.5
pH 4.5 asit çöktürmesi süpernatantı	665.227	28340.0	0.0 235	84	2.4
% 55 (NH ₄) ₂ SO ₄ kesidi süpernatantı	661.005	22200.0	0.0298	84	3.02
% 70 (NH ₄) ₂ SO ₄ kesidi süpernatantı	397.905	13120.0	0.0303	50	3.8
1. Prokainamid Sepharose 4B Afinite kromatografisi	66.180	0.83	79.5	9	8100
2. Prokainamid Sepharose 4B Afinite kromatografisi	91.102	0.52	175.465	11.5	17813

4.2. Elektroforetik İncelemeler

Enzimin saflık kontrolü Davis (75)'in önerdiği yönteme göre % 5'lik PAGE ile yapıldı. Birinci afinite kolonundan elde edilen örneklerin elektroforetik incelemeleri Şekil 4.2.'de ve ikinci afinite kolonundan elde edilen örneklerin sonuçları ise Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

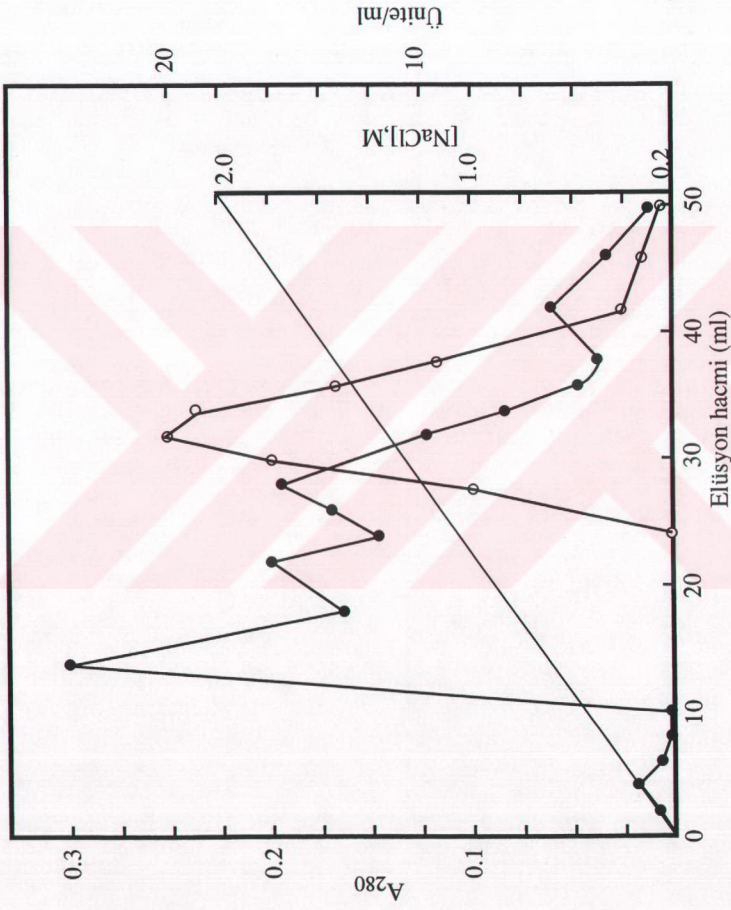


Şekil 4.1. İnsan serum BKE'nin Prokainamid-Sepharose 4B afinite kolonundan elusyonu. (●) A_{280} 'de protein taraması, (Δ) ise BKE aktivitesini göstermektedir.

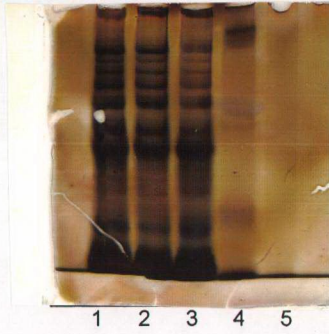


Şekil 4.2. A. Gümüş Boyama: Sırasıyla 1. Kuyu serum örneği; 2. Kuyu asitli basamak örneği; 3. Kuyu % 70 amonyum sülfat kesitlemesi örneği; 4. Kuyu afinite kolonundan elüe edilen enzim örneği. Jelde tüm örnekler simetrik olacak şekilde iki kez yüklenmiştir.

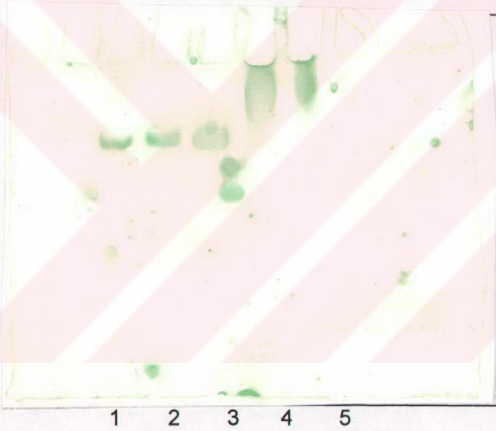
B. Aktivite Boyaması: 1. Kuyu serum örneği; 2. Kuyu asitli basamak örneği; 3. Kuyu % 70 amonyum sülfat kesitlemesi örneği; 4. Kuyu afinite kolonundan elüe edilen enzim örneği.



Şekil 4.3. İnsan serum BKE'inin ikinci Prokainamid-Sepharose 4B afinite kolonundan elusyonu . (●) A₂₈₀ 'de protein taraması, (○) BKE aktivitesini göstermektedir.



A



B

Şekil 4.3. İkinci afinite kolonundan elde edilen enzim ile yapılan PAGE.

A. Gümüş Boyama: 1. Kuyu serum örneği; 2. Kuyu asitli basamak örneği; 3. Kuyu % 70 amonyum sülfat kesitlemesi örneği; 4. Kuyu afinite kolonundan elüe edilen enzim örneği; 5. Kuyu 2. Afinite kolonundan elde edilen enzim örneği.

B. Aktivite Boyaması: 1. Kuyu serum örneği; 2. Kuyu asitli basamak örneği; 3. Kuyu % 70 amonyum sülfat kesitlemesi örneği; 4. Kuyu 1. afinite kolonundan elüe edilen enzim örneği; 5. Kuyu 2. afinite kolonundan elde edilen örnek.

