

**ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİNİN İNSAN  
ERİTROSİTLERİNDEN AFİNİTE  
KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

**Habibe BUDAK KAYA**

**Doktora Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR  
2012  
Her Hakkı Saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİNİN İNSAN  
ERİTROSİTLERİNDEN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE  
SAFLAŞTIRILMASI**

**Habibe BUDAK KAYA**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ERZURUM**

**2012**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Asetilkolinesteraz Enziminin İnsan Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Habibe BUDAK KAYA tarafından hazırlanan bu çalışma 26.../01.../2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu (.../...)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza

Üye : Doç. Dr. Abdülkadir ÇOBAN

İmza

Üye : Doç. Dr. Ahmet MAVİ

İmza

Üye : Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.  
Proje No: 2009/80

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Doktora Tezi

### ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİNİN İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI

Habibe BUDAK KAYA

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Asetilkolinesteraz (AChE) (E.C.3.1.1.7) beyinin gri cevherinde, sinir hücrelerinde, kasta, akciğer, dalak ve eritrositlerde bulunur. Aynı zamanda sarkoplazmik retikulum, lökosit, trombosit, kemik iliği ve plasentada da mevcuttur. Asetilkolinesteraz kolinerjik sinapsiste nörotransmitter asetilkolini hidroliz eder ve birçok fiziksel olayın düzenlenmesinde önemli rol oynar.

Bu çalışmada, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B matriksine tirozin uzantı kolu olarak takıldı. Enzimin inhibitörü olan 1,2,3,4-tetrahidro-9-aminoakridine molekülü tirozine kenetlendirilerek yeni bir afinite jeli hazırlandı ve bu jelden asetilkolinesteraz enzimi insan eritrositlerinden saflaştırıldı. Kan numunelerinde plazma ve lökosit tabakaları santrifüjlenerek ayrıldı. Tüplerin altında kalan eritrosit peleti %0,9 (izotonik) NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Her defasında 2500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin 3 katı kadar buzlu hemoliz çözeltisi ile hemoliz edildi ve +4 °C'de 13.000xg'de 60 dakika santrifüj yapıldı. Çökelek kısmı (membranlar) alınarak 5mL 0,1 M (pH: 7,4) Na-fosfat tamponu içinde süspanse edildi ve %1'lik Triton X-100 ile çözündürüldü. Santrifügasyondan sonra (4°C de, 13.000xg'de 60 dk) üst kısımdaki süpernatant alındı. Hazırlanan 5 mL hemolizat afinite kolonuna verildi. Saflaştırma basamakları sonucunda 0,0153 mg AChE, %23,5 verimle 658 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi ve tek bant bulundu (80 kDa). Enzim aktivite ölçümünde pH:7,4'de asetiltiyokolin iyodat substratı kullanıldı. Saflaştırılan AChE 'ın 20°C'de pH:7,4'de  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,372 mM ve 0,065 EÜ/mL.dk olarak belirlendi. Hazırlanan afinite kolonunda bağlanma kapasitesi 20°C'de pH:7,4 ve 0,1 M iyonik şiddet konsantrasyonunda 0,07 mg/g jel ve ligand olarak kullanılan takrin inhibitörü  $I_{50}$  değeri  $4,5 \cdot 10^{-5}$  mM olarak belirlendi.

2011, 80 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Afinite, Asetilkolinesteraz, Kinetik, İnhibisyon

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### PURIFICATION OF ACETYLCHOLINESTERASE FROM HUMAN ERYTHROCYTE BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Habibe BUDAKKAYA

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemical Engineering  
Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Acetylcholinesterase (AChE) (E.C.3.1.1.7) is found into gray substance of brain, nerve cells, muscles, lung and erythrocytes. Acetylcholinesterase cholinergic makes neurotransmitter acetylcholine hydrolyzed at synapsis and it has an important role in arranging several physical phenomenons.

In this study, Sepharose-4B was joined as an helping arm to matrix a new affinity gel was prepared to join that enzyme inhibitor by 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine and acetylcholinesterase enzyme of this gel was purified from the human erythrocytes in blood sample, plasma and leukocyte layer were separated from each other by centrifuge. Erythrocytes pellet remaining down tubes have been washed with %0,9 (isotonic) NaCl solution three times. It has been centrifuged at 2500 xg during 15 minutes in each time. They have been hemolyzed as more as three times with ice obtaining erythrocytes volumes by hemolysis solution and at + 4°C, 13.000 xg and 60 minutes, centrifuge has been made. After centrifuge, supernatant has been received (at 4°C, 13.000xg 60 minutes). As picking up sediment part (membranes) into 5mL 0,1 M (pH: 7,4) Na-phosphate buffer has been made dispersible and it has been solubilized by %1'lik Triton X-100. Arranged 5 ml hemolysis has been given to affinity column. At the result of purifying phases, 0,0153 mg AChE has been purified with %23,5 efficiency 658 floor. Enzyme purity of purified has been controlled with SDS-PAGE and single band has been found (80 kDa). At enzyme activity measure, acetylcholine iodate substrate has been used. Purified AChE at 20°C, at pH:7,4 Km and Vmax values respectively as 0,372mM and 0,065 EÜ/mL.minutes have been determined. Affinity column arranged column bonding capacity at 2°C pH:7,4 and 0,1 M ionic intensity concentration as using 0,07 mg/g gel and ligand tacrine inhibitor I<sub>50</sub> value as 4,5.10<sup>-5</sup>mM has been determined.

**2011, 80 pages**

**Keyword:** Affinity, acetylcholinesterase kinetics, inhibition

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımnda her zaman bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın bütün aşamalarında bölümün bütün imkânlarını benden esirgemeyen dekanımız Sayın Prof. Dr. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Nurullah SARAÇOĞLU'na, tez izleme komitemde yer alan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr İlhami GÜLÇİN'e ve Eğitim Fakóltesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr Ahmet MAVİ'ye Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ayrıca çalışmalarım boyunca her türlü yardımı esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Melda şİşECİOĞLU'na, Araştırma görevlisi Sayın Zuhal ALIM'a ve doktora öğrencisi Sayın Bilge ÖZCAN'a ayrıca Biyokimya Araştırma Laboratuvarında alışan bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün bütün elemanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı ailemin bütün fertlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Habibe BUDAK KAYA

Ocak 2012

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Afinite Kromatografisi .....	18
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>32</b>
3.1. Materyal.....	32
3.2. Kullanılacak Kimyasal Maddeler .....	32
3.3. Yararlanılacak Alet ve Cihazlar .....	32
3.4. Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması .....	33
3.5. Yöntemler.....	35
3.5.1. Protein Tayini .....	35
3.5.1.a. Kalitatif Protein Tayini .....	35
3.5.1.b. Bradford Yöntemi İle Protein Tayini .....	35
3.5.2. İnsan Eritrosit AChE Enziminin Aktivitesinin Ellman Metoduyla Tayini .....	36
3.5.3. İnsan Eritrosit AChE Enziminin Saflaştırılması .....	38
3.5.3.a. AChE İnhibitörleri ve Ligand Seçimi.....	38
3.5.3.b. Kan Temini ve Hemolizat Hazırlanması .....	43
3.5.3.c. Sepharose-4B-L-tirozin Afinite Jelinin Hazırlanması.....	44
3.5.3.d. Takrin Kenetlenmesi:.....	45
3.5.3.e. Afinite Kolonunun Paketlenmesi.....	46
3.5.3.f. Afinite Kolonuna Numune Tatbiki ve Elüsyonu .....	46
3.5.3.g. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü .....	46
3.6. Afinite Kolonunun AChE Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi .....	48

3.6.1.Sıcaklığın Kolon Kapasitesine Etkisi .....	48
3.6.2.pH'nın Kolon Kapasitesine Etkisi .....	48
3.6.3. İyonik Şiddetin Kolon Kapasitesine Etkisi .....	49
3.7. İnsan Eritrosit Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmalar .....	49
3.7.1. İnsan Eritrosit Asetilkolinesteraz Enzimi İçin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması .....	49
3.7.2. Takrin İçin Kinetik Çalışmalar .....	50
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>51</b>
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik .....	51
4.2. Eritrositlerden AChE Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları .....	51
4.2.1. AChE Enziminin Saflaştırma Basamakları Sonuçları .....	51
4.2.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları .....	53
4.3. Afinite Kolonunun Asetilkolinesteraz Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi .....	54
4.3.1.Sıcaklığın Kolon Kapasitesine Etkisi .....	54
4.3.2. pH'nın Kolon Kapasitesine Etkisi .....	55
4.3.3.İyonik Şiddetin Kolon Kapasitesine Etkisi .....	55
4.4.Asetilkolinesteraz Enzimine Üzerine Kinetik Çalışmalar .....	56
4.4.1. Asetiltiyokolin İyodat Substratı İçin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması .....	56
4.4.2. Takrin İnhibitörü $K_i$ ve $I_{50}$ Değerlerinin Bulunması .....	58
<b>5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....</b>	<b>63</b>
KAYNAKLAR .....	76
ÖZGEÇMİŞ .....	80



## SİMGELER DİZİNİ

AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
BChE	: Bütilkolinesteraz enzimi
DTNB	: 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit )
E.C.	: Enzim kod numarası
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EÜ	: Enzim ünitesi
I	: İnhibitör
PAGE	: Poliakrilamid jel eLektroforezi
PER	: Amonyum persülfat
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TCA	: Triklor asetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
Tris	: Trihidroksimetil aminometan

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin genel prensibi 1'de ligand matrikse kovalent bağlanır, 2'de saflaştırılacak numune kolona adsorbe olup. Safsızlıklar akar ve 3'de numune elde edilir. ....	20
Şekil 1.2. Uzantı kolunun afinite koromatografisindeki rolü.....	23
Şekil 1.3. CNBr ile aktifleştirilmiş matrikse primer amino grubunun katılması. ....	26
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.....	51
Şekil 4.2. Takrin kolonundan AChE enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatlarda 280 absorbans ve 412 nm de elde edilen aktivite değerleri.....	52
Şekil 4.3. SDS-PAGE fotoğrafı: Bant a; Standarlar; Bant 2 ve 3; saflaştırılmış AChE. ....	53
Şekil 4.4. Sepharose-4B-takrin jelinin farklı sıcaklıklarda enzimi tutma kapasitesi grafiği.....	54
Şekil 4.5. Sepharose-4B-takrin jelinin farklı pH'larda enzimi tutma kapasitesi grafiği.....	55
Şekil 4.6. Sepharose-4B-takrin jelinin farklı iyonik şiddetlerde enzimi tutma kapasitesi grafiği.....	56
Şekil 4.7. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği.....	57
Şekil 4.8. AChE için asetiltiyokolin iyodat substratına bağlı olarak takrin ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği .....	59
Şekil 4.9. AChE enzimi için asetiltiyokolin substratıyla takrin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği. ....	61

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.....	21
Çizelge 1.2. Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlanabildikleri jeller.....	25
Çizelge 4.1. İnsan kanından AChE enziminin saflaştırma basamakları sonuçları.....	52
Çizelge 4.2. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla elde edilen $1/V-1/[S]$ deney prosedürü.....	57
Çizelge 4.3. eritrositlerden elde edilen AChE'nin Asetiltiyokolin iyodat substratı ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları.....	58
Çizelge 4.4. Takrin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen AChE için, asetiltiyokolin iyodat substratıyla yapılan % Aktivite-konsantrasyon deney prosedürü.....	59
Çizelge 4.5. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla takrin eşliğinde elde edilen $1/V,1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	61
Çizelge 4.6. AChE enziminin üç farklı inhibitör konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen $K_i$ değerleri ve sabit substrat konsantrasyonunda 5 farklı inhibitör konsantrasyonuna karşı çizilen aktivite – [inhibitör] grafiğinden elde edilen $I_{50}$ değerleri.....	62

## 1. GİRİŞ

Enzimler canlı organizmalardaki reaksiyonları hiç bir yan ürün oluşturmadan %100'lük bir ürün verimi sağlayarak katalizleyen, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin en önemli özellikleri katalizleme güçleri ve spesifiklikleridir (Keha ve Küfrevioğlu 2009; Lehninger 1982).

Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirlerken, bazıları da protein yapısında olmayan kofaktör adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi koenzim denilen kompleks bir bileşik de olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir (Lehninger 1982; Bingöl 1983; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler büyük bir bölümü protein yapısında olan ve canlı bünyesindeki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen biyomakromoleküllerdir. Enzimler diğer proteinler gibi, yaklaşık olarak 12.000'den 1000000 kadar değişen molekül kütlesine sahiptirler. Bazı enzimler aminoasit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara ihtiyaç duymazlar. Diğerleri kofaktör olarak adlandırılan  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  veya  $Se^{2+}$  gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metaloorganik moleküllere gereksinim duyarlar.

Bazı enzimlerin ise, aktivite gösterebilmeleri için hem koenzime hem de bir veya daha fazla metal iyonuna ihtiyacı vardır. Protein yapısına çok sıkı olarak hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır. Metal iyonları ile veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim olarak adlandırılırken bu gibi enzimlerin sadece protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılmaktadır. Koenzimler, tiamin pirofosfat; aldehitler, koenzim A; açıl grupları gibi özgül işlevsel grupların geçici taşıyıcısı olarak görev yaparlar.

Koenzimler çoğunlukla, diyet ile düşük miktarlarda alınan organik besinler olan vitaminlerden temin edilirler (Nelson and Cox 2005).

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derecede spesifik olmalarıdır. Böylece enzimler, hücre içinde meydana gelen reaksiyonların hatasız ve hiçbir yan ürün oluşmadan yürütülmesine olanak verirken, aynı zaman da üstün katalizleme gücü sayesinde laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmesi çok zaman alan ve çok sayıda basamağa ihtiyaç duyulan, bazen de yüksek sıcaklık, yüksek basınç, aşırı bazik veya asidik ortam gerektiren reaksiyonların hücre içi şartlarda saliselerle ölçülebilecek kısa zaman aralıklarında meydana gelmesini sağlar (Lehninger 1982; Bingöl 1983; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim kinetiği enzimler tarafından katalizlenen reaksiyon hızlarının incelendiği ve kimyasal kinetiğin temel prensiplerinin geçerli olduğu bir konudur. “Michaelis-Menten” denklemi, hemen hemen bütün enzimler için enzimatik etkinin kantitatif incelenmesinde kullanılan temel bir ifadedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

$$V=V_{\max} \times [S]/K_m+[S]$$

Bu denklemde  $V_{\max}$  (maksimum hız); enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir.  $V_{\max}$  değerine belirli konsantrasyondaki enzimin substratıyla doygunluk durumunda ulaşılır. Her enzimin  $V_{\max}$  değeri birbirlerinden çok farklı olup enzim miktarı, substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişir (Lehninger 1982).

Denklemden  $K_M$  maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu olarak tarif edilir ve birimi mol/L dir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde her bir substrat için ayrı bir  $K_M$  değeri bulunur.  $K_M$  değeri enzimin konsantrasyonuna bağlı olmayıp, substratın yapısına, pH'ya, sıcaklığa ve iyonik şiddete bağlıdır. Birçok enzim için bu değer  $10^{-1}$  ile  $10^{-6}$  M arasındadır. Birden fazla substrata sahip enzimlerde her bir substrat için ayrı bir  $K_M$  değeri vardır.

Bir enzimin kinetik özellikleri hakkında en faydalı bilgiler Michaelis-Menten denkleminde yer alan enzimin substrata ilgisini ifade eden  $K_M$  sabiti ve enzimin katalitik aktivitesini gösteren  $V_{max}$  değerlerinden elde edilir. Değişik substrat konsantrasyonlarında hızlar bulunarak  $V$ - $[S]$  grafiği (Michaelis-Menten grafiği) veya  $1/V$ - $1/[S]$  grafiği (Lineweaver-Burk grafiği) ile  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulunur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim aktivitesi; substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörlerin konsantrasyonlarından etkilenir. Enzimler, optimum pH ve doygunluğun üzerindeki substrat konsantrasyonlarında çalışırlar. Böylece sıfırıncı dereceden bir reaksiyon oluşur. Enzim kofaktör içeriyorsa, koenzim veya metal iyonları konsantrasyonları doygunluğun çok üzerinde alınır. Bu durumda sistemde hızı sınırlayan tek faktör enzim konsantrasyonudur. Yani bu durumda hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır. Bu yüzden düşük substrat konsantrasyonlarında elde edilen değerler daha az sağlıklıdır (Lehninger 1982).