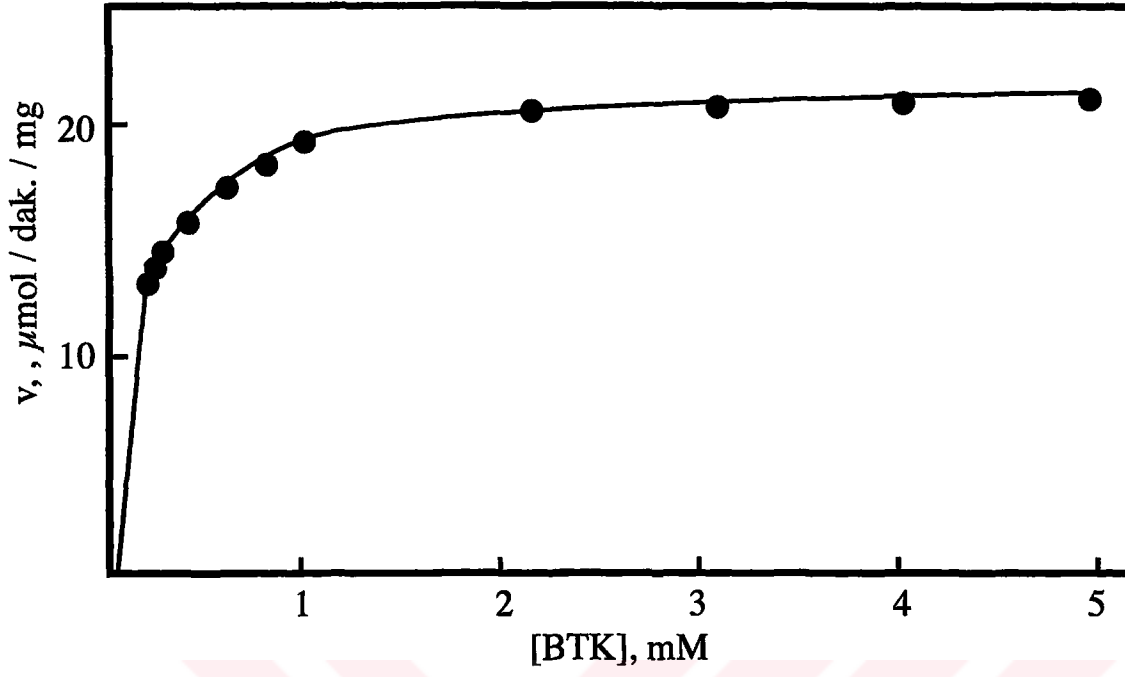
4.3. Kinetik Çalışmalar

4.3.1. BKE'nin Kinetik Sabitleri ve Kinetik Davranışının Saptanması

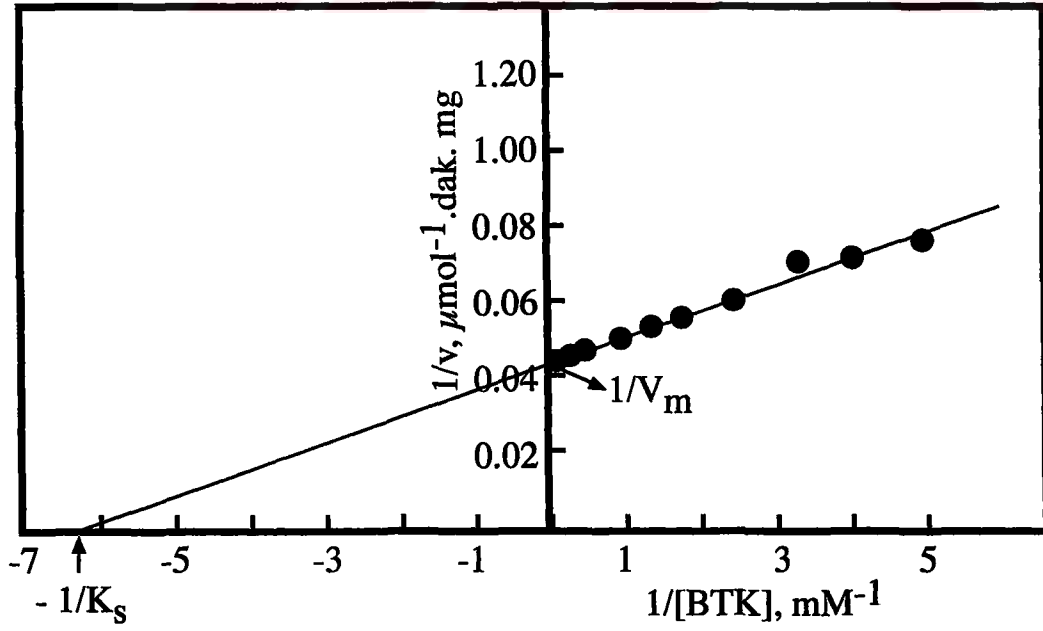
İlk hızların ölçümünde nihai olarak 5 mM MOPS tamponu pH 7.5 içinde hazırlanmış 0.25 mM DTNB, 0.1 – 5.0 mM arası BTK ve 0.031 mg/ml olacak şekilde enzim, aktivite karışımı olarak kullanıldı.

Şekil 4.2.'de, v değerlerine karşı, artan $[S]$ değerlerinin grafiklenmesi ile elde edilen eğri görülmektedir. Eğri, daha önce bildirildiği gibi bir hiperbol değildir ve enzimin substratına karşı “negative cooperativity” gösterdiğine işaret eder.

Enzimin kinetik sabitleri, $1/v$ değerlerine karşı $1/[S]$ 'lerin grafiklenmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk doğrusundan (Şekil 4.3.) saptandı. Regresyon doğrusu hesaplanarak, doğrunun $1/v$ eksenini kestiği noktadan enzimin maksimum hızı (V_m), 21.931 ± 0.328 mM/ dak/ mg; $1/[S]$ eksenini kestiği noktadan K_s , 0.159 ± 0.012 mM olarak saptandı.



Şekil 4.5. BTK derişiminin insan BKE aktivitesine etkisi.



Şekil 4.6. İnsan serum BKE'inin Lineweaver-Burk grafiğı.

4.3.2. İnhibisyon Çalışmaları

Çalışmada benactyzine ve drofenine'nin BKE aktivitesi üzerine olan etkileri incelendi. Artan derişimde benactyzine'nin enzimatik hıza etkisi incelendiğinde hızın azalarak sıfıra ulaştığı görüldü (Şekil 4. 7.).

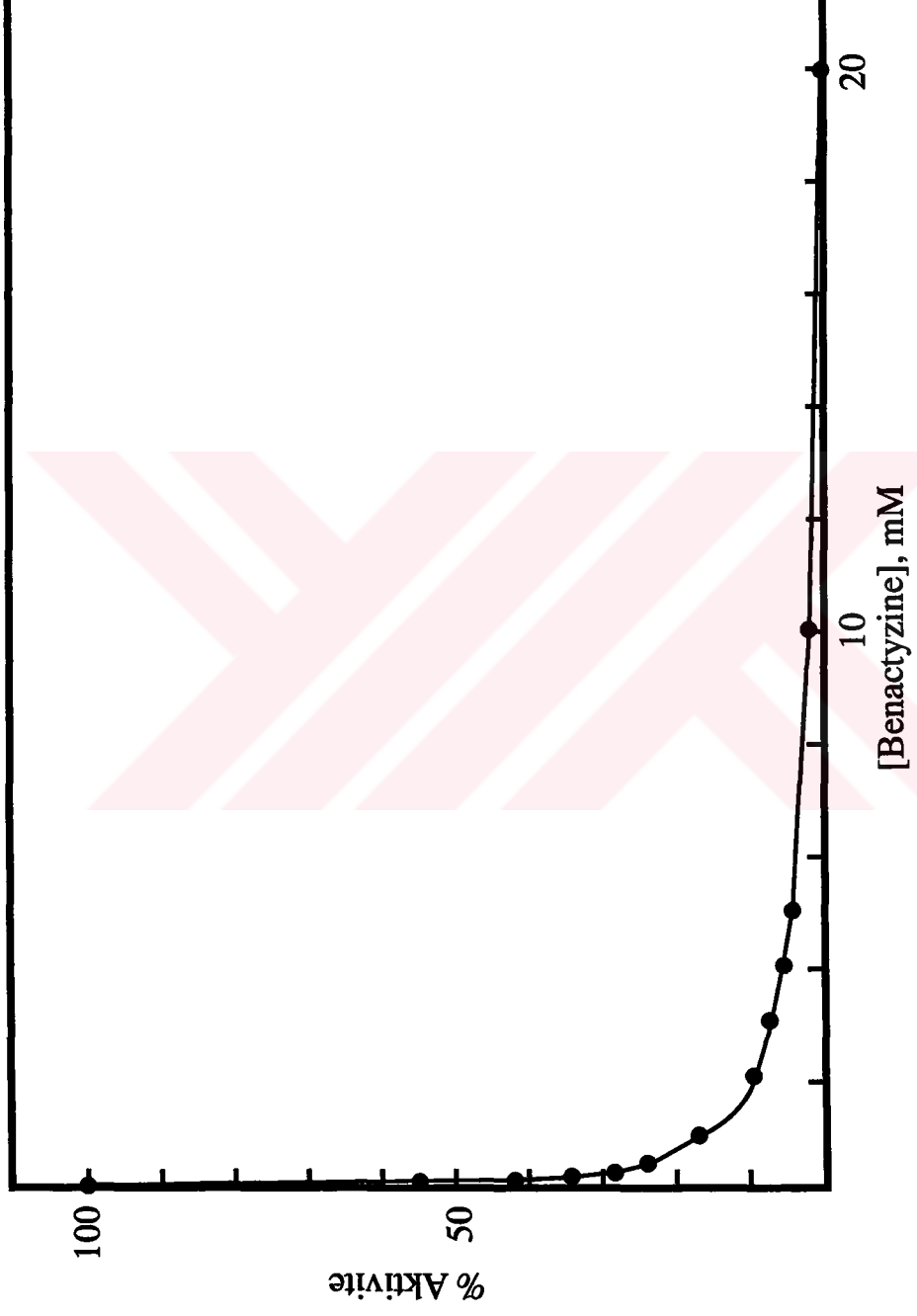
Artan benactyzine derişimlerine karşı 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.4 ve 2.5 mM BTK derişimlerindeki ilk hızları ölçüldü ve $1/v$ değerlerine karşı $[I]$ derişimleri grafiklendi (Şekil 4.8.). Çizilen Dixon grafiğinde kompetitif inhibisyonlarda olduğu gibi doğruların ikinci bölgede kesiştiği görüldü. Aynı veriler ile inhibisyon tiplerinin ayırımında kullanılan Cornish–Bowden yöntemine göre, $[S]/v$ 'ye karşı $[I]$ derişimleri grafiklendi (Şekil 4.9.). Elde edilen grafikten benactyzine'nin etki mekanizmasının kompetitif tipte inhibisyon olduğu saptandı. Aynı veriler ile $1/v$ 'ye karşın $1/[BTK]$ grafiği çizildiğinde, inhibisyonun kompetitif olduğu doğrulandı (Şekil 4.10.).