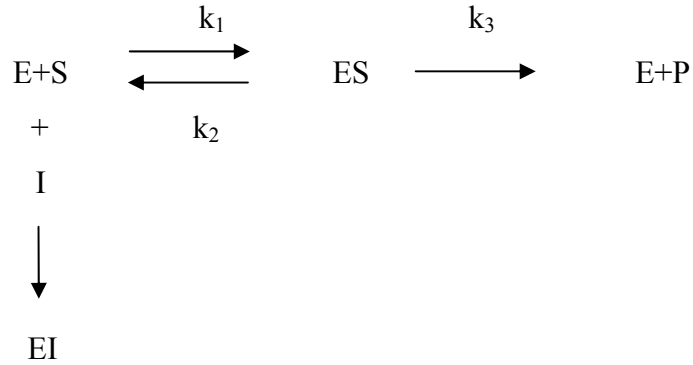
Bir çözelti veya doku ekstraktındaki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden faydalanılarak bulunur. Bunun için enzim hakkında; katalizlenen reaksiyon denkleminin net stokiyometrisi, enzimin kofaktör veya metal iyonuna ihtiyacı olup olmadığı, substrat ve varsa kofaktör için  $K_M$  değeri, optimum pH'sı, enzimin kararlı ve aktivitesinin yüksek olduğu sıcaklık aralığı, substratın kayboluş ve ürün oluşum hızlarının tespit edildiği basit bir analitik metod bilgileri gereklidir. Enzimler için genel ünite tanımı "25°C'de ve optimal şartlarda 1µmol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı" olarak tanımlanmıştır, buna bir enzim ünitesi denir (Lehninger 1982; Bingöl 1983; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimlerin katalizleme güçleri "turnover sayısı" denilen ve "birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı" olarak tarif edilir. Enzimlerin in vivo ve in vitro aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına "inhibisyon", bu olaya sebep olan bileşiklere de "inhibitör" denilir.

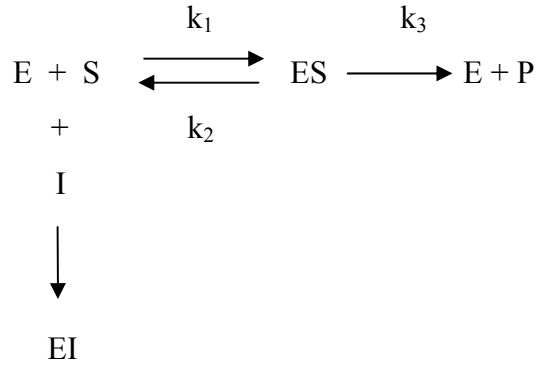
Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılır.

Enzimatik inhibisyon başlıca dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının uyarılmasında önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna bir örnektir. Bu gazlardan diizopropilflorofosfat, enzimin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidiyle reaksiyona girerek inaktif diizopropilflorofosfo-enzimi oluşturur.

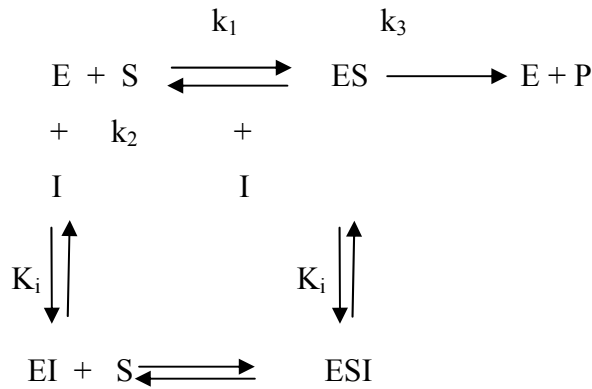
Dönüşümsüz inhibisyonda  $V_{max}$  (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır,  $K_M$  ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır. Reaksiyon şeması aşağıda gösterildiği gibidir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitör yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılarak inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken,  $K_M$  değeri artar. Yarışmalı inhibitör varlığındaki reaksiyonun şeması aşağıda gösterildiği gibidir.

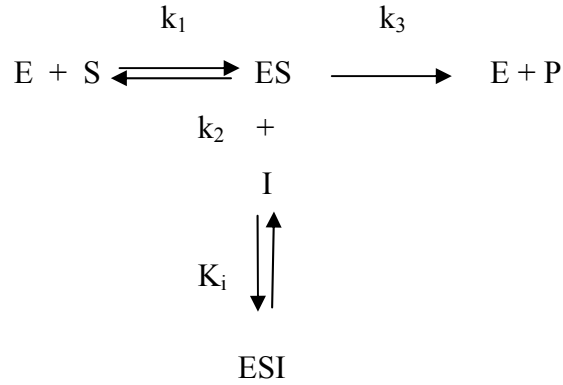


Yine dönüşümlü bir inhibisyon tipi olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon'da inhibitör ve substrat enzime aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada inhibitör ve substrat arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin  $V_{\max}$  değeri azalırken  $K_M$  değeri sabit kalır. İnhibitör ve substrat farklı bölgelere bağlandığından enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir; EI ve ESI. Reaksiyonun şeması aşağıda gösterildiği gibidir.



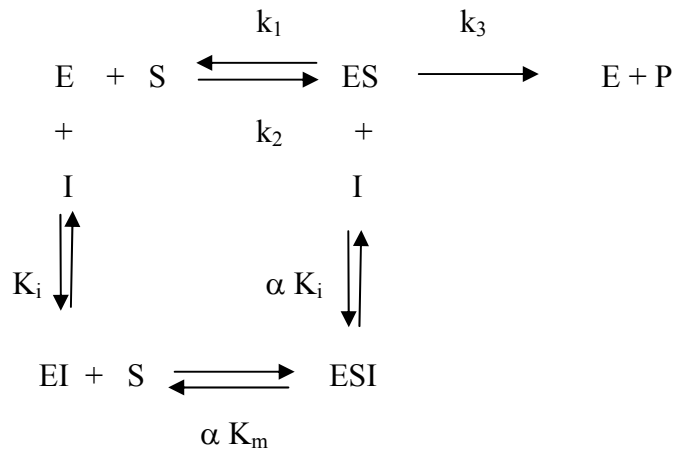
Bir başka dönüşümlü bir inhibisyon tipi olan yarı yarışmalı (nonkompetitif) inhibisyon'dur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona seyrek rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Reaksiyon şeması aşağıda gösterildiği gibidir.





ESI kompleksi ortamda sürekli var olacağından yarı yarışmalı inhibitör varlığında  $V_{\max}$  azalır. ESI kompleksini oluşumu vasıtasıyla ES kompleksi ortamdan sürekli çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve  $K_M$  değeri de azalır.

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun özel bir türü olan lineer karışık tip inhibisyon, dönüşümlü inhibisyon çeşitleri arasındadır. Bu tür inhibisyonda E, S ve I'nın bağlama denge sabitleri farklılaşmaktadır. En basit şekline ait reaksiyon şeması aşağıda verilmiştir (Gilbert 1992).



Birçok multi enzim sistemi net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitelerine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde; sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler adı verilir. Bu olaya da feed-back inhibisyonu denir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde

inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir. Homotropik allosterik enzimlerde substrat bizzat pozitif modülatör olarak etki yaparken, heterotropik allosterik enzimlerde enzim substrattan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. Bazı allosterik enzimler homotropik-heterotropik karakterde olup, modülatörden birisi o enzimin substratı, diğeri başka bileşiklerdir.

İnhibisyon çeşidinin ve  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için en çok başvurulan yöntem, Lineweaver-Burk eğrileridir. Bu yöntemde  $1/V$ 'ye karşı  $1/[S]$  grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilir. Grafikteki kesim noktaları değerlendirilerek, inhibisyon çeşidi ve  $K_i$  değerleri tesbit edilir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Canlı vücudunda meydana gelen bütün biyokimyasal reaksiyonlarda enzimin katalitik aktivitesi sorumlu olduğundan biyokimyacıların ilgisi enzimler üzerinde odaklanmış, böylece pek çok araştırma ile hastalıkların oluş nedenleri, hangi sebeplerden etkilendikleri hastalıkların teşhisi ve tedavisi konusunda ilerlemeler kaydedilmiştir. Enzimler üzerindeki araştırmalar, sağlıktan endüstriyel konulara kadar uygulama alanı bulmuştur (Lehninger 1982).

Çeşitli organizmalar kendilerine has proteinlere sahip oldukları gibi, her hücre tipi de binlerce değişik protein ihtiva etmektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik aktivitelerini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı bir proteinin saf halde bir hücre veya bir dokudan izolasyonu güç bir iştir. Bu güçlüklerle rağmen şimdiye kadar birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Binin üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. Ayrıca hiçbir enzimatik aktivite göstermeyen yüzlerce protein çeşitli kaynaklardan yüksek saflık derecesinde izole edilmiştir. Proteinlerin üç boyutlu yapıları, sıcaklık, pH, yüzey gerilimi gibi birçok faktörden hızlı bir şekilde etkilendiği için enzimler kısa sürede aktivitelerini kaybedebilmektedirler. Bu nedenle enzim

izolasyonu deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır. Saflaştırma işlemleri genelde enzimlerin;

1. Molekül büyüklükleri,
2. Çözünürlük farklılıkları,
3. Elektriksel yükleri,
4. Adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıkları esasına göre gerçekleştirilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden biri, spesifik ligand esasına dayanan afinite kromatografisidir. Bazı proteinler afinite kromatografisiyle çok kere bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jeller kullanılabilir.

Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulur (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

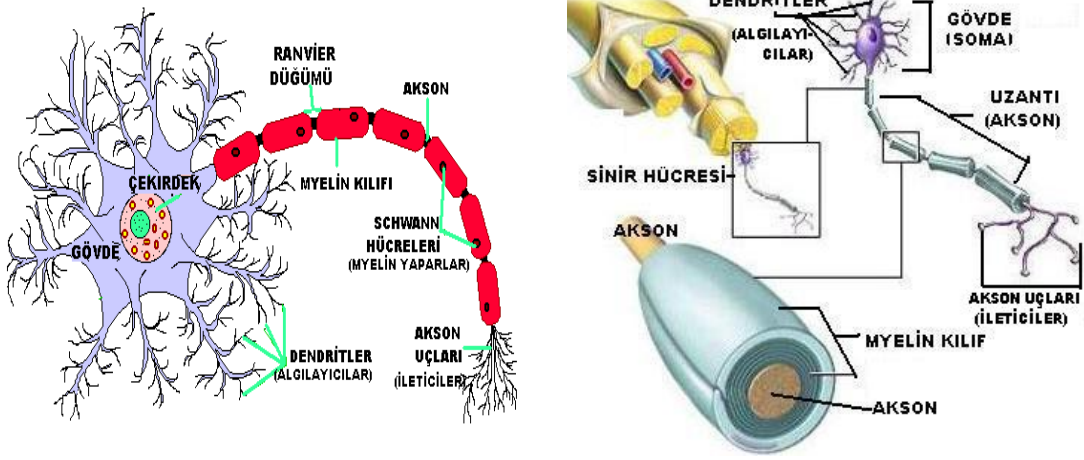
Enzim organizmada metabolik olayları hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler her biyokimyasal süreçte merkez durumundadır. Enzimler düzenli tepkime dizilerindeki aktiviteleriyle besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizler, böylece kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretilir. Metabolik yollar, düzenleyici enzimlerin aktivitesi altında yaşamını sürdürmek için gerekli birçok aktivite arasındaki

etkileşimi sağlamak için, oldukça yüksek oranda ilişkilendirilmiştir (Nelson and Cox 2005).

Enzim çalışması oldukça pratik öneme sahiptir. Bazı hastalıklarda, özellikle kalıtsal bozukluklarda bir ya da daha fazla enzim eksikliği veya tamamen yokluğu sözkonusu olabilir. Diğer bir grup hastalığa da enzimin aşırı aktivitesi neden olabilir. Enzimlerin aktivitelerinin kan plazmasında, eritrositlerde veya doku örneklerinde ölçümü belli hastalıkların tanısında önemlidir. Birçok ilaç biyolojik etkilerini enzimlerle etkileşerek ortaya çıkarır. Enzimler sadece tıpta değil aynı zamanda kimya endüstrisinde, gıda sanayinde ve ziraatte büyük öneme sahiptir.

Asetilkolinesteraz enzimi kolinerjik sinapsis ve kavşaklarda hem sinir uçlarından hem de kavşak sonrası veya postsinaptik membran üzerinde yerleştiği gözlenmiştir. Son zamanlarda asetilkolinesterazın beyinde nonkolinerjik nöronlarda da bulunduğu gösterilmiştir.

Sinir hücresi (nöron) sinir sisteminin fonksiyonel temel bir birimidir. Farklı şekil ya da büyüklükte olabilir. Sinirsel uyarıları elektriksel ve kimyasal yolla iletir. Hücre gövdesi büyüktür ve çekirdek burada yer alır. Kısa uzantıları dendrit uzun uzantıları akson olarak adlandırılan sinir sistemini oluşturan hücrelerdir. Nöron çeşitlerine göre, nöron gövdesinden çıkan uzantıların sayısı ve şekli değişiktir. Akson ve dendrit denilen uzantıları vardır. Sinir gövdesinden çıkan ve dallanma göstermeyen sitoplazmik uzantılar aksondur. Her nöronda bir tane bulunur. Gövdeden çıkan uzantı, dendritlerle alınan uyarıların gövdeden uç kısma taşınmasını sağlarlar. Dendritler, gövdeden çıkan ve bir ağacın dallarını andıran, çok sayıdaki yapılardır. Diğer nöronlardan gelen elektriksel–kimyasal uyarıları, sinaptik aralıktan sinir hücresinin gövdesine ileten bir işlemcidir. Beynin ve omuriliğin dışında yer alan sinir düğümleri olan gangliyonlar; sinir hücresinin gövde kısmını barındıran küçük kitlelerden oluşan sinir dokularıdır (Guyton and Hall 1996, Bayrak 2008).



Sinir hücresi (nöron)

**Asetilkolin (ACh)** biyolojik rolü büyük bir esterdir. Asetilkolinin güçlü farmakolojik etkisi 1906 yılından beri bilinmektedir. Bu esterın sadece sinir uçlarından etkilendiği organa veya sinir ucundan ikinci sinir hücresine implus taşıma görevi olduğuna inanılıyordu. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile bu esterın sadece bu görevi yapmadığı ayrıca sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da görevli olduğu tespit edilmiştir (Güven 2000). Asetilkolin normal kas fonksiyonları, motor aktivite, dikkat, korku, endişe ve öğrenmede integral bir rol oynar (Ferry *et al* 1999). İnsan, maymun ve farelerdeki frontal bölge lezyonları karşılaştırıldığında davranışlarında benzerlik gözlenmiştir (Cole 1983).

Omurgalılarda ve diğer hayvanlarda birbirine yakın sinir hücresi arasındaki dar aralıklardan sinirsel uyarıların atlatılarak taşınmasında rol oynadığı gibi bu uyarılar da kas hücresinin kasılmasını başlatır. Sinirsel uyarıların taşınması ve kas hücrelerinin kasılması elektrokimyasal olaylardır. Elektrikçe yüklü iyonlar sinir ve kas hücrelerini kaplayan membranlar boyunca akar ve bir sinir uyarılmasıyla uzun sinir lifleri boyunca bir iyon akışı bir sinapsa ulaşıncaya kadar devam eder. Orada sinir hücresindeki ufak baloncuklar depo edilmiş olan taşıyıcı ACh'ın serbest kalmasını sağlar. ACh sinaps boyunca difüzenir ve yakındaki sinir lif membranına bağlanır. Bu bağlanma olur olmaz hücre membranı boyunca sodyum (Na) ve potasyum (K) iyonları yer değiştirir. Böylece

ikinci bir sinir hücresinde sinirsel uyarım başlamış olur (Noyan 1996). ACh; kolinerjik nöronların gövdesinde asetilkoenzim A (CoA)'dan gelen asetil ve kolin'in kolin asetiltransferaz (ChAT) tarafından birleştirilmesi ile oluşur. Asetil CoA glikoliz ürünüdür. Kolin'in ise besinler ve hücre membranındaki fosfolipidler dışındaki en önemli kaynağı ACh hidrolizi sonucu açığa çıkan ve yeniden asetilkolin sentezinde kullanılan kolindir. ACh'in sinapstaki varlığı, ChAT ve AChE enzimlerinin etkinliğine bağlıdır. Üretilen ACh presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve bu veziküller, nörona sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaptik aralığa döker. Sinaptik aralığa salınan ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanmayan ACh molekülleri AChE tarafından yıkılır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır, AChE tarafından yıkılır ve açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nöron gönderilir.

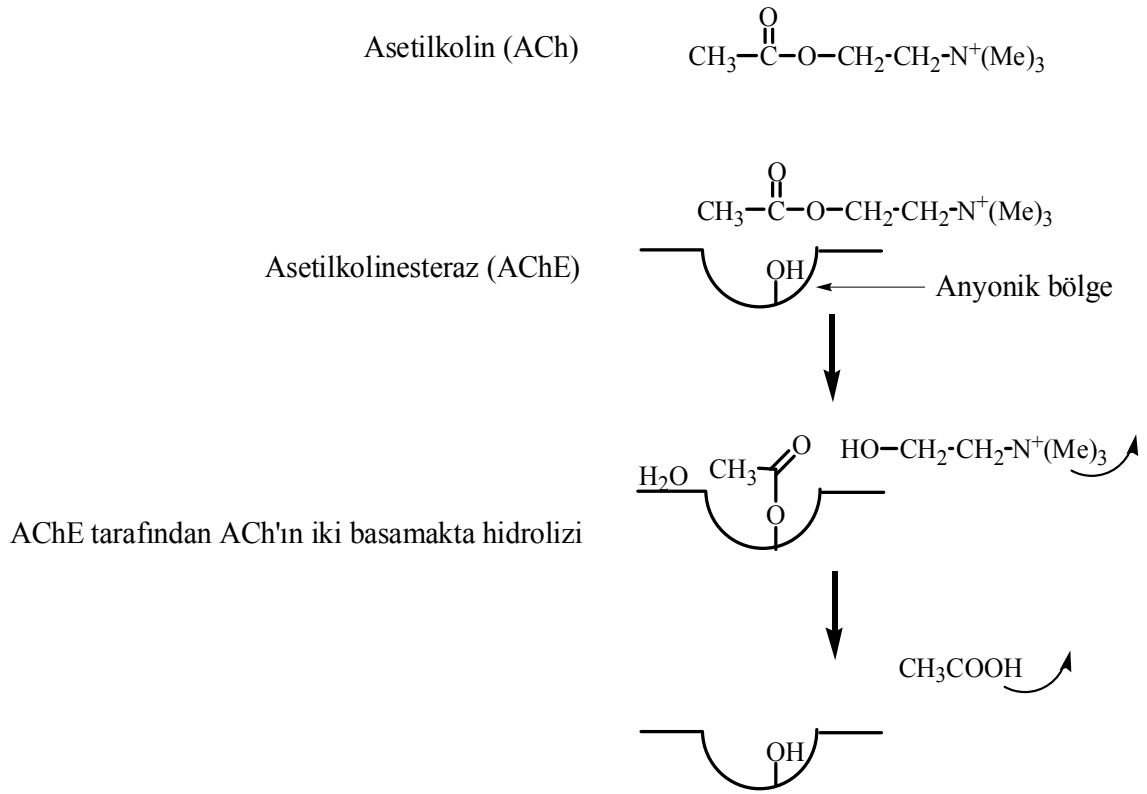
Uyarılmış bir nöron tarafından salınan asetilkolin sinaptik aralıktan veya nöromusküler bileşkedeki postsinaptik nöron veya kas hücrelerine doğru birkaç mikrometre ilerleyerek burada asetilkolin reseptörüyle etkileşir ve alıcı hücrenin elektriksel olarak uyarılmasını (depolarizasyonunu) tetikler. Asetilkolin reseptörü allosterik bir protein olup, iki alfa alt birimi üzerinde, iyon kapısından yaklaşık 3.0 nm uzaklıkta iki yüksek ilgili bağlanma yeri içermektedir. Asetilkolin bağlanması iyon kanalında kapalıdan açığa doğru bir konformasyon değişikliğine neden olmaktadır. İşlem pozitif kooperatiftir: birinci yere asetilkolin bağlanması ikinci yerin asetilkolini bağlama ilgisini artırmaktadır. Presinaptik hücreler kısa bir süre asetilkolin salgıladığı zaman, postsinaptik hücre reseptörünün her iki bölgesi de kısa süreli işgal edilir ve kanal açılır. Bu durumda  $Na^+$  veya  $Ca^{+2}$  zardan geçebilir ve bu iyonların hücre içine akışıyla plazma zarı depolarize olarak, dokunun tipine göre değişiklik gösteren daha sonraki olayları başlatır. Postsinaptik bir nörona depolarizasyon bir aksiyon potansiyelini başlatır. Nöromusküler bileşkede ise kas lifinin depolarizasyonu kas kontraksiyonunu tetikler.

Sinaptik yarıktaki asetilkolin derişimi normalde, yarıktaki bulunan asetilkolinesteraz enzimiyle hızla düşürülür. Asetilkolin düzeyleri birkaç milisaniyeden fazla yüksek

kalırsa, reseptör duyarsızlaşması ortaya çıkar. Reseptör kanalı, kapalı ve asetilkolinin çok sıkı bağlı olduğu üçüncü bir konformasyona dönüşür.

Asetilkolinin bağlanma bölgelerinden yavaş (onlarca milisaniyede) serbestleşmesi, reseptörün kapalı ve asetilkolin düzeylerine yeniden duyarlı olduğu dinlenme durumuna gelmesine olanak sağlar (Nelson and Cox 2005).

Bu durumda asetilkolinesteraz enziminin substratla etkileşmesini ve hidrolizini nasıl oluşturduğunu şöyle açıklanabilir. Enzimin aktif bölgesi iki alt bölgeden oluşmuştur. Birinci bölge anyonik bölge olan esteratik bölge hidrolizleme görevini yapar (Güven 2000).



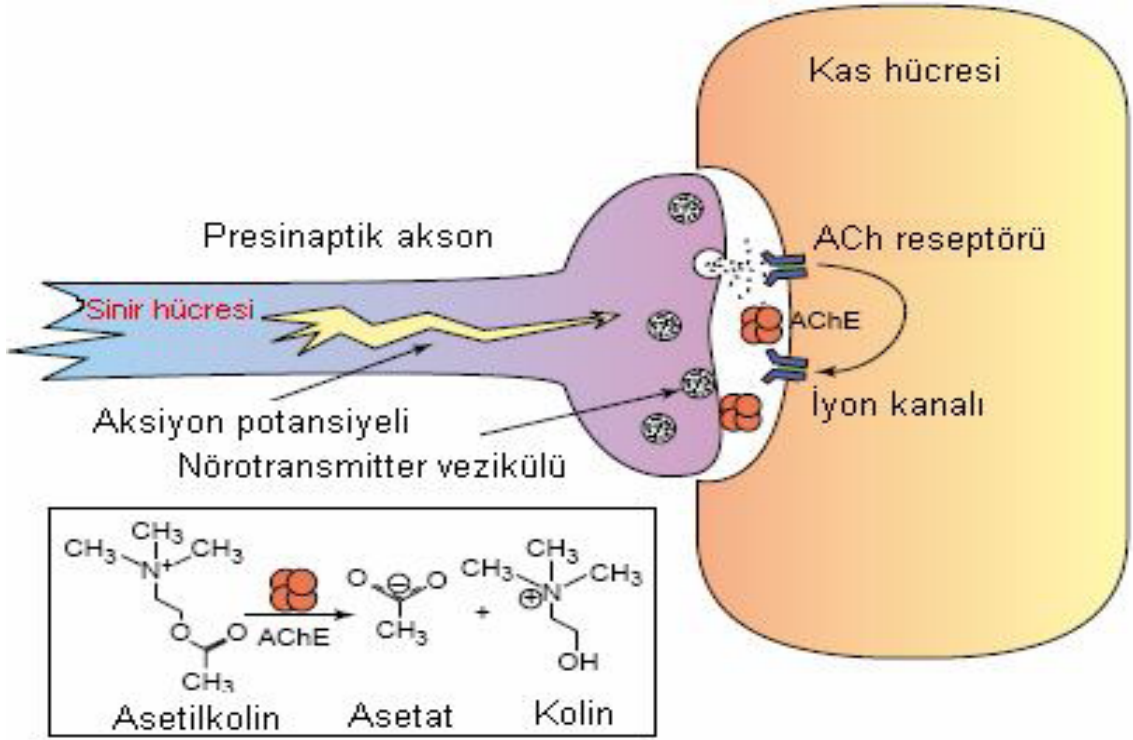
Normal kolinerjik ileti sinaptik aralıktaki asetilkolinin, kolinesteraz enzimleri tarafından hızlı katalitik hidrolizi yolu ile sonlandırılmasına bağlıdır. Bu hidroliz sonucu sinaptik aralıkta oluşan kolin tekrar presinaptik nörona alınır ve asetilkolin sentezinde kullanılır.

Asetilkolin molekülündeki kolinin besinler ve hücre membranındaki fosfolipitler dışında en önemli kaynağı bu geri alınan kolindir.

**Asetilkolinesteraz (asetilkolin hidrolaz E.C.3.1.1.7):** Kolinerjik sinapsislerde bir nörotransmitter olan asetilkolini hidrolizler. Asetilkolinesteraz aktif bölge ve katalitik mekanizma açısından başka bir enzimde bulunmayan özelliklere sahiptir. AChE'nin aktif bölgesi dar oluk yapının dip kısmıdır ve iki alt üniteden oluşmuştur. Birincisi negatif yüklü veya anyonik bölge ikincisi katalitik kısmı içeren esteratik bölge ya da katalitik triad (üçlü) (Ser203, Glu334 ve His447). Katalitik triad substratın açıl bölgesine geçici olarak bağlanır. Hidrofobik alt ünite ve açıl cebi tetrahedral geçiş durumunda alkol grubunu içerir. Oksianyon çukuru negatif karbonil oksijen vererek geçiş durumunu stabilize eder. Katalitik triad'a ilave olarak bilinen tüm asetilkolinesterazlar periferik anyonik bölge (PAS) olarak adlandırılan ikinci bir substrat bağlayıcı bölge içerir. Bu bölge hem katalitik etkinliğin düzenlenmesine (substrat inhibisyonu) hem de AChE'nin pek çok inhibitör ile etkileşimine aracılık eder. AChE'nin  $\beta$  amiloid yumak oluşumuna yol açan katalitik olmayan rolünün gerçekleşmesinde periferik anyonik bölge önemlidir. AChE'nin G1, G2 ve G4 olmak üzere üç izoformu olduğu bilinmektedir. Alzheimer hastalarının beyinlerinin belirli bölgelerinde G4 formunun kaybı nedeni ile G4/G1 oranı azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Grisaru *et al.* 1999, Talesa 2001 ).

Memelilerde; bir tanesi seçici olarak ACh'i hidroliz eden AChE, diğeri ise ACh ve diğeri kolin esterlerini hidroliz edebilen BuChE olmak üzere iki tip kolinesteraz bulunur (Şahin 2002, Thacker 2003, David et al. 2004).





Asetilkolin metabolizması

Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunmak üzere kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip enzimlerdir. Substrat özgüllüğüne, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere karşı duyarlılıklarına göre iki gruba ayrılmışlardır. AChE veya gerçek kolinesteraz (AChE: E.C.3.1.1.7, asetilkolin asetil hidrolaz) ve bütirikolinesteraz (BuChE: E.C.3.1.1.8 açilkolin açilhidrolaz), spesifik olmayan kolinesteraz veya psödokolinesteraz olarak bilinir (Neşe 2003). AChE tarafından katalizlenen tepkime enzimatik olarak iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta enzim güçlü bir nükleofil olarak rol oynar. İkinci basamakta ise; enzim özgül bir serin kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu aracılığı ile mükemmel birparçalayıcı grup işlevi görür (Demir ve Turkoglu 2005). AChE'nin temel fonksiyonu kolinerjik nörotransmisyonun sonlandırılmasıdır. Fakat asetilkolin ve diğer kolin esterlerini hidroliz eden BuChE'nin gerçek fizyolojik işlevi bilinmemektedir (David et al. 2004). Kolinesterazlar aynı zamanda hücre yenilenmesi, farklılaşması, çeşitli etkenler sonucunda oluşan strese yanıt ve amiloid oluşumunda da rol oynarlar.

Vertebralarda asetilkolinesteraz (AChE; E.C. 3.1.1.7) ya da gerçek kolinesteraz /spesifik kolinesteraz ve bütirilkolinesteraz (BChE; E.C. 3.1.1.8) ya da yalancı kolinesteraz/nonspesifik kolinesteraz olmak üzere iki tip kolinesteraz vardır. Onlar temel substrat spesifikliği ile ayrılırlar. Aynı zamanda çeşitli dokular ve inhibitörlere karşı verdikleri hassasiyetleri de farklıdır. Ayrıca asetilkolinesteraz vertebral dokularda birkaç farklı moleküler formda bulunur. Bu formlar arasında önemli bir ayrım vardır. (Massoulie and Bon 1982). Asimetrik formlar kollojen bir kuyruk üzerinden bazal laminadaki nöromusküler sinaptik aralıktaki ekstraselüler yapılarla bütünleşmiştir (Taylor *et al.* 1987). Globuler formlar ise membranın lipit tabakasının içine yerleşmiştir (Ott 1985).

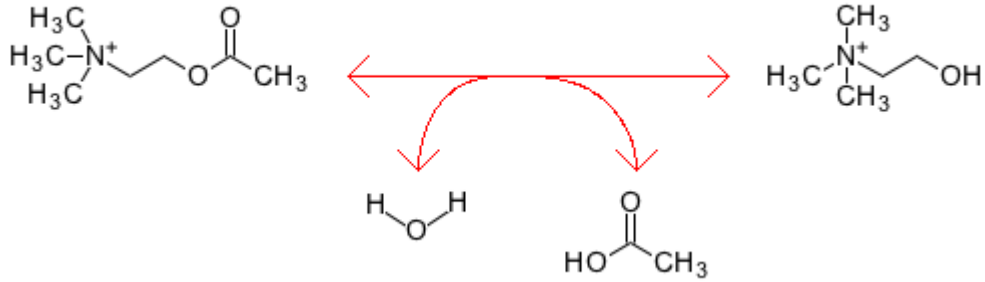
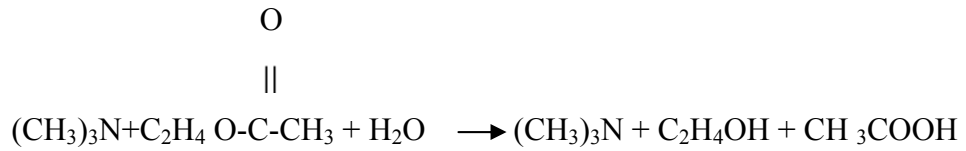
Asetilkolinesteraz membrana bağlı bir enzimdir. Beynin gri cevherinde, sinir hücrelerinde, kasta, akciğer, dalak ve eritrositlerde bulunur (Milatovic and Schetinger 2000). Aynı zamanda sarkoplazmik retikulum, lökosit, trombosit, kemik iliği ve plasentada mevcuttur (Wilson and Nachmansohn, 1954). Asetilkolinesteraz kolinerjik sinapsiste nörotransmitter asetilkolini hidroliz ederek birkaç fiziksel olayın düzenlenmesinde önemli rol oynar.