Drofenine ile yapılan deneyde ise 0.4 mM üzerindeki derişimlerinde deney ortamında bulanıklık gözleendiğinden çalışılamadı (Şekil 4. 11.). Artan BTK derişimlerinde, 0.025, 0.050, 0.075 ve 0.1 mM drofenine derişimleri kullanılarak ilk hızlar ölçüldü ve $1/v$ değerlerine karşı $1/[S]$ 'ler grafiklenerek Lineweaver-Burk doğruları çizildi (Şekil 4.12.). Ortamda drofenine bulunmadığında elde edilen kontrol doğrusu ile ortamda drofenine bulunduğunda elde edilen inhibisyon doğruları, kompetitif tipte inhibisyonlarda olduğu gibi $1/v$ ekseninde kesiştiği gözleendi.

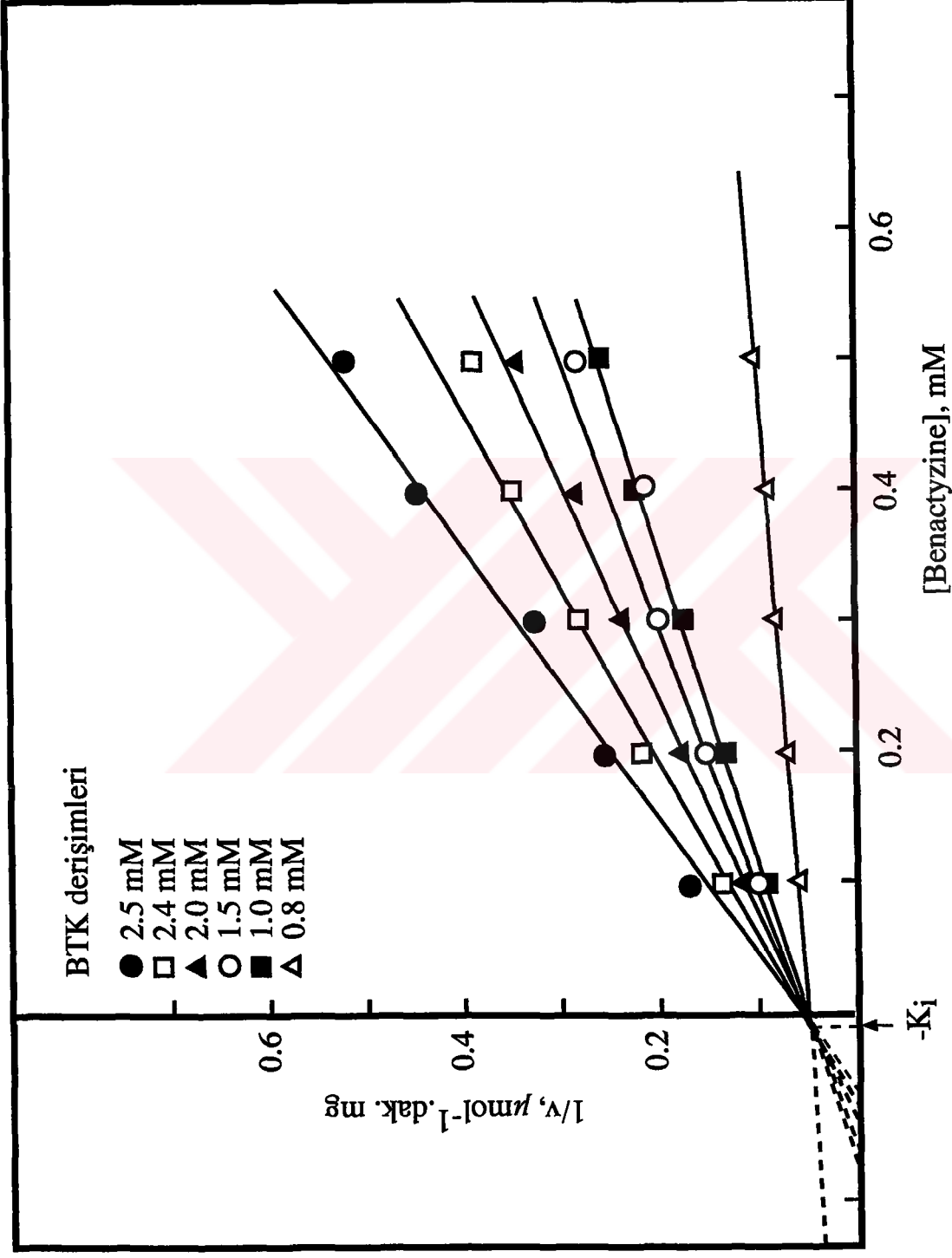
Benactyzine ve drofenine'e ait K_i değerleri Systat (version 5.03, 1991) non-lineer regresyon analizi programı ile hesaplanmış ve Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Benactyzine ve drofenine'nin K_i değerleri ($n = 121$).

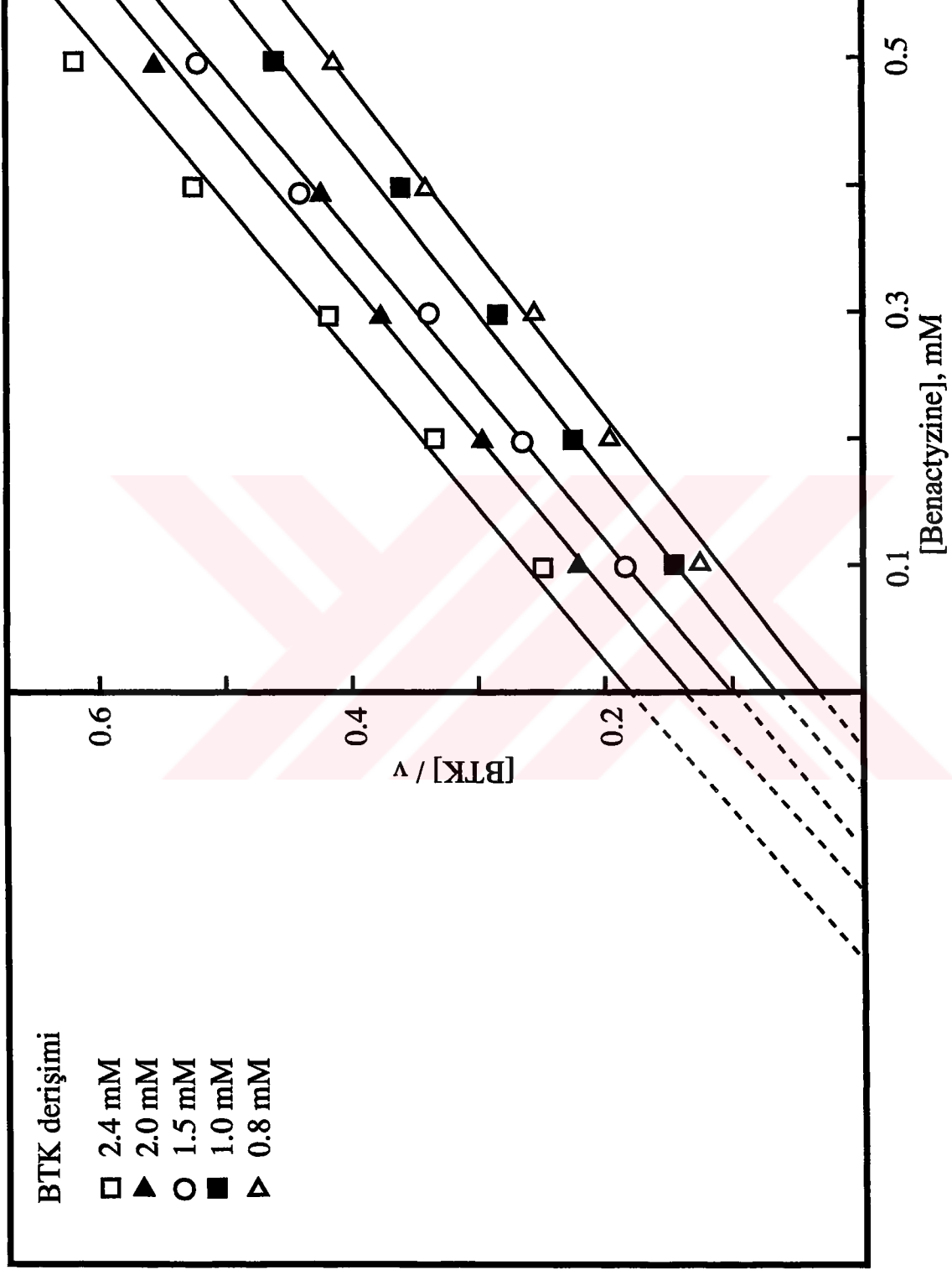
İlaç	K_i (mM)
Benactyzine	0.010 ± 0.001
Drofenine	0.003 ± 0.000