Bütirilkolinesteraz kalp, akciğer, böbrek, bağırsak ve serumda bulunur. Metabolizmanın ester bileşenlerinin oluşumunda önemli bir role sahiptir (Dave 2000). Asetilkolinesterazın inhibe olması ya da yok edildiği durumlarda bütirilkolinesteraz aynı şekilde asetilkolin seviyesini düşürür (Li *et al.* 2000; Chatonnet 2003). Farklı kromozomlarda kodlanmış olmalarına karşın asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesterazın bazı homologları %65 aynı aminoasit dizisine sahiptir (Sussman and Silman 1992, Greig *et al.* 2001).

AChE aktivitesinin olmaması dentritik çıkıntılarının oluşumunda, hücre büyüklüğü ve sayısı ile reseptör dansitesinde bazı anormalliklere yol açmaktadır (Beerli *et al.* 1997). Aynı zamanda tek başına ne AChE ne de BuChE asetilkolin metabolizmasının ve kolinerjik iletimin sağlıklı işlenmesi için yeterli değildir. Yapılan çalışmalara göre varılan

nokta hem AChE'nin hem de BuChE'nin nöral gelişim ve kolinerjik iletimde birlikte aktif rol oynadıkları şeklindedir (Xie *et al.* 2000, Mesulam *et al.* 2002).

Asetilkolinesterazın ortamda bulunması hem asetilkolin sentezi için gereken hücre içi kolinin azalmasına hem de sinaptik aralıktaki asetilkolinin etkisinin uzamasına yol açmaktadır (Şahin 2002). Oldukça spesifik olan ve yalnızca asetilkolini hidrolizleyen ester dış çevre ile lifin iç kısmı arasında konsantrasyon farklılıklarının meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu olayın sonunda ester asetilkolinesteraz enzimi tarafından hidroliz edilerek inaktif hale getirilir. Hidroliz sonunda iki tane inaktif kısım meydana gelir. Bunlar kolin ve asetik asittir (Akman 2007).



Nöromüsküler aşırı uyarı sonucu AChE inhibe olabilir. Bu da spazmlara veya ölümlere yol açar. Çünkü kalp kasındaki ciddi aritmi, kası boğar. AChE inhibitörleri sinir gazı olarak askeri alanda uzun zaman kullanılmıştır. Önde gelenleri tabun ve sarindir (Gilson *et al.* 1994).

Asetilkolin merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi için önemli bir nörotransmitterdir. İnsan beyninin multiple alanlarında mevcut olan kolinerjik sinirlerin

birleşimidir (Perry *et al.* 1999). Nörodejenaratif hastalıklar bağlamında ön beyindeki kolinerjik çekirdeğin tüm kortikal alanlarına yayıldığı tahmin edilmektedir. Asetilkolin (ACh) düşünce ile ilgili sensörlerin üretilmesi ve seçici dikkati düzenlerler (Mesulam *et al.* 2004; Sarter *et al.* 2005). Diğer önemli bir etkisi kolinerjik sistem özellikle talamus ile beyin çekirdeğine bağlı anterodorsal ve pedunculopatinedir. Retiküler çekirdek dikkat ve bilinci kontrol eder. Bu sistemin bozulması belli klinik motor fonksiyonların bozulması Parkinson semptomları ile ilişkilendirilebilir (Perry *et al.* 1999). Ön beyindeki kolinerjik nöronların kaybı duyu dejenerasyonu Alzheimer hastalarının önemli olayları ve düşünme yeteneklerini yaygın bir şekilde tutar. Alzheimer hastalarında kolinerjik düşünme yapısı ciddi bir şekilde bozulmuştur. Bu en sık görülen ve önemli dejeneratif beyin hastalığıdır ve giderek artan büyük sosyal etkiye sahiptir. Hastalığı karakterize eden entelektüel kötüleşmenin bazı yönleri, bu hastalığı yaşlanma süreci ile ilişkilendirmektedir. Beyin boyutu ve ağırlığında bir miktar azalma yani atrofi ilerleyen yaşın kaçınılmaz bir sonucudur ancak yalnız başına bu değişiklikler görece olarak çok az klinik öneme sahiptir ve yapısal temeli belirsizdir. Alzheimer hastalığı erişkin yaşamın ileri döneminde tanımlanmış olsa da hastaların büyük çoğunluğu atılmışların da ya da daha yaşlıdır; görece olarak daha küçük sayıda hasta genç ellilerinde ya da daha gençtir. Neredeyse en sık görülen mental rahatsızlıktır (Ropper and Brown 2006).

Asetilkolin iskelet kası liflerindeki asetilkolin reseptörlerine bağlanarak lifin kasılmasına neden olur. Asetilkolinin öğrenme ve hafıza ile derin ilişkisi bulunur ve bu yüzden beyinde asetilkolin içeren nöronlar mevcuttur (Akman 2007). Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların asetilkolin eksikliği ile derin bir bağlantısı olduğu için asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden bazı ilaçlar bu hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır.

Bir nöromüsküler hastalık olan myestenia gravis de ise vücut asetilkolin reseptörlerine karşı antikor üreterek düzgün bir asetilkolin sinyal transferini önler. Bu bozukluğun tedavisinde ise asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlar kullanılmaktadır (Kent 2000).

Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlara kolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesterazlar denilmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri asetilkolinesterazın yıkımını inhibe ederek santral ve periferik kolinerjik fonksiyonu güçlendirmektedir. Bu inhibitörler, enzimi tersinir veya tersinir olmayan şekilde inhibe ederek asetilkolin hidrolizini engeller ve reseptörler üzerinden artmış bir etkinin ortaya çıkmasına neden olurlar (Ercan 2002).

Asetilkolinesteraz inhibitörleri Myastenia Gravis, glukom ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Alzheimer hastalığı tedavisi için ilk olarak takrin ve daha sonra donezepil, rivastigmin ve galantamin kullanıma girmiştir. Takrin ve rivastigmin, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesterazın her ikisini de inhibe ederken, donezepil ve galantamin spesifik olarak asetilkolinesterazı inhibe etmektedir (Porcelli *et al.* 1999, Alaşehirli 2005).

Tetraalkilamonyum iyonları, kuarterner amonyum alkolleri, sarin ve soman gibi sinir gazlarını da içine alan organofosfatlar, malation ve diazinon gibi böcek öldürücüler, huperzin A gibi maddelerde asetilkolinesteraz inhibitörleri arasında yer almaktadır.

Yapılan bir çalışmada asetilkolinesteraz inhibitörü olarak 6-metoksi -takrin ve N-eptyl-Takrin gibi takrin türevleri de sentezlenmiştir (Porcelli *et al.* 1999). Yine yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere fizostigmin türevi olan phenserine'nin inhibisyon çalışması yapılmıştır (Al-Jafari *et al.* 1998 ). Başka bir çalışmada da insan eritrosit asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine prokain, tetrakain, lidokain gibi lokal anestezik ilaçlar ile antidepresan ve anti-parkinson bir ilaç olan imipraminin etkileri incelenmiştir.

### **1.1. Afinite kromatografisi**

Afinite kromatografisi, ayırma teknolojisinde eşsiz bir yer tutar; çünkü bu yöntem hemen hemen bütün biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonları veya özel kimyasal yapıları esasına dayanarak saflaşmasını mümkün kılar. Bu teknik diğer kromatografi

tekniklerden daha sonra geliştirilmesine rağmen, uygulama sahası çok hızlı gelişmiştir. Bugün bu teknik biyokimyasal çalışmalarla ilgilenen hemen hemen her laboratuvarında kullanılmaktadır.

Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün,"matriks" adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Saflaştırma çoğu zaman bir kaç bin kat olur ve aktif materyalin geri kazanılması genelde çok yüksektir. Diğer tekniklerle çok basamaklı işlemler gerektiren, çok zaman alan hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyaller, bu teknikle bir tek basamakta gerçekleştirilir. Afinite kromatografisinin konsantre etkisi de vardır; bundan dolayı büyük hacimlerle de çalışmak mümkündür. Ayırımların yüksek seçicilikleri, birbirini etkileyen moleküllerin tabii spesifitesinden kaynaklanır. Bu sebepten dolayı afinite kromatografisi şu amaçla kullanılabilir:

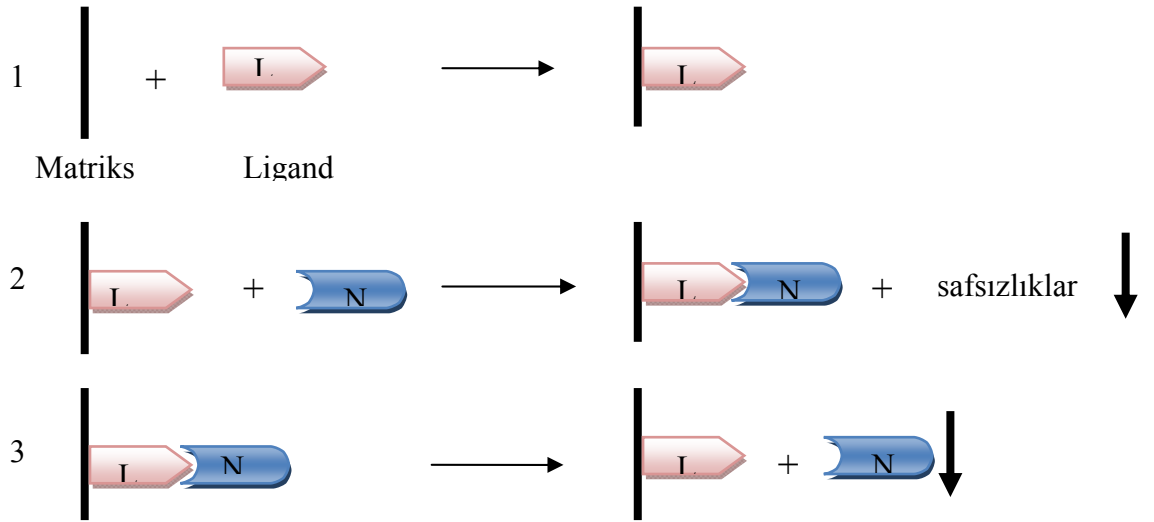
- a) Kompleks biyolojik karışımlardan maddeleri saflaştırmak için,
- b) Bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden tabii şekillerini ayırmak için.
- c) Kirlenmiş büyük miktarlardan küçük miktardaki biyolojik materyalleri ayırmak için.

Afinite kromatografisi ilk defa 1910 yılında amilazın, çözünmeyen nişastaya adsorbsiyonu sonucu izolasyonunda kullanılmıştır. Fakat kovalent olarak ligandların bağlanabileceği dayanıklı kolon materyallerinin bulunmayışı bu tekniğin uygulanmasını geciktirmiştir. Bununla birlikte 1967'de Axen. Porath Erback primer amino grubu ihtiva eden moleküllerin, siyanojen bromürle aktive edilmiş polisakkarit matrikslerine bağlanabileceğini kaydetmişlerdir. Bu da afinite kromatografisinin rutin bir ayırma tekniği olarak başlangıcını teşkil etmiştir. Siyanojen bromür aktivasyonu da, bugün ligandları bağlamak için kullanılan en genel bir yöntem olmuştur. Pharmacia Fine Chemicals, 1972 yılında siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sepharose jelini geliştirdi; böylece immobilize edilecek ligandlar için dayanıklı ve hazır bir ortam elde edilmiş oldu. Çok yakın zamanda farklı fonksiyonel gruplar vasıtasıyla matrikslere immobilize

edilen bir seri ligand elde edildi; böylece birçok biyolojik madde ve hücreleri güvenilir şekilde ayırabilecek spesifik adsorbanlar hazır hale getirildi.

### Afinite kromatografisinin genel prensibi:

Afinite kromatografisinin genel prensibi Şekil. 1.1'de özetlenmiştir.



**Şekil 1.1.** Afinite kromatografisinin genel prensibi 1'de ligand matrikse kovalent bağlanır, 2'de saflaştırılacak numune kolona adsorbe olup. Safsızlıklar akar ve 3'de numune elde edilir.

Başarılı bir ayırım, biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir ligand gerektirir. Bununla birlikte şu iki husus çok önemlidir;

- İmmobilize edilen ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olması.
- Safsızlıklar aktıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir yöntem bulunması önemlidir.

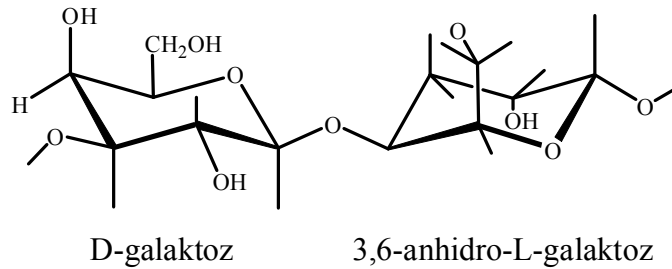
Afinite kromatografisinin en sık kullanıldığı biyolojik sistemler çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.

Safılaştırılacak madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörü hücre
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, histon, nükleik asit Polimeraz, bağlayıcı protein
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

### Matriks

Afinité kromatografisinde matriks olarak; Sephadex, Sepharose ve Bio-gel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. Bunlar içinde en çok kullanılan Sepharose, inci şeklinde dizilmiş bir agaroz jelidir. Bu jel, biyolojik aktif moleküllerin immobilizasyonu işleminde başarılı bir matriks için gerekli olan bütün özelliklere sahiptir.



Agarozun yapısı.

Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent bağlanması için kolayca derivatize edilebilir. Bunlardan Sepharose-4B en iyisidir ve en çok kullanılanıdır. Jel filitasyon kromatografisindeki dışarılama limiti, (molekül ağırlığı olarak)  $20 \times 10^6$  olan Sepharose-4B'nin açık porlu yapısı, iç tarafını ligand bağlanmasına müsait hale getirir ve büyük moleküller için bile, iyi bir bağlanma kapasitesi temin eder. Söz konusu jel, oldukça yüksek spesifik adsorbsiyon gösterir; bunun böyle olması,



afinite kromatografisinin gücünün spesifik etkileşmelere bağlı olmasından dolayı zaruridir. Sepharose jeli küresel ve rijit bir yapıya sahiptir, üzerinde yapılan işlemlerden sonra jel'in bu yapısı değişmez.

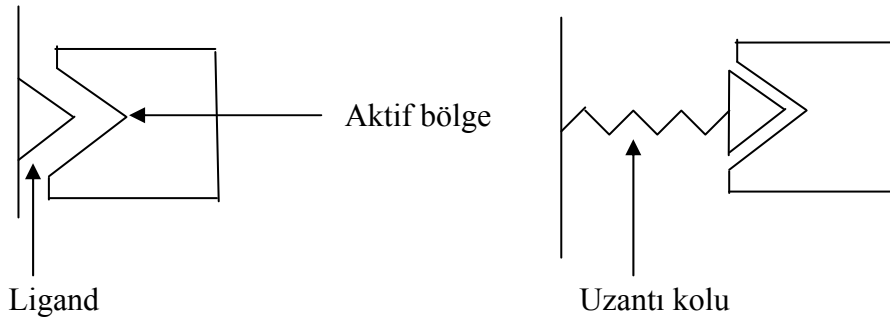
Sepharose üzerinde hazırlanan adsorbanlar: Yüksek ve düşük pH, deterjanlar, disosiye edici maddeler gibi çok değişik şartlara dayanıklıdır. Fakat organik çözücülerin, yüksek sıcaklıkların, guanidin hidroklorür, gibi parçalayıcı elüentlerin gerektiği durumlarda, kovalent şekilde çapraz bağlanmış Sepharose olan. Sepharose-CL en ideal ortamdır. Mesela; Protein A-Sepharose-CL-4B ve Blue Sepharose-CL-6B adsorbanları Sepharose-CL üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose-CL'in destek maddesi olduğu adsorbanlar az miktarda substitüe olmuşlardır ve Sepharose-4B'ye bağlı adsorbanlardan daha az kapasiteleri vardır; çünkü çapraz bağlama, ligandın bağlanabileceği bölge sayısını azaltır.