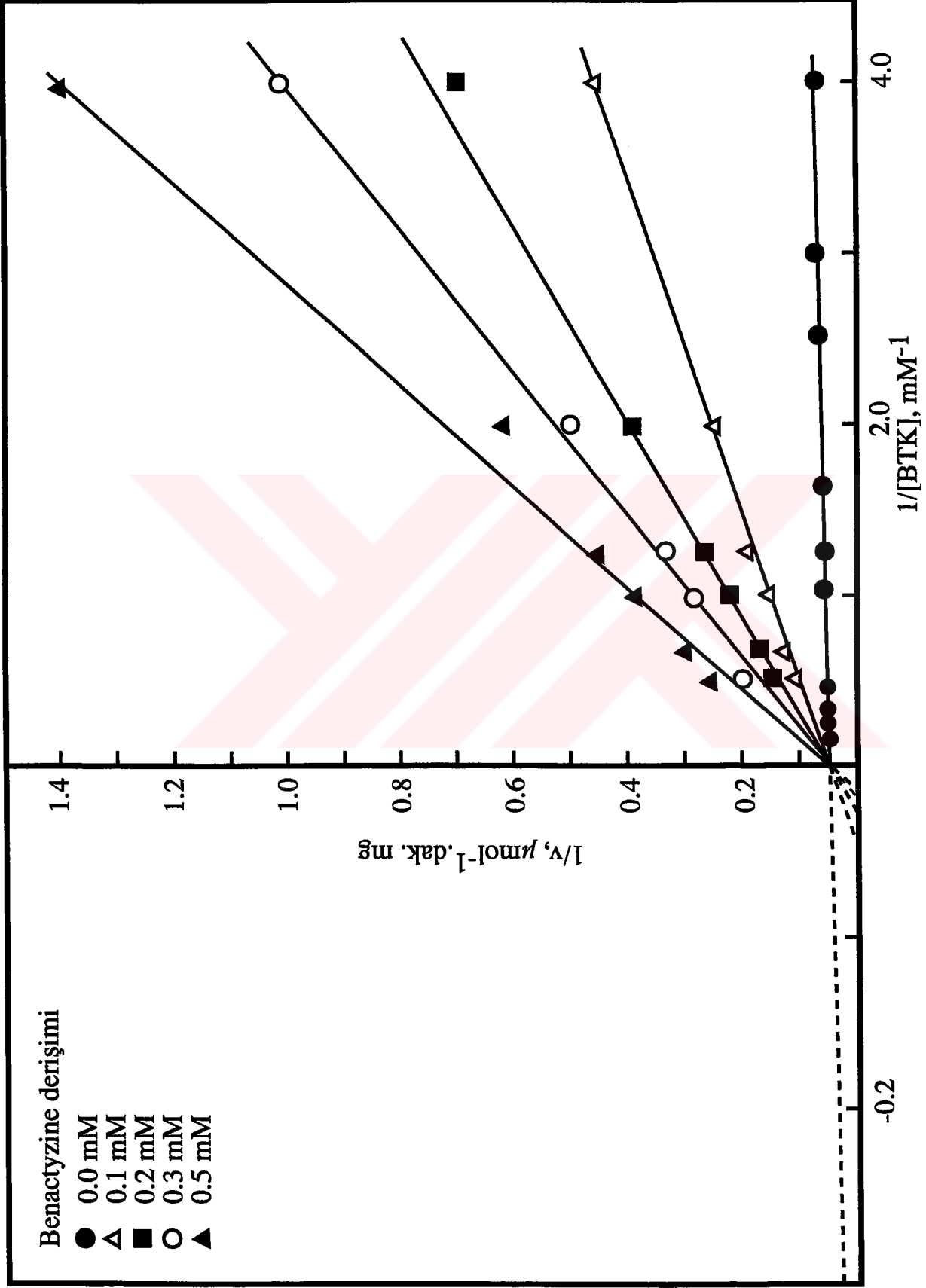
Şekil 4.7. 4 mM BTK derişiminde benactyzine'nin insan serum BKE'ı üzerine etkisi.



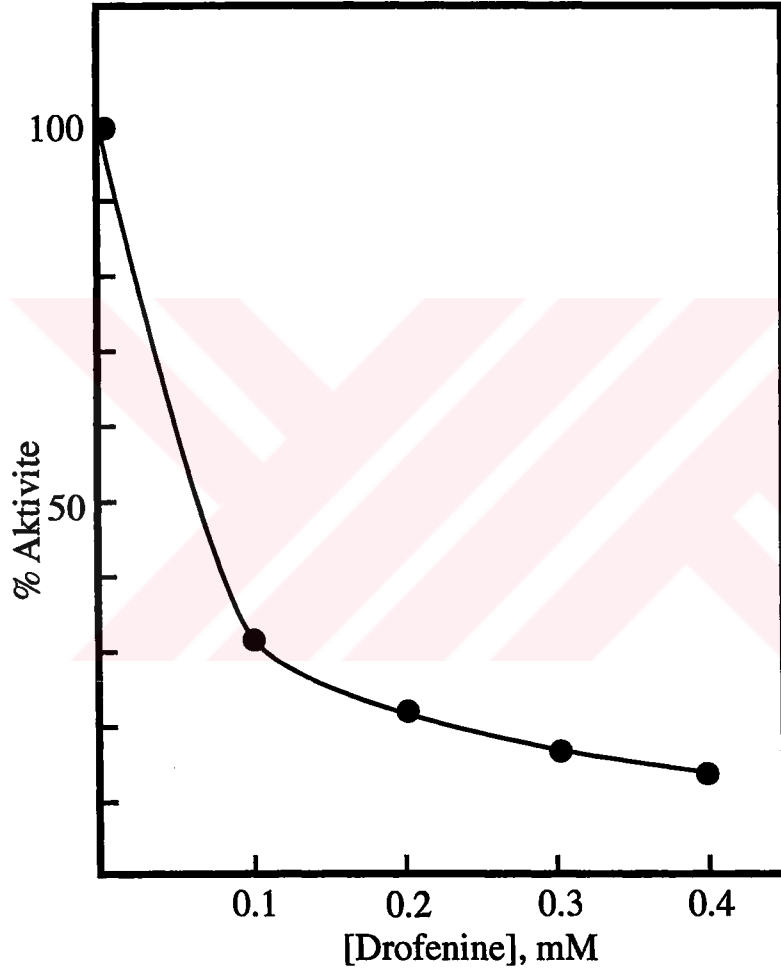
Şekil 4.8. Benactyzine'nin Dixon grafiği.



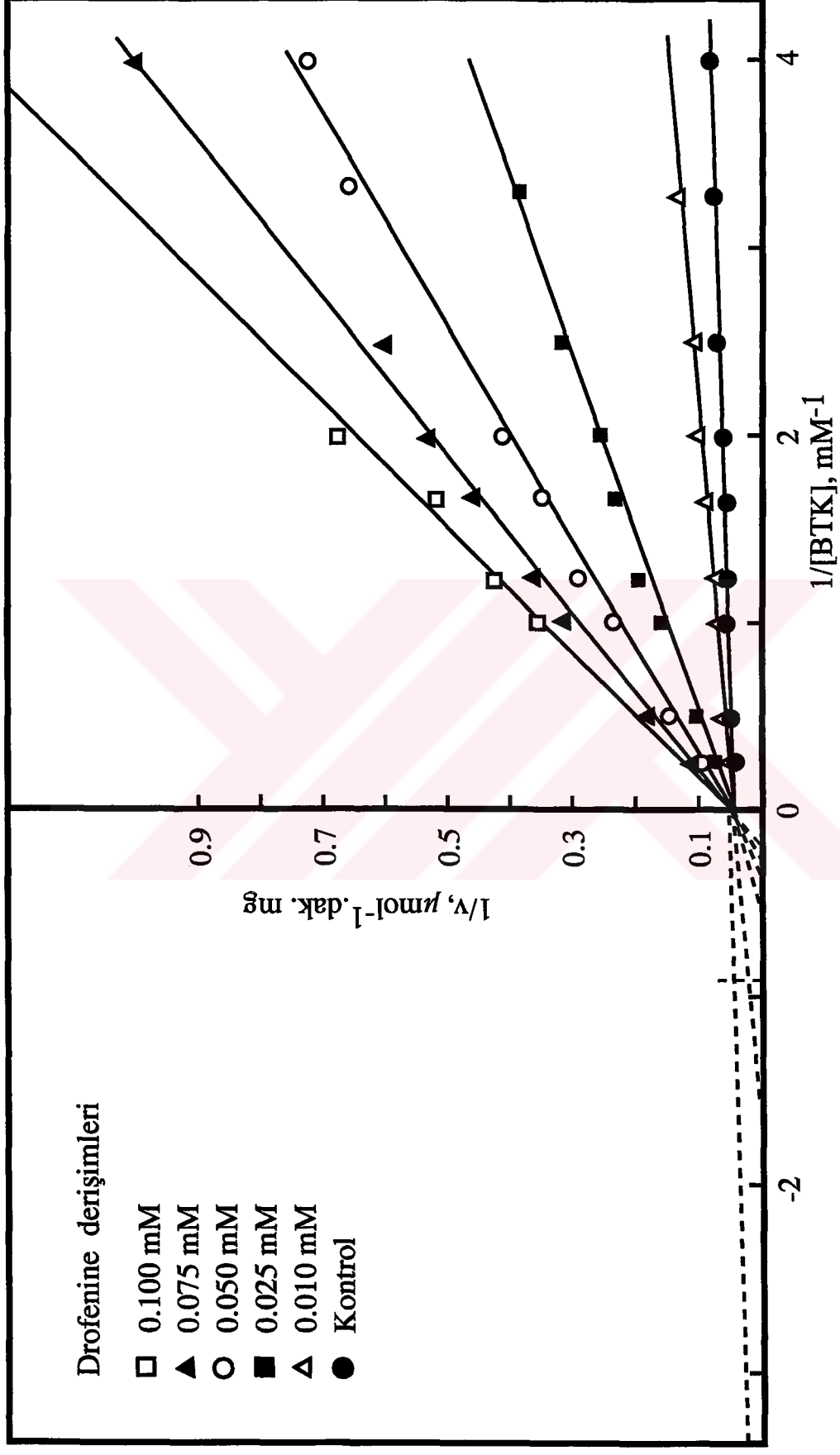
Şekil 4.9. Benactyzine'nin [S]/v karşı [I] grafiğı.



şekil 4.10. Benactyzine'nin Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.11. 4 mM BTK derişiminde serum BKE üzerine drofenine etkisi.



Şekil 4.12. Drofenine'nin Lineweaver-Burk grafiği.

TARTIŞMA

BKE, dört alt birimden oluşan globüler yapıda bir glikoproteindir. Enzim karaciğerde sentezlenip dolaşıma verilir Rhynäen (8). BKE'nin fizyolojik rolü henüz belirlenememiş olmasına rağmen toksikolojik ve farmakolojik özellikleri büyük önem taşımaktadır. Bu özellikleri yüzünden enzim, çeşitli hayvanların plazma başta olmak üzere çeşitli dokularından saflaştırılmış ve incelenmeye çalışılmıştır Main et al (15), Sarkarati et al (39), Çokuğraş and Tezcan (49).

Çalışmamızın ilk aşamasında insan serumundan BKE saflaştırıldı. Saflaştırmanın ilk basamağı Sarkarati et al (39)'nin Main et al (15)'den modifiye ederek uyguladığı "asitli amonyum sülfat kesitlemesi" yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu basamakta saflaşma 3.8 kez olarak saptandı (Bkz. Çizelge 4.1.).

Saflaşmanın ikinci basamağında afinite kromatografisi yöntemi kullanıldı. Prokainamid, BKE'nin saflaştırılmasında başarı ile kullanılan bir ligandır. Bu nedenle saflaştırmada kullanmak üzere önce Prokainamid-Sepharose 4B afinite jeli üretici firmanın önerdiği yöntem uygulanarak sentezlendi.

"Asitli amonyum sülfat kesitlemesi" basamağından elde edilen diyalizat, Prokainamid-Sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. BKE aktivitesi kolondan 0.2 M-2.0 M arasında hazırlanan lineer tuz gradienti ile tek zirve olarak 1.0 M NaCl derişiminde elüe edildi (Bkz. Şekil 4.1.). Bu basamakta enzim başlangıca göre 8100 kez daha saf bulundu.

Afinite kolonundan elde edilen enzimin saflık kontrolü % 5'lik PAGE ile yapıldı. Juul (77)'un önerdiği BKE aktivitesine dayalı jel boyama yöntemi ile elde edilen örnekte enzimin varlığı gösterildi. Ancak gümüş boyama sonucu afinite kolonundan çıkan örnekte birden fazla bant olduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.2).

Bu nedenle daha saf bir enzim elde etmek amacıyla ilk kromotografide elüe edilen en yüksek aktiviteye sahip enzim örnekleri toplandı ve ikinci kez Prokainamid-Sepharose 4B kolonuna uygulandı. BKE aktivitesi kolondan 0.2 M-2.0 M arasında hazırlanan lineer tuz gradienti ile tek zirve olarak 1.4 M NaCl derişiminde elüe edildi (Bkz. Şekil 4.3.). Enzimin bu basamaktaki saflık derecesi başlangıç aşamasına göre 17813 kez daha fazla bulundu.

Afinite kolonuna ikinci kez uygulamadan sonra elde edilen enzim örneği ile yapılan % 5'lik PAGE ile enzimin elektroforetik olarak saf olduğu gösterildi (Bkz Şekil 4.4. beşinci kolon.).

Çalışmanın ikinci aşamasında benactyzine ve drofenine adlı muskarinik reseptör antagonisti olan antikolinerjik ilaçların insan serum BKE'si üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi.

Ön deney olarak, sabit bir BTK derişiminde (4mM), artan benactyzine ve drofenine derişimlerinde ilk hızlar ölçülerek, v değerlerine karşı bu iki ilacın derişimleri grafiklendiğinde, benactyzine derişiminin artması ile hızın sıfıra ulaştığı gözlemlendi (Şekil 4.7.). Bu tip bir davranış kompetitif ya da lineer karışık tipdeki inhibisyonlarda gözlenir. Drofenine ile yapılan benzer çalışmada, 0.4 mM'ın üzerindeki derişimlerde, deney ortamında bulanıklık gözlemlendiğinden, hız ölçülemedi ve hızın sıfıra ulaşp ulaşmadığı saptanamadı (Şekil 4.11.).