## **Ligand**

Afinite kromatografisi için ligand seçimi iki faktör tarafından etkilenir. Birincisi. ligand saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir. İkincisi, ligandın bağlama afinitesini tahrip etmeden matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır. Ligandın maddeyi bağlama afinitesinin serbest çözültide  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  M arasında olması idealdir.  $10^{-4}$  M'dan daha büyük ayrışma sabitlerini içine alan etkileşmeler (mesela bir enzim ve zayıf bir inhibitörü arasındaki ilişki gibi), başarılı afinite kromatografisi için uygun değildir.  $10^{-8}$  M'dan daha küçük ayrışma sabitlerine sahip olan maddelerden (mesela bir hormon ve reseptörü arasındaki ilişki gibi)"den meydana gelen afinite kromatografisinde ise, bağlı maddenin inaktive etmeden elüsyonu zor olacaktır. Eğer bağlanma kompleksinin dayanıklılığı hususunda herhangi bir bilgi bulunamıyorsa deneme yanılma yöntemi kullanılmalıdır. Ligandın matrikse bağlandığı bölgenin seçimi de önemlidir. Ligand çeşitli fonksiyonel gruplara sahipse saflaştırılacak molekülle en az ihtimalle spesifik etkileşme verecek grup vasıtasıyla matrikse bağlanmalıdır.

## Uzantı Kolu

Biyolojik bir maddenin aktif bölgesi genellikle molekülün derinliklerine yerleşmiştir. Küçük ligandları (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Şekil.1.2).



**Şekil 1.2.** Uzantı kolunun afinite koromatografisindeki rolü

Uzantı kolunun uzunluğu da önemlidir. Şayet çok kısa ise, kol etkisiz olur ve ligand numunedeki maddeyi bağlayamaz. Aksine çok uzunsa, spesifik olmayan etkiler fazla olur ve ayırmanın seçiciliği azalır. O'Carra ve arkadaşları, çok uzun uzantı kollarının numunedeki maddelere hidrofobik etkileşmelerle bağlandığını göstermiştir. Spesifik olmayan hidrofobik etkileşmeler, afinite kromatografisinde arzu edilmez.

## Ligandı Bağlayacak Jelin Seçimi

Ligandı bağlayacak jelin uygun şekilde seçimi için; Ligand molekülünde bulunan bağlanma gruplarının tipi, Saflaştırılacak madde ile bağlanma reaksiyonunun tabiatına dikkat edilir.

Ligandın matrikse kovalent bağlanması, normal bağlanma reaksiyonunu minimum engellemek amacıyla, molekülün en az etkili bölgesine yapılmalıdır. Mesela, amino grupları ihtiva eden bir enzim inhibitörü, matrikse amino grupları vasıtasıyla bağlanabilir; bu suretle inhibitörün enzimle spesifik bağlanma afinitesi korunmuş olur. Bununla birlikte amino grupları da bağlanma reaksiyonuna girerlerse, bu durumda zaruri olmayan başka bir grupla bağlamak gerekecektir. Ligandlardaki bağlanma bölgelerinin yeri hakkında önceden bilgi bulunmadığı durumlarda, deneme-yanılma yöntemi kullanılmalıdır.

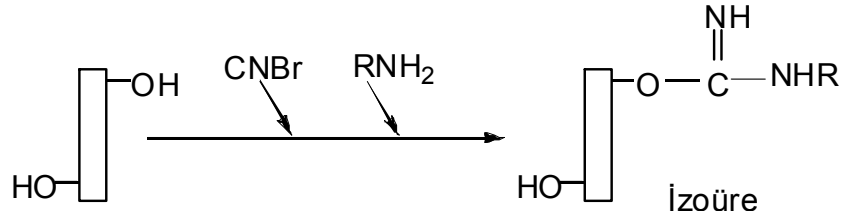
Ligandı immobilize etmek için çoğunlukla kullanılan gruplar Çizelge 1.2'de verilmiştir. Bu grupların her biri tarafından ligandların bağlanabileceği jeller de karşılarında gösterilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlanabildikleri jeller.

<b>Ligand</b>	<b>Fonksiyonel grup</b>	<b>Bağlanacak jel</b>
Aktifleştirilmiş tiyol-Sepharose-4B Aktifleştirilmiş tiyol-Sepharose-4B	Amino	CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B CH-Sepharose-4B Aktifleştirilmiş CH-Sepharose-4B Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose-6B
	Karboksil	AH-Sepharose-4B
	Tiyol	Tiyopropil-Sepharose-6B Aktifleştirilmiş tiyol-Sepharose-4B Epoksi-aktif. Sepharose-6B
Şeker	Hidroksil	Epoksi-aktif. Sepharose-6B
	Amino	CH-Sepharose-4B Aktif. CH- Sepharose-4B Epoksi-aktif Sepharose-6B
Polinükleotit	Karboksil	AH-Sepharose-4B
	Amino	CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose- 4B
koenzim, kofaktör, antibiyotik, steroid vs.	amino, karboksil,tiyol veya hidroksil	Tiyopropil Sepharose-6B Uzantı kollu jel kullanılarak

### Siyanojen bromür aktivasyonu

Sepharose-4B ile siyanojen bromür'ün reaksiyonu, proteinler, nükleik asitler veya diğer biyopolimerlerin, ılımlı şartlarda amino grupları veya benzer nükleofilik grupları vasıtasıyla bağlanabileceği bir ürünü netice verir. CNBr, Sepharose üzerindeki hidroksil grupları ile reaksiyona girer. Aktifleşmiş gruplar, ligandın primer amino gruplarıyla reaksiyona girerek izoüre oluştururlar (Şekil.1.3).



**Şekil 1.3.** CNBr ile aktifleştirilmiş matrikse primer amino grubunun katılması.

Çok noktali bağlanma, proteinlerin ve diğer biyopolimerlerin matriksten hidroliz olmamasını sağlar. Aktivasyon işlemi, Sepharose'u çapraz bağlar ve böylece kimyasal dayanıklılık artar. Bu da elüsyon şartlarının seçiminde daha fazla bir esneklik sağlar.

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B protein ve nükleik asit gibi ligandların bağlanmasında kullanılır. Mesela, insan hemoglobini CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye bağlanmıştır ve bu adsorban. antihemoglobin antikorlarını fraksiyonlamak için kullanılmıştır. Bu işlem, azalan pH ve artan asetik asit konsantrasyonu ihtiva eden bir elüent kullanmak suretiyle başarılmıştır. Aynı zamanda CNBr ile aktifleştirilen Sepharose-4B, spesifik antikorları saflaştırmak için adsorban hazırlamada kullanılır; bu antikorlar, daha sonra immunassay'de kullanılmak için işaretlenirler (radyoaktif madde ile). CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B kullanılarak hazırlanan ve transferrin veya anti-transferrin ihtiva eden adsorbanlar, iki yıl süreyle aktivite kaybı olmaksızın tekrar tekrar kullanılmışlardır. CNBr yöntemi kullanılarak

DNA'da, Sepharose-4B'ye bağlanmıştır ve DNA-Sepharose, hem nükleik asitlerin, hem de DNA'yı bağlayan enzimlerin saflaştırılmasında kullanılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

1921 yılında *invivo* hücrelerde kan akımının artışıyla kırmızı hücrelerde yoğunluk artışı ilk kez gözlenmiştir. Bu prensiple Sabine (1955) basit bir santrifügasyonla kırmızı hücreleri ayırabilmiştir. Genç ve yaşlı hücreler olarak iki sınıf göstermiştir. AChE aktivitesinin ikinci grupta daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı metodla Kadlubowski ve Agutter (1977) kırmızı hücreleri 8 gruba ayırmış ve AChE aktivitesinin hücrenin yaşı ile azaldığı sonucuna varmıştır. Farklı yaşlı gruplarında hücrenin kararlılığının zayıflaması yaşa bağlı değişimlerin sadece niteliksel bir değerlendirme içermesi bu yaklaşımın dezavantajıdır. Şimdiki çalışmalarda immünelektroforez ile birleştirilen kısımlara ayrılmış bir freol/Triosal süreksiz fraksiyonu ile hücrelerle ilgili daha fazla değerlendirme elde etmek mümkündür (Galbraith and Watts,1980). Kırmızı hücredeki enzimin protein miktarının oranı ve spesifik aktivite kadar total aktivitenin yüzdesini de hesaplamak mümkündür.



İlk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo mormoreta*) elektrik organında ekstraksiyon yoluyla saflaştırılan bu enzim diğer esterazlardan asetilkolini hidrolize etmesi özelliğinden dolayı kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Düşük konsantrasyonda

substrat enziminin aktif bölgesindeki proteinin çok az bir miktarı ile reaksiyona girer (Akman 2007).

Asetilkolinesteraz enzimi insan eritrositlerinden, balık karaciğer ve beyninden yine balık üzerinde yapılan çalışmalarda balığın plazma ve eritrositlerden, kobra yılanı zehrinden bildircin beyninden izole edilmiştir. Literatürde belirtildiği gibi Main ve arkadaşları (1974) tarafından yapılan çalışmada at serumundan saflaştırılma oranı 4160 kat, başka bir çalışmada insan eritrosit asetilkoliesterazının saflaştırılmasında bu oran 4818 kat bulunmuştur (Rosenberry and Scoggin 1984). Chhajani *et al* (1989) tarafından bir başka çalışmada insan eritrositinden asetilkolinesteraz enzimin saflaştırılması sonucu saflaştırma oranı 113000 kat olarak, Ralston *et al* (1985) tarafından yapılan çalışmada da cenin durumundaki sığır serumundan saflaştırılan asetilkolinesteraz enziminin saflaştırma oranı 44000 kat olarak, yapılan bir başka çalışmada Waxmoth (*Galleria mellonella L.*) beyninden saflaştırılan asetilkolinesteraz enziminin saflaştırma oranı 283 kat olarak bulunmuştur (Akman 2007). Daha önce yapılan çalışmalarda inhibitör olarak N-metilacridinium (Dudai *et al.* 1972; Sekar *et al.* 1980) edrophonium (Chan *et al.* 1973; Hodgson *et al.* 1983) ve procainamid (Ralston *et al.* 1983; De la Hoz *et al* 1986) kullanılan ligand afinite kromotografisi ile saflaştırılmıştır. Corroll ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise takrin afinite kromotografisi ile asetilkolinesteraz enzimi yılan balığından %92 sığır eritrositlerinden %59 ve elektrik balığından %27-60 verimle saflaştırma işlemi yapılmıştır. Takrin afinite jelinin diğer kullanılan jellere üstünlüğü ise; sentezinin daha kolay olması, daha ucuz olması ve çeşitli biyolojik materyallerden AChE nin spesifik olarak saflaştırılmasında seçiciliği tespit edilmiştir (Corrol *et al* 1995).

Lesser grain borer'dan afinite kromotografisi ile AChE saflaştırılırken zhu ve blindley tarafından tanımlanan afinite ligandı 3 karboksi fenil, ethyl dimetil amonyum afinite ligandı olarak hazırlanırken bazı modifikasyonlarda yapılmıştır. Enzim %54 verimle 771 kat saflaştırılmıştır (Zhu *et al* 1998). Kato ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada insan eritrosit AChE'dan 5 tryptic peptidden elde edilen aminoasit seguencenin insan plazma kolinesterazı ile homolog olmadığı gözlenmiştir. Üstelik bu



segünceler diğer memelilerle karşılaştırıldığında fetal sığır serum AChE'in aminoasit següncenin insan AChE enzimi ile %90'nın üzerinde ve insan plazma kolinesterazı ile %50 homolog göstermiştir (Chapman et al 1990). Gazula Valeswara Rao yapmış olduğu AChE'in yapısal çalışmalarında farklı bağlanma bölgeleri olduğuna işaret eder anyonik subsrat bağlanma bölgesi selektif aromatik katyon bağlanma bölgesi periferel anyonik bağlanma bölgesi ve esteratik bölge olmak üzere esteratik bölgenin içinde serin ve histinin imidazol ve hidroksil zinciri üzerinden ACh molekülünün esteratik ve anyonik bölge katalitik merkezi etkileştiğini bulmuşlardır (Susman *et al* ., 1991). AChE ile ACh elektrostatik etkileşiminde pH önemli bir rol oynar. AChE aktivitesi için belirli bir pH aralığı belirlenmiştir. Bu aralık pH:5'ten pH:9'a kadardır. Bu aralık inhibisyonu şöyle etkiler pH:5 ile pH:6 arası inhibisyon %20 ile %40 nötral ve alkali pH'larda ise inhibisyon %40 ile %60 olarak belirlenmiştir (Cole *et al*). AChE'in inhibisyonu aktif bölgedeki serinin fosforilasyonu üzerinden gerçekleşir. İnhibisyonda sarin ve soman gibi çoğu kimyasal savaş ajanları kullanılmıştır. Aynı zamanda AChE inhibitörleri myestenia graves ve glukoma gibi hastalıkların tedavisinde terapatik ajan olarak da kullanılmıştır. Son yıllarda 6 metoksi acrine ve N eptylacrine gibi takrin türevlerinden sentez yapılmış fakat en iyi inhibisyon takrinde gözlenmiştir. N eptylacrine yapısındaki eptyl grubunun sterik engelinden dolayı aminoacridine halka sisteminde bozulmaya sebep olmuştur.

### **Çalışmanın Amacı**

AChE enzimi afinite kromatografisi ile ilgili literatürde çok detaylı saflaştırma prosedürü yoktur. Enzimin Sepharose 4B matriksi kullanılarak afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması ile ilgili hiçbir bilgiye rastlanmamıştır. Bu amaçla ilk defa AChE enzimi mevcut metotlara göre farklı bir afinite jeli hazırlanıp saflaştırılması yeni bir yöntem olarak literatüre katkı sağlayacağı çalışmamızı önemli kılmaktadır.

Bu tez kapsamında enzime ait daha önce bilinen inhibitörlerinden ligand olarak kullanılabileceklerimiz için ön çalışmalar yapıldı. Afinite jeli hazırlandı ve AChE saflaştırılması gerçekleştirildi.

- 1) AChE enziminin takrin inhibitöründen faydalanılarak sepharose 4B matriksi kullanılarak afinite jeli hazırlandı.
- 2) Hazırlanan jel kullanılarak eritrositlerden AChE enzimi saflaştırıldı.
- 3) Afinite ile saflaştırılan AChE enzimi için optimum pH, optimum sıcaklık,  $K_m$  ve  $V_{max}$  gibi kinetik parametreler tespit edildi
- 4) Kullanılan afinite kolonunun bağlanma kapasitesi sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi parametreleri hesaplandı
- 5) Takrin inhibitörü için  $K_i$  ve  $I_{50}$  değerleri belirlendi.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

#### 3.2. Kullanılacak Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda standart serum albumin, sodyumfosfat, sodyum hidroksit,%0.9'luk sodyum klorür, triton X-100, EDTA, Tris-HCl, DTNB, Asetiltiyokolin iyodat, triklor asetik asit (TCA), hidroklorik asit, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250, coomassie brillant blue R-250, sodyum dodesilsülfat (SDS),destile su, PER, Tris-HCl, TEMED, Glisin, Bromtimol mavisi, Asetik asit, metanol, izopropanol, taze kan kullanıldı.