Yapılan ön deneyde, benactyzine'nin enzimi kompetitif yada lineer karışık tipte inhibe ettiği anlaşılamadığından, tam olarak inhibisyon tipini saptayabilmek için artan benactyzine derişimlerinde, fakat farklı ve sabit BTK derişimlerinde hızlar ölçülerek $1/v$ değerlerine karşı $[I]$ değerleri grafiklendi. Çizilen grafikte farklı BTK derişimlerine ait doğruların ikinci bölgede bir noktada kesiştiği gözlemlendi(Bkz Şekil 4.8.). Bu tip bir davranış kompetitif ya da karışık tipteki inhibisyonlarda gözlenir. Bu nedenle $[S]/v$ değerlerine karşı

artan $[I]$ değerleri grafiklendi ve elde edilen doğrular birbirine paralel olduğundan, inhibisyonun kompetitif olduğuna karar verildi (Bkz. Şekil 4.9.). Aksi halde doğruların üçüncü bölgede kesişmesi gerekirdi Cornish-Bowden (79). İnhibisyonun kompetitif olduğunu doğrulamak için, aynı veriler kullanılarak $1/v$ 'ye karşı $1/[S]$ grafikleri çizildi. Ve kontrol doğrusu ile inhibisyon doğrularının $1/v$ eksenini üzerinde kesiştiği gözlemlendi (Şekil 4.10.).

Artan BTK derişimlerinde drofenine adlı ilacın farklı derişimleri kullanılarak yapılan kinetik deneyler sonucunda $1/v$ değerlerine karşı $1/[BTK]$ değerleri grafiklendi (Bkz. Şekil 4.11.). Daha önce Anabilim dalımızda yapılan araştırmalarda Özen (62) ve Sarkarati (39)'nin saptadığı gibi, insan serum BKE'ı substratına karşı "negative cooperativity" gösteren allosterik bir enzim olduğundan, yüksek ve düşük BTK derişimlerinde Lineweaver-Burk doğruları lineerlikten sapar. Elde edilen bulguların, Systat (version 5.03,1991) non-lineer regresyon analizi programı ile teker teker tüm inhibisyon modellerine uygunluğu denenmiş ve yapılan hesaplamalar sonucu kompetitif inhibisyon modeline uyduğu saptanmıştır. Bulguların Lineweaver-Burk doğruları çizildiğinde, doğruların $1/v$ ekseninde kesiştiği saptandı (Bkz. Şekil 4.12). Bu tip bir davranış inhibisyonun kompetitif olduğunu gösterir. Kompetitif inhibisyonda, substrat ve inhibitör aynı bölgeye veya birbirine yakın bölgelere bağlanırlar Segel (80).

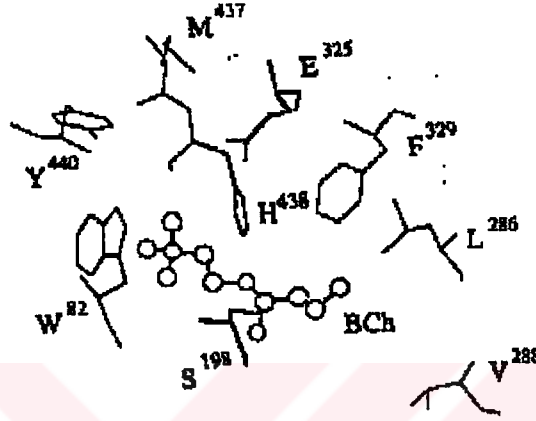
BKE'nin aktif merkezi 20 Å derinliğinde ve yaklaşık 200 Å³ hacime sahip bir girintinin dibine yerleşmiştir Masson et al (54). Aktif merkez girintisinin boynunu oluşturan bölgede sıralı amino asitlerin alifatik amino asitlerden oluşması BKE'nin AKE'a oranla daha büyük yapıda moleküller tarafından inhibisyona uğramasına olanak sağlar Vellom et al , Saxena et al (57,58). Mc Kenna et al (81) sikloheksil halkasına takılan ekler ile oluşturulan takrin analogları ile yaptıkları çalışmalarında, halka sayısının artışı ile BKE inhibisyonunda artışın paralel gittiğini ancak AKE inhibisyonunda benzer davranışın gözlenmediğini saptamışlardır.

Diagram illustrating the structure of a protein, likely a membrane protein, showing various domains and residues. The diagram includes the following labels:

- aklıf merkez girintisi
- hidrofobik boyun katmanları
- D⁷⁰
- Y⁴⁴⁰
- M⁴³⁷
- S¹⁹⁸
- F³²⁹
- L²⁸⁶
- substrat
- katalitik merkez
- kolun bağlayıcı cep
- ağıl bağlayıcı cep

BTK'daki kolinin pozitif yüklü bölgesi önce hidrofobik boynun girişinde bulunan Asp70'e bağlanır ve daha sonra bir konformasyon değişikliğine uğrayarak, aktif merkezde kolin bağlayan bölgedeki Trp82 ile etkileşime

girerek stabilize edilir. BTK'daki ester bağı ise katalitik üçlü olarak tarif edilen Ser198, His438 ve Glu325 tarafından hidrolize edilir (Bkz. Şekil 5.2.)



Şekil 5.2. BTK molekülü bağlamış BKE aktif merkez yapısı. (W 82, Trp82; S 198, Ser198; H 438, His438; E 325, Glu325; V 288, Val288; L 286, Leu286; F 329, Phe329; M 437, Met437; Y 440, Tyr440.)(Gnatt et al (82)'den).

Çalışmada benactyzine ve drofenine'in enzimin kompetitif inhibitörleri olduğu ve substratın enzime bağlanmasını engelledikleri saptanmıştır. Bu bulgu, BTK'nin K_s değeri ve ilaçların K_i değerlerinin karşılaştırılması ile de açıklanabilir. Saptadığımız değerler karşılaştırıldığında aşağıdaki gibi bir afinite sırası elde edilir. BTK'nin K_s değeri (0.159 ± 0.012) > benactyzine'nin K_i değeri (0.010 ± 0.001) > drofenine'in K_i değeri (0.003 ± 0.000). Afinite sırasından anlaşılacağı gibi, drofenine enzimin benactyzine'e oranla daha etkin bir kompetitif inhibitördür.

SONUÇLAR

1. BKE, insan serumundan 17 813 kez saflaştırıldı.
2. Enzimin K_s değeri, Systat (version 5.03, 1991) non-lineer regresyon analizi programı ile 0.159 ± 0.012 mM olarak saptandı.
3. Systat (version 5.03, 1991) non-lineer regresyon analizi programı ile benactyzine ve drofenine'in BKE'nin kompetetif inhibitörleri olduğu ve benactyzine'in K_i değeri 0.010 ± 0.001 mM ve drofenine'in K_i değeri ise 0.003 ± 0.000 mM olduğu saptandı.
4. K_i değerleri kıyaslanarak drofenine'nin benactyzine'e göre daha etkin bir kompetetif inhibitör olduğuna karar verildi.



KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Heilborn E., Molecular biology of cholinesterases: A background and an introduction, Prog. Brain Res., 98, 133 – 138, 1993.
2. Brown S. S., Kallow W., Pilz W., Whittaker M. and Woronick C. L., The plasma cholinesterases: A new perspective, Adv. Clin. Chem., 22, 1 – 123, 1981.
3. Friede R. L., A comparative histochemical mapping of butyryl cholinesterase in the brains of four species of mammals, including man, Acta Anat., 66, 161 – 177, 1967.
4. L'Hermite A., Sine J.P. and Colas B., Ultrastructural localization of Butyrylcholinesterase in epithelial cells of rat intestine, Eur. J. Histochem., 40, 299 – 304, 1996.
5. Walch L., Taisne C., Gascard J.P., Nashashibi N., Brük C. and Norel X., Cholinesterase activity in human pulmonary arteries and veins, Br. J. Pharmacol., 121, 986 – 990, 1997.
6. Layer P.G., Berger J. and Kinkl N., Cholinesterases precede “ON - OFF” channel dichotomy in the embryonic chick retinas before onset of synaptogenesis, Cell Tissue Res., 288, 407 – 416, 1997.
7. Chatonnet A. and Lockridge O., Comparison of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase, Biochem J., 260, 625 – 634, 1989.
8. Rhynäen R.J.J., Pseudocholinesterase activity in some body fluids, Gen. Pharmacol., 14, 459 – 460, 1983.

9. Huff J., Reiter C.T. and Protetch J., Activities and kinetic properties of lumbar cerebrospinal fluid cholinesterases in relation to clinical–diagnosis, severity and progression of Alzheimer's disease, *Can. J. Neurol. Sci.*, 16, 406 – 410, 1989.
10. Garcia – Pachon E., Padilla – Navas I., Sanchez J.F., Jimenez B. and Custardoy J., Pleural fluid to serum cholinesterase ratio for the seperation of transudates and exudates, *Chest*, 110, 97 – 101, 1996.
11. Prody C.A., Zevin – Sonkin D., Gnatt A., Goldberg O. and Soreq H., Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3555 – 3559, 1987.
12. Massoulie J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E. and Valette F.M., Molecular and cellular biology of cholinesterases, *Prog. Neurobiol.*, 41, 31–91, 1993.
13. Lockridge O., Structure of human serum cholinesterase, *Bioessays*, 9, 12 –128, 1988.
14. Lockridge O., and La Du B.N., Comparison of atypical and ususal human cholinesterase: purification, number of active sites, substrate affinity and turn-over number, *J. Biol. Chem.*, 256, 361 – 366, 1978.
15. Main A.R., Soucide W.G., Buxton I.L. and Arinç E., The purification of cholinesterase from horse serum, *Biochem J.*, 143, 733 – 744, 1974.
16. Harel M., Sussman J., Krejci E., Bon S., Chanal P., Massoulie J. and Silman I., Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase,

modeling and mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10827–10831, 1992.

17. Jokanović M. and Maksimovic M., Abnormal cholinesterase activity, understanding and interpretation, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 35, 11 – 16, 1997.
18. Ashani Y., Shapiro S., Levy D., Wolfe A.D., Doctor B.P. and Raveh L., Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase prophylaxis against soman poisoning in mice, *Biochem. Pharmacol.*, 41, 37 – 41, 1991.
19. Broomfield C.A., Maxwell D.M., Solana R.P., Castro C.A., Finger A.V. and Lenz D.E., Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorous poisoning in nonhuman primates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259, 633 - 638, 1991.
20. Raveh L., Grunwald J., Marcus D., Papier Y., Cohen E. and Ashani Y., The butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity, *Biochem. Pharmacol.*, 45, 2465 – 2474, 1993.
21. Raveh L., Gramer E., Grunwald J., Cohen E. and Ashani Y., The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with BChE, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 145, 43 – 53, 1997.
22. Gorelick D.A., Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy, *Drug Alcohol Depen.*, 48, 159-165, 1997.
23. Kutty K.M., Huang S.N. and Kean K.T., Pseudocholinesterase in obesity: hypercaloric diet induces changes in experimental obese mice, *Experientia*, 37, 141 – 142, 1981.

24. Jain R., Kutty K.M., Huang S.N. and Kean K.T., Pseudocholinesterase HDL cholesterol ratio in serum of normal persons and hyperlipoproteinemics, Clin. Chem., 2916, 1031 – 1033, 1983.
25. Van Lith H.A., Meijer G.W., Haller M. and Beynen A.C., Serum pseudocholinesterase activity in rabbits fed simvastatin, Biochem. Pharmacol., 41, 460- 461, 1991.
26. Gomez – Ramos P. and Moran M.A., Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in senile plaques in the brains of the aged and Alzheimer's disease patients, Moll. Cell. Neuropathol., 30, 161–173, 1997.
27. Wright C.T., Mesulam M.M. and Geula C., Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia, Ann. Neurol., 36, 722 – 727, 1994.

- proliferation and alters morphogenesis, J. Neurochem., 69, 823 – 833, 1997.
32. Layer P.G., Cholinesterases in embryonic chick brain, AD Assoc. Disorders., 9, 23 – 28, 1995.
33. De La Escalera S., Bockamp E.O., Moya F., Piovant M. and Jimenez F., Characterization and gene cloning of neurotactin, a drosophila transmembrane protein related to cholinesterases, EMBO J., 9, 3593 – 3601, 1990.
34. Rao R.V. and Balasubramanian A.S., The peptidase activity of human serum butyrylcholinesterase: studies using monoclonal antibodies and characterization of the peptidase, J. Protein Chem., 12, 103 – 110, 1993.
35. Balasubramanian A.S. and Bhanumaty C.D., Non-cholinergic functions of cholinesterases, FASEB J., 7, 1354 – 1358, 1993.
36. Sarkarati B., Çokuğraş A.N. ve Tezcan E.F., Lityumun beyin ve serum butirilkolinesterazı üzerine etkisi, Biyokimya dergisi, 22, 16 – 20, 1997.
37. Çokuğraş A.N. and Tezcan E.F., Inhibition kinetics of brain butyrylcholinesterase by Cd^{+2} and Zn^{+2} , Ca^{+2} or Mg^{+2} reactivates the inhibited enzyme, Int. J. Biochem., 25, 115 – 120, 1993.
38. Çokuğraş A.N., and Tezcan E.F., Aluminum inhibiton of brain pseudocholinesterase, Trace elements in health and disease (editors: Yüreğir G.T., Donma O., Kayrın L.), sf. 415–420, Çukurova University Publishing Company.

39. Sarkarati B., Çokuğraş A.N., and Tezcan E.F., Inhibition kinetics of human serum butyrylcholinesterase by Cd^{2+} , Zn^{2+} and Al^{3+} : Comparison of the effects of metal ions on cholinesterases, *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 122, 181-190, 1999.
40. Arpagaus M., Kott M., Vartsis K.P., Bartels C.F., La Du B.N. and Lockridge O., Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy, *Biochemistry*, 29, 124 – 131, 1990.
41. Soreq H., Zamir R., Zevin – Sonkin D. and Zakut H., Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16, *Hum. Genet.*, 77, 125 – 128, 1987.
42. Gnatt A., Prody C.A., Zamir R., Lieman – Hurwitz J., Zakut H. and Soreq H., Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase m-Rna transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous system tumours, *Cancer Res.*, 50, 1983–1987, 1990.
43. Sternfield M., Rachmilewitz J., Loewenstein – Lichtenstein Y., Andreas C., Zimberg R., Ben – Ari S., Soreq H. and Zakut H., Normal and atypical butyrylcholinesterases in placental development, function and malfunction, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 17, 315 – 332, 1997.
44. Krasowski M.D., Mc Gehee D.S. and Moss J., Natural inhibitors of cholinesterases: implications for adverse drug reactions, *Can. J. Anaesth.*, 44, 525 – 534, 1997.
45. Primo – Parmo S.L., Lightstone H. and La Du B.N., Characterization of an unstable variant of human butyrylcholinesterase, *Pharmacogenetics*, 7, 27 – 34, 1997.

46. Brass N., Rácz A., Heckel D., Remberger K., Sybrecht w. and Meese E.U., Amplification of the genes BCHE and SLCA2A2 in 40 % of squamous cell carcinoma of the lung, *Cancer Res.*, 57, 2290 – 94, 1997.
47. Millard C.B., Lockridge O. and Broomfield C.A., Design and expression of organophosphorous acid anhydrolase activity in human butyrylcholinesterase, *Biochemistry*, 34, 15925 – 15933, 1995.
48. Tezcan E.F., İnsan serum psödokolinesterazının sedimentasyon ve difüzyon çalışmaları. *Biyokimya dergisi*, 2, 22 – 32, 1977.
49. Çokuğraş A.N. and Tezcan E.F., Sheep brain pseudocholinesterase: Inhibition kinetics of the partially purified enzyme by some substrate analogs, *Chem.-Biol. Interactions*, 87, 259 – 264, 1993.
50. Saxena A., Raveh L., Ashani Y. and Doctor B.P., structure of glycan moieties responsible for the extended circulatory life time of fetal bovine serum acetylcholinesterase and equine serum butyrylcholinesterase, *Biochemistry*, 36, 7481 – 7489, 1997.
51. Froment M.T., Lockridge O. and Masson P., Resistance of Butyrylcholinesterase to inactivation by ultrasound: effects of ultrasound on catalytic activity and subunit association, *Biochim. Biophys. Acta*, 1387, 53 – 64, 1998.
52. Çokuğraş A.N. and Tezcan E.F., Amitriptyline, a potent inhibitor of butyrylcholinesterase from the human serum, *Gen. Pharmac.*, 29, 835 – 838, 1997.