#### 3.3. Yararlanılacak Alet ve Cihazlar

Masa santrifüjü	: MSE Mistral 2000
Soğutmalı santrifüj	: Heraeus Sepatech (Suprafuge 22)
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: CHEBİOS s.r.l. (Optimum-one/UV-VIS)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whırlı-mixer
Hassas terazi	: Gecavery (UK)
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chiltern Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)

Liyofilizatör	: Snijders
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu	: Sanyo medical freezer (-20°C'ye kadar)
Derin dondurucu	: Sanyo Ultra Low (-85°C'ye kadar)

### 3.4. Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılacak çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

1. 1M Tris-HCl 5mM EDTA pH=8 (enzimin aktivite tayini için kullanıldı): 30.27gram Tris, 0.37g EDTA 200ml destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8'e kadar titre edildi ve daha sonra toplam hacim destile suyla 250 ml'ye tamamlandı
2. 10 mM 50 ml asetil tiyokolin iyodat (enzimin aktivite tayini için kullanıldı): 0,145g asetil tiyokolin iyodat tartılarak destile su ile 50 mililitreye tamamlandı.
3. %1 sodyum- sitrat, 0.5mM DTNB(enzimin aktivite tayini için kullanıldı):0.5 g sodyum sitrat ve 0.01 gram DTNB tartılarak destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.
4. %0.9 NaCl çözeltisi (taze kandan ayrılan eritrositleri yıkamak için kullanıldı): 0.9 g NaCl tartılarak destile su ile 100ml'ye tamamlandı.
5. 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=7,4 (Hemolizat hazırlama aşamasında elde edilen çökeleğin alınacağı tampon): 26,8 g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 950 ml destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1L'ye tamamlandı.
6. %1'lik Triton X-100 (Enzimi membranlardan sökmek için kullanılan çözelti): 50 µl Triton X-100 alınarak 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=7,4 tamponu ile 5 mL'ye tamamlandı.
7. 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH=10 (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B' ye tirozin takılırken yıkamada kullanıldı): 2,1 g (0,025 mol) NaHCO<sub>3</sub> 200 ml destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=10 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 250 mililitreye tamamlandı.

**8.** 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> (pH=8,8) ( tirozin takılı jelin aynı tamponun içine alınmasında kullanıldı): 0,84 g ( $1.10^{-2}$  mol) NaHCO<sub>3</sub> 80 ml destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=8,8 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

**9.** 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH: 7,4) (takrin kenetlendirilmesinde Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonunun yıkanmasında kullanıldı): 1,211 g Tris 150 ml destile su içerisinde çözümlenerek, 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 200 litreye tamamlandı.

**10.** 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=7,4 (Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin dengelenmesinde ve yıkanmasında kullanılan tampon) : 26,8 g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O, 950 ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.

**11.** 200 mM NaCl içeren 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=7,4 (Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin elüsyonunda kullanılacak tampon): 11,7 g (0,2 mol) NaCl ve 2,68 g (0,01 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 950 ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.

**12.** Coomassie brilliant blue G-250, reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.

**13.** SDS-PAGE Elektroforezi için kullanılan çözeltiler:

**i)** 1 M Tris-HCl tamponu pH=8,8: 12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 ml saf suda çözüldü, 1 N HCl ile pH=8,8'e ayarlandı ve son olarak toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**ii)** 1 M Tris-HCl tamponu pH=6,8: 12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 ml saf suda çözüldü, 1 N HCl ile pH=6,8'e ayarlandı, toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**iii)** Numune tamponu: 0,65 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 3 mL %10'lık SDS ve 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 0,950 mL numune tamponunda 50 µl olacak şekilde (3-merkaptolanol) ilave edildi.

- iv) Yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin, 50 ml saf suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 ml % 10'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.
- v) Renklendirme çözeltisi: 0,66 g Coomassie Brilliant Blue R-250'nin 120 ml metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 24 ml saf asetik asit ile 120 ml destile suyun ilavesiyle hazırlandı.
- vi) Renksizleştirme çözeltisi: %7,5 asetik asit % 5 metanol ve % 87,5 destile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

### **3.5. Yöntemler**

#### **3.5.1. Protein tayini**

##### **3.5.1.a. Kalitatif Protein Tayini**

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbanans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metod yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbanansları spektrofotometre'de köre karşı okundu.

##### **3.5.1.b. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini**

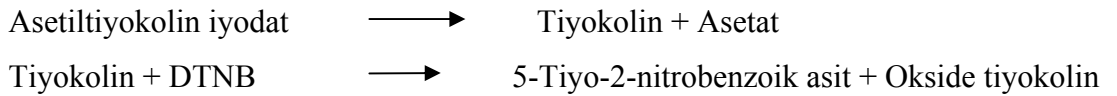
Bu metodla hemolizat, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerinde protein tayini yapıldı. Bu yöntem, proteine Coomessie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbanans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu yöntem takip edildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltilisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vortex ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılacak ve absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

### 3.5.2. İnsan Eritrosit AChE Enziminin Aktivitesinin Ellman Metoduyla Tayini

Kolinesteraz aktivite tayini, güçlü antikolinesteraz aktivitesi taşıyan insektisitlerle oluşan akut ve kronik zehirlenme olaylarında tedaviye yön verilmesi bakımından klinik yönden önemlidir. Serum ve eritrosit kolinesteraz aktivite değerleri çeşitli patolojik durumlarda anlamlı bir klinik veri olarak kabul edilmektedir.

Asetilkolinesteraz asetilkolinin tiyokoline hidrolizini katalizler. Tiyokolinin oluşum oranı, 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin oluşumundan kaynaklanan bir sarı rengi üreten 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile tiyokolinin reaksiyonunun takibi ile Sarı renkli anyonun oluşum oranı 412 nm'de ölçüldü. (Ellman *et al.* 1961).



Aktivite ölçümünde kullanılan deney prosedürü aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

	Kör(μl)	Sistem (μl)
1M Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH: 8.0	100	100
%1 lik Sodyum sitrat içinde 0,5 mM DTNB	50	50
1:10 su da seyreltilmiş 1:20 hemolizat	10	10
H <sub>2</sub> O	840	790
Karışım 37°C 'de 10 dk inkübe edildi. 10 mM Asetiltiyokolin iyodat		50

Sistemin optik yoğunluğundaki artış 412 nm'de 10 ila 15 dk için köre karşı ölçüldü. (Ellman *et al.* 1961).

Aktivite ölçümleri sonucunda Aşağıdaki formül kullanılarak enzim ünitesi hesaplanmıştır (Asetil tiyokolin iyodat için molar Absorbivite kat sayısı 13,6)

$$EU = \frac{\Delta OD}{13.6} \times \frac{VC}{VE} \times f$$

EU = ml başına enzim ünitesi

ΔOD = 412 nm'de optik dansitenin dk. başına değişimi

VC = Küvet hacmi

VE = Küvetteki saf enzim çözeltisi hacmi

f = Seyreltme faktörü

13.6 = 412 nm'de ve 37°C de 3 mM asetiltiyokolin iyodat'ın indirgenmesi sonucu okunan OD, sabit değeridir (Porcelli *et al* 1999).

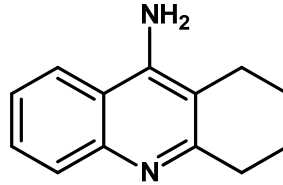


### 3.5.3. İnsan Eritrosit AChE Enziminin Saflaştırılması

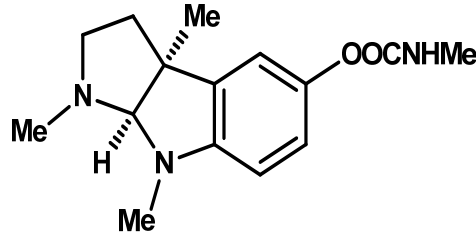
#### 3.5.3.a. AChE inhibitörleri ve ligand seçimi

Asetilkolinesteraz enzimi üzerine yapılan inhibisyon kinetiği çalışmalarında literatürde enzimin inhibitörleri tespit edildi. Literatürde bulunan inhibitörlerden faydalanarak asetilkolinesteraz'ın afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından en uygun diazonyum tuzu oluşturabilecek ligandlar seçilerek afinite jellerinin hazırlanması yapıldı asetilkolinesteraz'ın bilinen inhibitörleri aşağıda verilmiştir.

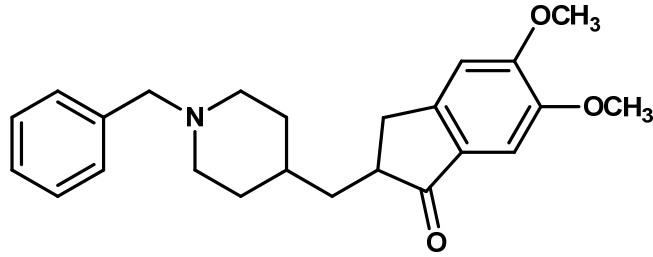
**Takrin:** Takrin, 1960'larda süksinilkolinin oluşturduğu çizgili kas felcini uzatmak için kullanılmış olan bir ilaçtır (Ercan 2002). Parasempatomimetik ve asetilkolinesteraz ve butirilkolinesterazın tersinir, yarışmalı inhibitörüdür. Alzheimer hastalığının tedavisinde önemi oldukça büyüktür (Eroğlu 2003).



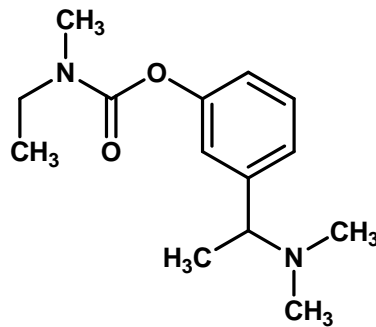
**Fizostigmin:** Fizostigmin yüz yıldır antikolinergik toksisiteyi tedavi etmede kullanılan bir antidottur. Fizostigmin ilk kolinesteraz inhibitörüdür, glokomda kullanılan ilk etkili ilaçtır ve daha sonra miyastenia gravist tedavisinde de kullanılmıştır (Liebelt 2007). Alkaloid olup salisilat ve sülfat tuzları kullanılır. Lipofilik olması nedeniyle, santral sinir sistemine (SSS) girebilen bir ilaçtır. Santral sinir sistemi ve periferik sinir sistemindeki kolinerjik sinapslarda asetilkolinesteraz enzimini tersinir olarak bloke ederek kolinerjik transmisyonu artırır (Ercan 2007).



**Donepezil:** Alzheimer hastalığında bilişsel bozuklukların düzeltilmesi amacıyla yönelik olarak geliştirilen son kuşak AChE inhibitörlerinden biri donepezildir. Piperidin grubundan ikinci kuşak reversibl AChE inhibitörüdür ve serebral AChE üzerinde nispeten spesifik bir inhibisyona yol açar (Efendi and İseri 2003) .

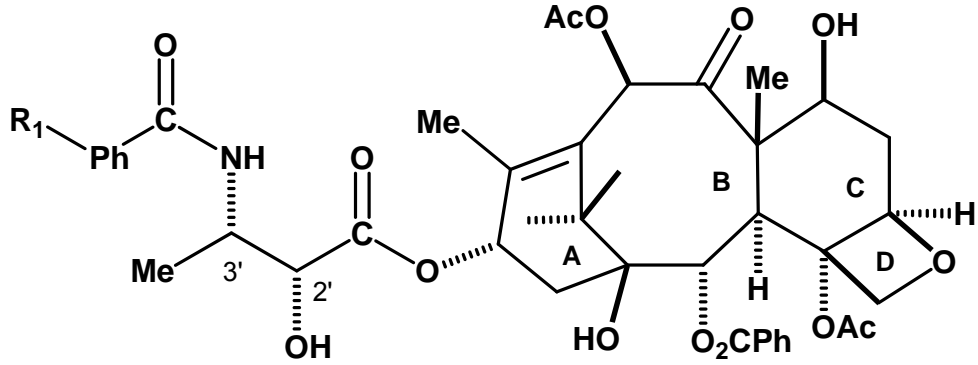


**Rivastigmin:** Korteks ve hipokampusdaki kolinesterazı seçici olarak inhibe eden, kolinesteraz enziminin esterazik bölgesine bağlanan ancak çok yavaş ayrılan bu nedenle de psödo-reversibl inhibisyon yapan bir ilaç olarak tanımlanmıştır (Efendi and İseri 2003).



**Eptastigmin:** Uzun etkili bir fisostigmin türevidir. Fisostigminin indol halkasındaki karbamoyl-metil grubunun karbamoyl heptil grubu ile değiştirilmesiyle elde edilmiştir. İn vitro olarak belirgin olarak kandaki düzeyine bağlı olarak kırmızı kan hücrelerinde

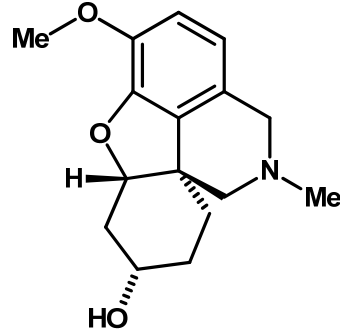
hakim, kolinesteraz inhibisyonu yapar. İn vivo olarak ise doza bağımlı inhibisyonu söz konusudur ve bu etki invitrodakinin tersine beyinde gerçekleşir. Etki süresi gerek fisostigmin, gereksede Takrin'den uzundur (Saraçoğlu 1998).



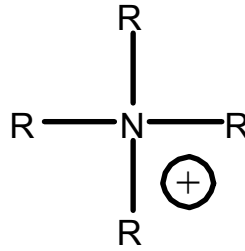
**Metrifonat:** Organizmada non-enzimatik bir yol ile etken metaboliti olan diklorvos'a dönüşerek etkinlik kazanır. Dolayısıyla metrifonat bir pro-drug'dır. Diklorvos güçlü antikolinesteraz aktiviteye sahiptir ve enzimi geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Metrifonatin diğer enzim inhibitörü ilaçlardan farkı kendisinin intrinsik antikolinesteraz etkisinin olmayışdır. Enzimatik olmayan yollardan asıl aktif bileşik olan 2,2 dimetil diklorovinil fosfata dönüşür. Bu metabolitin kendisi inhibitör işlevi görür.

Enzim inhibisyonu uzun sürelidir ve yeni enzim sentezine koştur olarak yavaş düzelmeye görülür. Hayvan deneylerinde Metrifonatin Takrine oranla daha uzun süreli inhibisyon gerçekleştirmesi daha az yan etki olasılığının olması, asetilkolin salınımında azalma yapmaması ve asetilkolinin kan konsantrasyonunda daha fazla sabitlik sağlaması gibi nedenlerle Alzheimer hastalığında klinik kullanıma sokulmuştur (Saraçoğlu 1998).

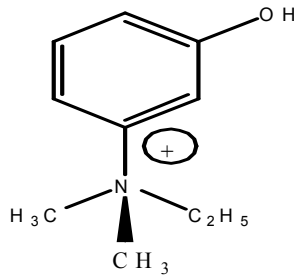
**Galantamine:** Çok yeni olarak tanımlanmış köken olarak kardelen soğanından elde edilmiş tersiyer bir alkaloid olan seçici, yarışmalı ve geri dönüşümlü bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Reseptörün allosterik bölgesine bağlanarak asetilkolinin nikotinik reseptörler üzerindeki intrinsik etkisini artırır (Yalgın 2001).



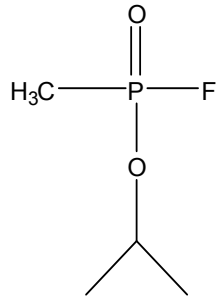
**Tetraalkilamonyum iyonları:** Anyonik kısma bağlanır ve asetilkolinin hidrolizini önler. Tersinir bir inhibisyon meydana getirir.



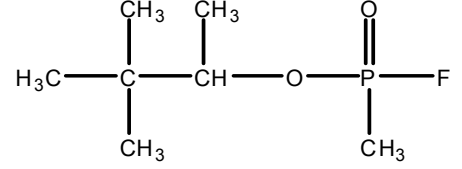
**Kuarterner amonyum alkoller:** Asetilkolinesterazın non-kovalent tersinir bir inhibitörüdür.