53. Millard C.B. and Broomfield C.A., A computer model glycosylated human butyrylcholinesterase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189, 1280 – 1286, 1992.
54. Masson P., Froment M.T., Bartels C.F. and Lockridge O., Asp 70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase, *Eur. J. Biochem.*, 235, 36 – 48, 1996.
55. Masson P., Legrand P., Bartels C.F., Froment M.T., Schopfer L.M. and Lockridge O., Role of Asp 70 and Trp 82 in binding succinylthiocholine to the butyrylcholinesterase, *Biochemistry*, 36, 2266 – 2277, 1997.
56. Radić Z., Pickering N.A., Vellom D.C., Camp S. and Taylor P., Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors, *Biochemistry*, 32, 12074 – 112084, 1993.
57. Vellom D.C., Radić Z., Li Y., Pickering N.A., Camp S. and Taylor P., Aminoacid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity, *Biochemistry*, 32, 12 – 17, 1993.
58. Saxena A., Redman A.M., Jiang X., Lockridge O. and Doctor B.P., Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to the human butyrylcholinesterase, *Biochemistry*, 36, 14642 – 14651, 1997.
59. La Du B.N. Plasma esterase activity and the metabolism of drugs with ester groups, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 179, 684 – 694, 1971.

60. Agustinsson K.B., Bartfai T. and Mannervik B., A steady-state kinetic model of butyrylcholinesterase from horse plasma, *Biochem. J.*, 141, 825 – 834, 1974.
61. Tezcan E.F., Psödokolinesterazın allosterik kinetik özellikleri, Ph.D. tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 1969.
62. Özen S., Psödokolinesterazın kinetik özellikleri. Ph.D. tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1989.
63. Galli A., Ranamdo E., Giannini L. and Costagli C., Reversible inhibition of cholinesterases by opioids: possible pharmacological consequences, *J. Pharm. Pharmacol.*, 48, 1164 – 1168, 1996.
64. Grecšl V., Bajgar J., Krs O., Hrdina R., Palička V. and Mazurová Y., Changes in cholinesterase activities after danorubicin administration to rabbits, *Hum. Exp. Toxicol.*, 15, 834 – 838, 1996.
65. Krenic Z. and Bradamante V., Effects of Oxprenolol treatment in pseudocholinesterase and lipids on rats, *Arznei. Forsch.*, 47, 910 – 913, 1997.
66. Sitar D.S., Clinical pharmacokinetics of Bambuterol, *Clin. Pharmacokinet.*, 31, 246 – 256, 1996.
67. Masson P., Froment M.T., Fortier P.L., Visicchio J.E., Bartels C.F. and Lockridge O., Butyrylcholinesterase catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin- related neutral esters, *Biochim. Biophys. Acta*, 1387, 41 – 52, 1998.

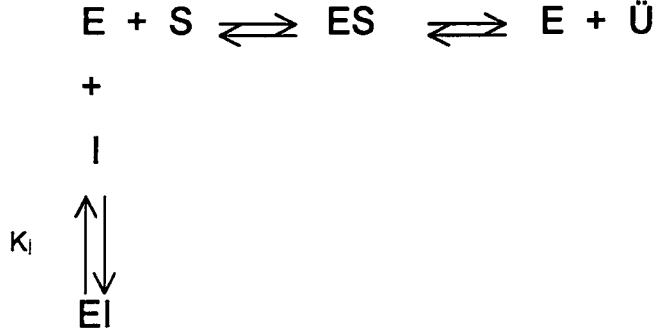
68. Giacobini E., From molecular structure to Alzheimer therapy, *Jpn. J. Pharmacol.*, 74, 225 – 241, 1997.
69. Kassa J. and Fusek J., Effect of Panpal treatment and antidotal treatment (HI-6 plus benactyzine) in respiratory and circulatory function in soman poisoned rats, *Human Exp. Toxicol.*, 16, 563–569, 1997.
70. Lockridge O., Blong R.M., Masson P., Froment M.T., Millard C.B. and Broomfield C.A., A single aminoacid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorous acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase, *Biochemistry*, 36, 786
71. Shih T.M., Koviak T.A. and Capacio B.R., Anticonvulsants for poisoning by the organophosphorous compound soman: pharmacological mechanisms, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 150, 349 – 362, 1991.
72. Modern Drug Encyclopedia, (Editor: Lewis A.J.), sf. 41-42, Yorke Medical Group Reuben H. Donnelley Corp., 1970.
73. Kunysz E.L., Michel A.D. and Whiting R.L., Functional and direct binding studies using subtype selective muscarinic receptor antagonists, *Br. J. Pharmacol.*, 93, 491 – 500, 1988.
74. Bradford M.M., A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Biochemistry*, 72, 248 – 254, 1970.

75. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. and Featherstone R.M., a new colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88 – 95, 1961.
76. Davis B.J., *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 121, 404 – 427, 1964.
77. Juul P., Human plasma cholinesterase isoenzymes, *Clin. Chim. Acta.*, 19, 205-213, 1968.
78. Short protocols in molecular biology, (editors Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., and Struhl K.), sf. 10-30 – 10-31, 1992.
79. Cornish – Bowden, A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetetive and non-competetive inhibitors, *Biochem J.*, 137, 143 –144, 1974.
80. Segel I.R., *Enzyme Kinetics*, sf. 110– 120, John Wiley, Toronto, 1975.
81. Mc Kenna M.T., Proctor G.R., Young L.C. and Harvey A.L., Novel tacrine analogues for potential use against Alzheimer's disease: potent and selective acetylcholinesterase inhibitors and 5-HT uptake inhibitors, *J. Med. Chem.*, 40, 3516 – 3523, 1997.
82. Gnatt A., Loewenstein Y., Yaron A., Schwarz M., and Soreq H., Site-directed mutagenesis of active site residues reveals the plasticity of human butyrylcholinesterase in substrate and inhibitor interactions, *J. Neurochem.*, 62, 749 – 755, 1994.

EK BİLGİLER Segel (80)

Kompetetif inhibisyon:

Serbest enzim ile birleşerek substrat bağlanmasını engelleyen bileşiklere kompetetif inhibitör denir.



Bu tip inhibisyonda inhibitör ve substrat karşılıklı olarak aynı yada birbirine yakın bir bölgeye bağlanmak için yarışır.

Kompetetif inhibisyonu tanımlayan eşitlik aşağıda belirtilmiştir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V_m(S)} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + \frac{1}{V_m}$$

Bu modele göre tepkimenin ilk hızı ES kompleksinin yatışkın durum derişimine doğru orantılıdır. Bir kompetetif inhibitör sadece substrat için gözlenen K_s değerini artırır. V_m değeri değişmez ancak bir kompetetif inhibitör varlığında V_m değerine ulaşmak için gereken substrat derişimi daha fazladır.

İnhibitörsüz doğru (Kontrol doğru) ve inhibitörlü doğrular $1/v$ ekseninde $1/V_m$ değeri üzerinde kesişirler. Bu tip bir davranış kısmi kompetetif inhibisyon sistemlerinde de gözlenir. Bu iki tip inhibisyonu ayırmak için Dixon eşitliğinden yararlanılır. Kompetetif inhibisyon için Dixon eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s + (S)}{V_m(S)} + \frac{K_s(I)}{K_i V_m(S)}$$

Bu eşitlikte eğim $K_m / V_m K_i [S]$ olarak bulunur. Ayrıca $1/v$ değerlerine karşı $[I]$ grafiklendiğinde artan substrat derişimine sahip doğruların ikinci bölgedeki kesişim noktalarının $[I]$ eksenine izdüşümü K_i , $1/v$ eksenine izdüşümü ise $1/V_m$ değerlerini verir.



ÖZGEÇMİŞ

8.8. 1971 yılında İzmir’de doğdu. Orta okul ve lise öğretimini İzmir Amerikan Kız Lisesi’nde yaptı. 1989 yılında mezun oldu. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler bölümünde lisans eğitime başladı.1995 yılında aynı bölümden mezun oldu. 1996 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başladı ve halen aynı bölümde çalışmalarına devam etmektedir.