**Organofosfatlar:** Asetilkolinesteraza kovalent olarak bağlanır. Tersinir olmayan uzun bir etkiye sahiptir.



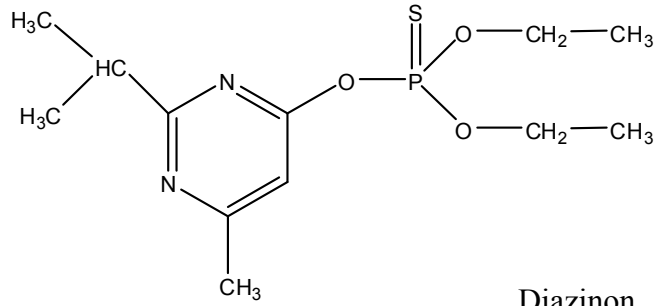
Sarin



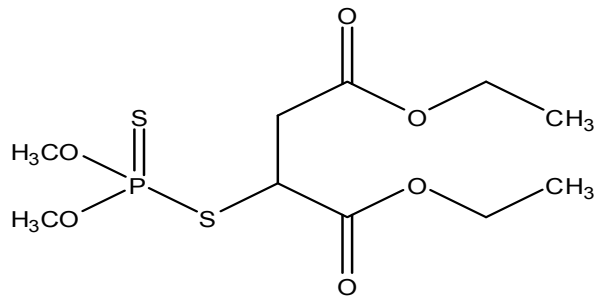
Soman

### sinir gazları

**Böcek öldürücüler:** Tersinir olmayan bir yolla asetilkolinesterazı inhibe ederler. Memelilerde çok hızlı bir etki gösterirler.

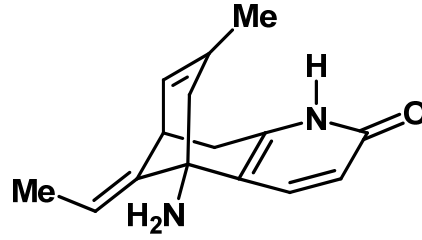


Diazinon



Malation

**Huperzin A:** Doğal olarak bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür.



Bilinen bu inhibitörlerden molekül yapıları tirozin uzantı kolu ile diazonyum tuzu oluşturabilecek takrin olduğu tespit edildi. Zaten tarin Corroll ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise takrin asetilkolinesteraz enzimini yılan balığından, sığır eritrositi ve elektrik balığından saflaştırma işleminde yararlanılmıştır. Bizde çalışmamızda öncelikle takrin inhibitörünü afinite kolonunun ligandı olarak kullanmayı ve asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmayı hedefledik.

### 3.5.3.b. Kan Temini ve Hemolizat Hazırlanması

İnsan kanı taze olarak temin edildi. Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak, santrifüje yerleştirilip 15 dakika 2500xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde alındı. Tüplerin altında kalan eritrosit peleti %0,9 NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı ve her defasında 2500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin 3 katı kadar buzlu hemoliz çözeltisi ile hemoliz edildi ve +4 °C'de 13.000xg'de 60 dakika santrifüj yapıldı. Çökelek kısmı (membranlar) alınarak 5 mL 0,1 M, pH: 7,4 Na-fosfat tamponu içinde süspanse edildi ve %1'lik Triton X-100 ile çözündürüldü. Santrifügasyondan sonra (4 °C de, 13.000xg'de 60 dk) üst kısımdaki süpernatant sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere damlalıklarla dikkatli bir şekilde alınıp çökelek kısmı atıldı.

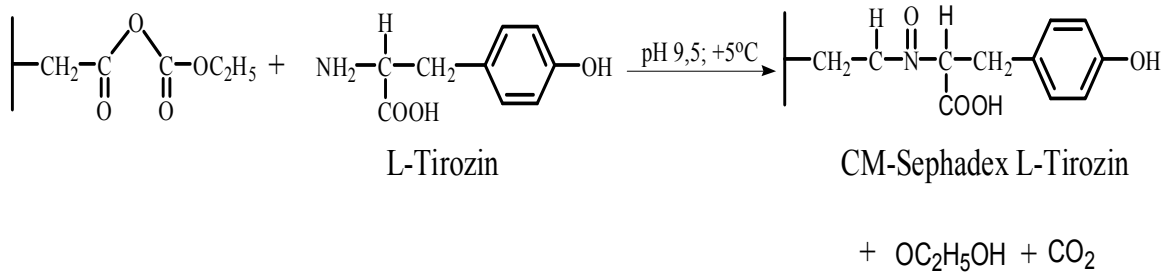
### 3.5.3.c. Sepharose-4B-L-tirozin Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matrisi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra takrine tirozin kenetlendi.

Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, takrin ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Takrine, AChE spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Arslan *et al.* 1996). Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

#### a.CNBr İle Aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye Tirozin Takılması:

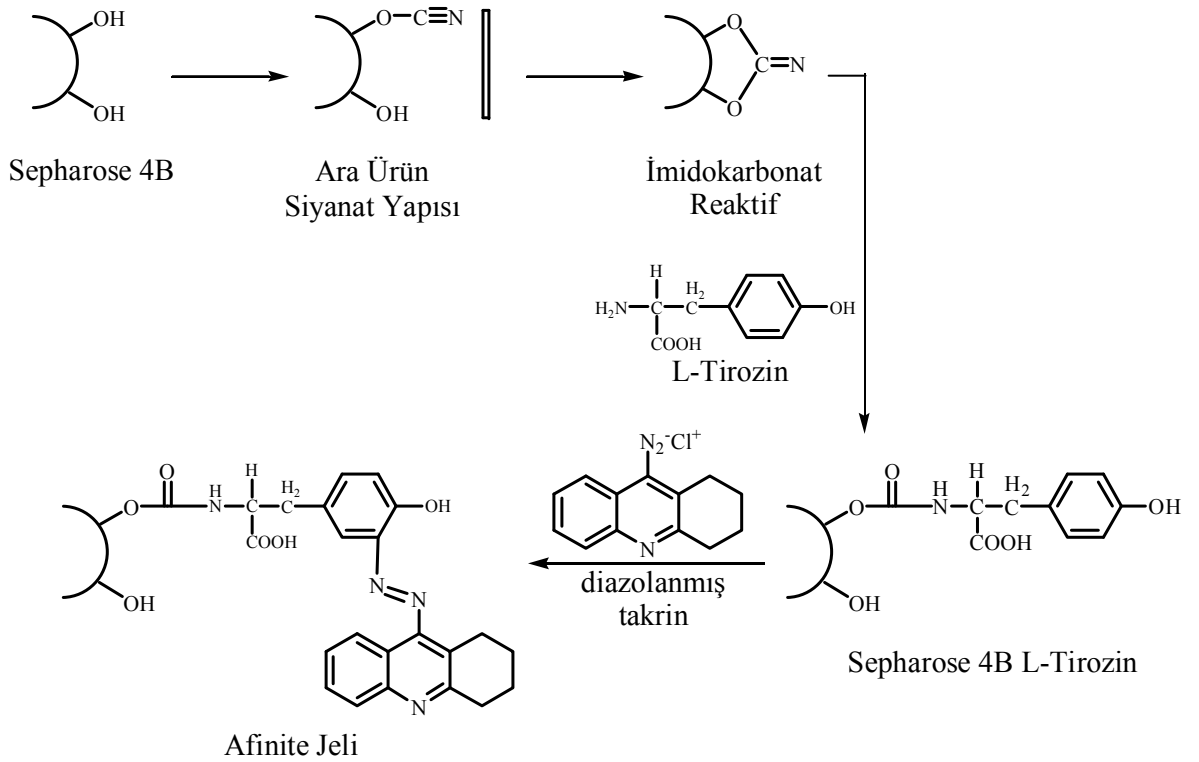
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bağıtle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4 °C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4 °C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 ml 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı.(Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

### 3.5.3.d. Takrin Kenetlendirilmesi:

25 mg takrin, 0 °C civarında 10 ml, 1M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO<sub>2</sub> bulunan 0 °C'deki 5 ml çözelti, takrin çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan takrin 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1M NaOH ile pH: 9,5'a çıkarılarak sabit tutulacak ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1L saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Söyüt 2006). Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Takrin Kenetlendirilmesi



### **3.5.3.e. Afinite Kolonunun Paketlenmesi**

Hazırlanan jel dengeleme tamponu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH=7,4) içine alınarak jel süspanse edilerek ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorpsiyonlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

### **3.5.3.f. Afinite Kolonuna Numune Tatbiki ve Elüsyonu**

Hazırlanan homojenat kolona tatbik edildi ve kolon 0.1 M Na-fosfat (pH:7,4) çözeltisi ile yıkandı. Böylece AChE enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 0.2 mM NaCl/10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH:7,4) tamponu tatbik edilerek AChE enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorpsiyonlarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı.

### **3.5.3.g. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü**

Asetilkolinesteraz enzimi saflaştırıldıktan sonra %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak saflaştırılan enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konulup ve kısıkaçlarla tutturulup jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

**Ayırma jeli şöyle hazırlandı:** 15 ml 1 M Tris-HCl (pH= 8,8), 13,2 ml % 30' luk akrilamid - %0,8'lik bisakrilamid, 0,61 ml %10 luk SDS, 0,4 ml %5'lik TEMED (N,N,N'.N'-tetrametil etilendiamin ve 9,4 ml destile su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5'lik amonyum persülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

**Yığma jeli şöyle hazırlandı:** 1 M'lik Tris-HCl (pH=6,8)'den 1,24 ml, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 ml, %10'lik SDS'den 0,1 ml, %5'lik TEMED'den 0,1 ml ve sudan 7,36 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'lik PER'den 0,20 ml ilave edildi.

Hazırlanan ayırma jeli Ayırma jeli plakalar arasına enjektörle döküldü. Hava olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar yaklaşık yarım saat bekletildi. Katılaştıktan sonra üsteki SDS döküldü. Daha sonra yığma jeli yüzeye kadar ilave edilecek ve üzerine tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra jel kuruması için bekletildi. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek, jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu konulacak 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurken, jeldeki yerine ince bir enjektörle tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan “anot” kablo üstten “katot” kablo yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere özel kabına alındı.

Jel, sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA+ %40 saf su) 15 dakika bekletildi. Daha sonra sabitleştirme çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak, renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. İki saat boyunca çalkalayıcı üzerinde karıştırıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme

çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Bundan sonra jel saf su içine alındı ve fotoğrafları çekildi. Renksizleştirme çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar kullanılabilir. Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi %0,1 Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su ile hazırlandı. Renksizleştirme çözeltisi ise %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf sudan ibarettir.

### **3.6. Afinite Kolonunun AChE Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi**

Hazırlanacak jellerin proteini tutma kapasitesi bulunurken, sıcaklık pH ve iyonik şiddet etkileri incelenmelidir. Kolonun kapasite tayin işlemi şu prosedüre göre gerçekleştirildi: Hazırlanan jelden 1 ml alınarak dengeleme tamponuyla dengelendikten sonra 1x10 cm'lik bir kolona alındı. Eritrositlerden saflaştırılan AChE enzimi ile doyuruldu ve Enzimlerin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan AChE enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi. Aynı zamanda jel kurutularak jel tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden AChE enzimini tutma kapasitesi belirlendi.

#### **3.6.1. Sıcaklığın Kolon Kapasitesine Etkisi**

pH 7,4 de asetilkolinesteraz enzimi farklı sıcaklıklarda 2,10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein /g jel) başına grafik edildi.

#### **3.6.2. pH'nın Kolon Kapasitesine Etkisi**

Asetilkolinesteraz enzimi için kolonda pH'ın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH'sı 6,6 ile 8,2 arasında) değişen tamponlar kullanılarak en uygun pH için sonuçlar (mg protein /g jel başına) grafik edildi.

### 3.6.3. İyonik Şiddetin Kolon Kapasitesine Etkisi

Asetilkolinesteraz enzimi için kolonun bağlanma kapasitelerini etkileyen iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile enzimin optimum pH'sında ve en uygun bağlanma sıcaklığında denemeler yapıldı. İyonik şiddet 0,05 ile 0,25 M arasında değiştirilerek, sonuçlar mg protein /g jel başına grafikte gösterildi.

### 3.7. İnsan Eritrosit Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmalar

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan asetilkolinesteraz enziminin kinetik özelliklerini araştırmak üzere asetiltiyokolin iyodat için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri tayin edildi. Ayrıca enzimin inhibitörü olan takrin için  $I_{50}$  ve  $K_i$  değeri grafik edildi.

#### 3.7.1. İnsan Eritrosit Asetilkolinesteraz Enzimi İçin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; asetiltiyokolin iyodat kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Bu amaçla asetiltiyokolin iyodat (10mM) substratının stok çözeltilerinden sırasıyla 8, 12, 16, 20 ve 24  $\mu$ l alınarak her bir substrat konsantrasyonu için aktivite ölçümü yapıldı.

Örneğin; 20  $\mu$ l substrat konsantrasyonunda, deney tüpünde ;

100  $\mu$ l 1M Tris-HCl, 5mM EDTA, pH 8.0 çözeltisi, 50  $\mu$ l DTNB, 10  $\mu$ l enzim, 20  $\mu$ l substrat, 820  $\mu$ l su pipetlenerek toplam hacim 1 ml'ye tamamlandı; kör olarak asetilkolin iyodat yerine su konularak diğer çözeltiler aynı oranda kullanılıp spektrofotometrede 412 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Her ölçüm 2 defa tekrarlandı.  $1/V-1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regresyon doğru denklemi kullanıldı.  $K_M$  ve

$V_{max}$  değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanarak.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri Şekil 4.8’de çizilen grafik gösterildi sonuçlar Çizelge 4.2’de verildi.

### 3.7.2. Takrin için kinetik çalışmalar

Yapılan bir çalışmada asetilkolinesteraz inhibitörü olarak 6-metoksi -takrin ve N-eptyl-Takrin gibi takrin türevleri de sentezlenmiştir (Porcelli *et al* 1999) takrin, donezepil, rivastigmin ve galantamin enzimin spesifik inhibitörü iken Tetraalkilamonyum iyonları, kuarterner amonyum alkolleri, sarin ve soman gibi sinir gazlarını da içine alan organofosfatlar, malation ve diazinon gibi böcek öldürücüler, huperzin A gibi maddelerde asetilkolinesteraz inhibitörleri arasında yer almaktadır.

Bu çalışmalarda ligand olarak kullandığımız inhibitörün  $K_i$  ve  $I_{50}$  değerleri hesaplanması üzerine ve inhibisyon tipi hakkında literatürde detaylı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Takrin inhibitörü ligand olarak kullanılmadan önce  $K_i$  ve  $I_{50}$  değerleri hesaplandı. Böylece saflaştırmada kullanılan takrin için detaylı kinetik özellikler de belirlenmiş oldu.

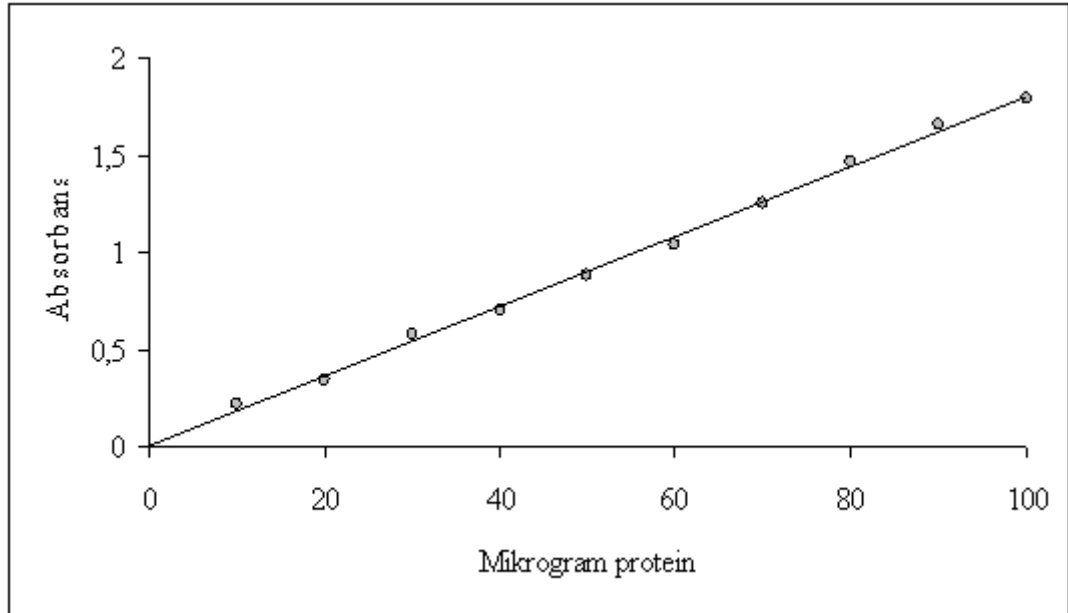
Ligand olarak kullanılan inhibitörün asetiltiyokolin iyodat substratına bağlı olarak,  $I_{50}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla: oda sıcaklığında ve optimum pH’da, doygun olmayan asetiltiyokolin iyodat (0,2 mM) konsantrasyonunda ortama farklı hacimlerde inhibitör çözeltisi ilave edilerek, % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizildi.

Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve  $K_i$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla oda sıcaklığında optimum pH’da 5 farklı asetiltiyokolin iyodat substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen bu aktivite değerleri ile Lineweaver-Burk grafiği çizilerek inhibisyon tipi ve  $K_i$  değeri bulundu.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla 3.5.1.b’de anlatıldığı gibi önce standart grafik hazırlandı. Elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.1).



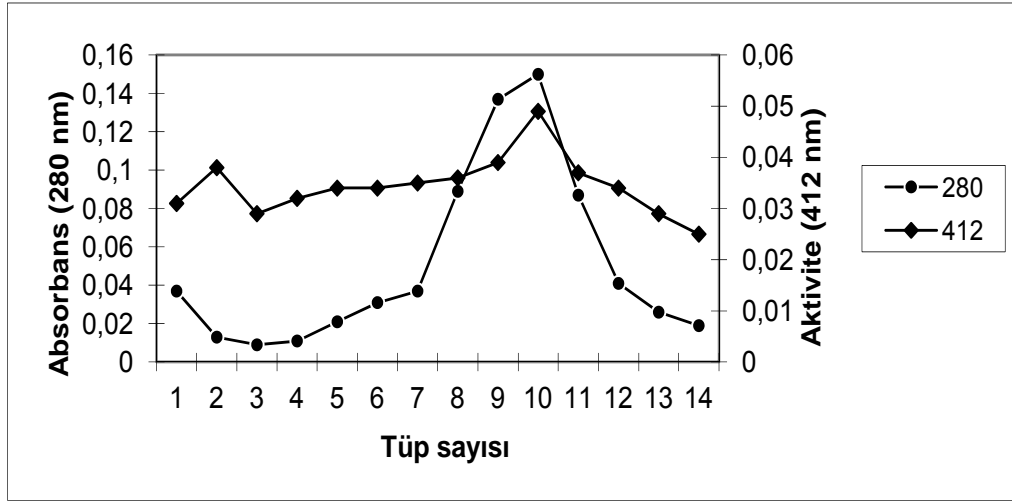
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

### 4.2. Eritrositlerden AChE Enziminin Saflaştırılması Çalışma Sonuçları

#### 4.2.1. AChE Enziminin Saflaştırma Basamakları Sonuçları

Bölüm 3.5.3.c,3.5.3.d ve 3.5.3.e’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kolona, alınan 30mL kandan ayrılan 5 mL hemolizat dengelenmiş kolona pipet vasıtasıyla tatbik edildi.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon çözeltisi ile elüsyon yapıldı. Elüatlar kolon akış hızı 60 ml/saat'e ayarlanarak fraksiyon kollektör yardımı ile 3'er ml halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm protein tayini ve 412 nm'deki aktivite değerleri ölçülerek grafikleri Şekil 4.2'de verildi.



**Şekil 4.2.** Takrin kolonundan AChE enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırma sırasında elüatlarda 280 absorbans ve 412 nm de elde edilen aktivite değerleri.

Hazırlanan afinite kolonundan elde edilen enzim için saflaştırma basamaklarını belirlendi, Bu amaçla hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltilerinde spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısı hesaplandı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterildi.

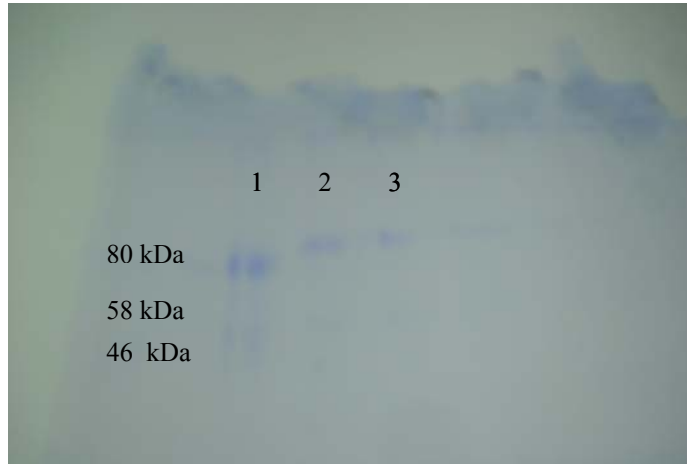
**Çizelge 4.1.** İnsan kanından AChE enziminin saflaştırma basamakları sonuçları.

	Total Hacim	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Protein Miktarı (mg)	Total Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	5	0,12	8,2	41	0,6	0,0146	100	1,00
Afinite kromatografisi	3	0,047	0,0051	0,0153	0,141	9,22	23,5	658

#### 4.2.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu insan kanından saflaştırılan asetilkolinesteraz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofrezisi yapıldı. Bunun için Bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektrofrezine saflaştırılan AChE’lar yüklendi.

AChE için standart olarak molekül ağırlığı belli olan MBP (Maltose-bağlı protein)-paramyosin (fusion ile MBP and paramyosin) (80 kDa), MBP-CBD (chitin bağlı domain) (fusion ile MBP ve chitin bağlı domain) (58 kDa), CBD-*Mxe* Intein-2CBD (fusion ile chitin bağlı dotmain ve *Mxe* Intein) (46kDa) enzimleri kullanıldı. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** SDS-PAGE fotoğrafı: Bant a; Standartlar; 1. MBP (Maltose-bağlı protein)-paramyosin (fusion ile MBP and paramyosin) (80kDa), MBP-CBD (chitin bağlı domain) (fusion ile MBP ve chitin bağlı domain) (58 kDa), 3. CBD-*Mxe* Intein-2CBD (fusion ile chitin bağlı dotmain ve *Mxe* Intein) (46kDa) Bant 2 ve 3; saflaştırılmış AChE.

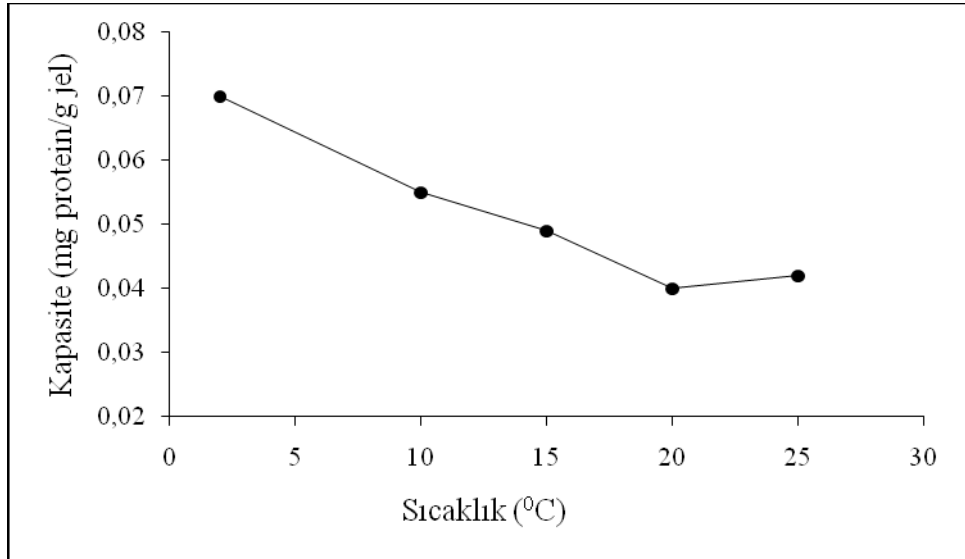


### 4.3.Afinite kolonunun asetilkolinesteraz tutma kapasitesinin belirlenmesi

Hazırlanacak jelin tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkileri incelendi. Kolonun kapasite tayin işlemi şu prosedüre göre gerçekleştirildi: Hazırlanan jelden 1 ml alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden afinite ile elde edilen Asetilkolinesteraz enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan Asetilkolinesteraz enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı belirlendi. Aynı zamanda jel kurutulularak tartıldı ve mg protein/gram-jel cinsinden Asetilkolinesteraz enzimini tutma kapasitesi belirlendi.

#### 4.3.1.Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisi

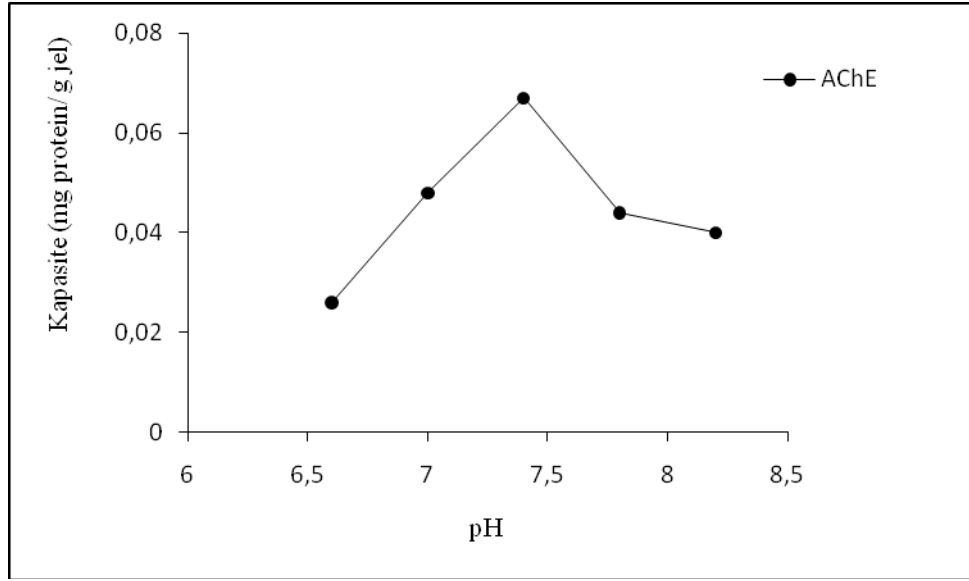
pH:7,4'de Asetilkolinesteraz farklı sıcaklıklarda 2, 10, 15, 20 ve 25°C sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein /g jel) sonuçlar Şekil 4.4'de verildi.



Şekil 4.4. Sepharose-4B-takrin jelinin farklı sıcaklıklarda enzimi tutma kapasitesi grafiği.

### 4.3.2. pH'nın Kolon Kapasitesine Etkisi

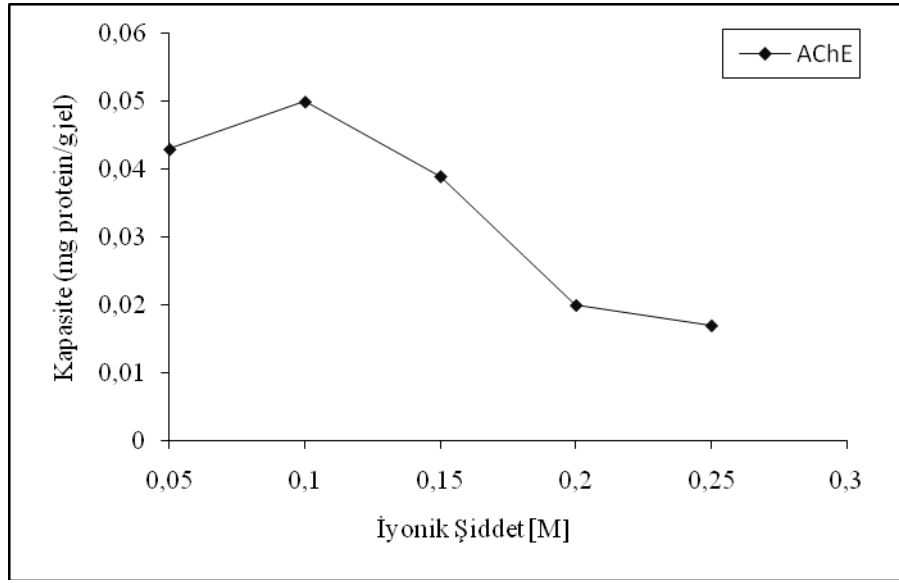
pH'nın kolon kapasitesine etkisini araştırmak amacıyla pH'sı 6,6 ile 8,2 arasında değişen tamponlar kullanılarak kolonun tutma kapasitesi belirlendi ve sonuçlar (mg protein /g jel başına ) belirlenerek Şekil 4.5'de verildi.



Şekil 4.5. Sepharose-4B-takrin jelinin farklı pH'larda enzimi tutma kapasitesi grafiği

### 4.3.3. İyonik Şiddetin Kolon Kapasitesine Etkisi

İyonik şiddetin kolonun tutma kapasitesini belirlemek amacıyla ile Asetilkolinesteraz enzimi için optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında deney yapıldı. İyonik şiddet 0,05 ile 0,25 M arasında değiştirilip, sonuçlar mg protein/g jel başına grafik Şekil 4.6'da verildi.



**Şekil 4.6.** Sepharose-4B-takrin jelinin farklı iyonik şiddetlerde enzimi tutma kapasitesi grafiği

#### 4.4. Asetilkolinesteraz enzimine üzerine kinetik çalışmalar

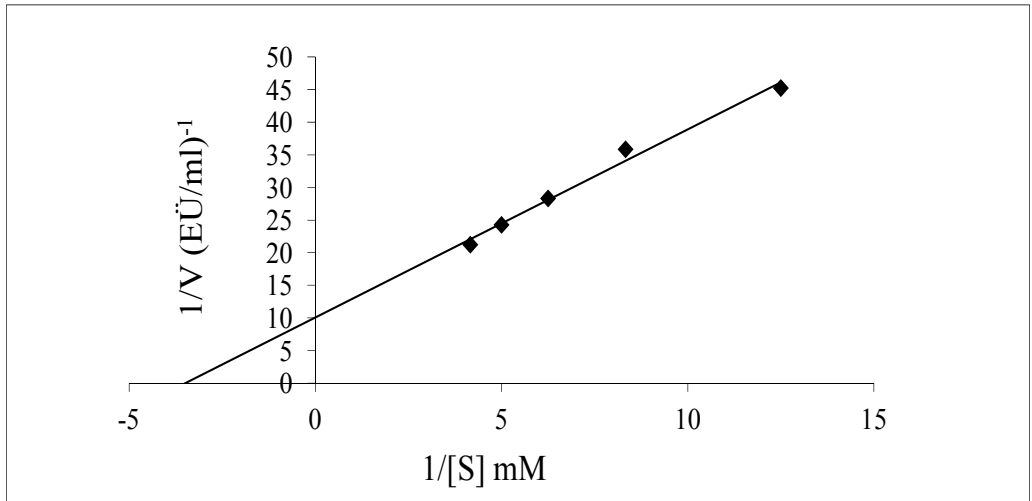
Hazırlanan afinite kromotografisi kolonundan saflaştırılan AChE enziminin kinetik özelliklerini araştırmak için asetiltiyokolin iyodat substratı kullanılarak asetiltiyokolin iyodat için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi.

##### 4.4.1. Asetiltiyokolin iyodat substratı için $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması

Optimum pH ve 20°C sıcaklıkta en az beş ayrı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen  $1/V-1/[S]$  değerleri yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Deney prosedürü Çizelge 4.2’de verildi sonuçlar Şekil 4.7’de gösterildi.

**Çizelge 4.2.** AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat subsuratıyla elde edilen  $1/V-1/[S]$  deney prosedürü

İnhibitörno	Kör Tüpü					Numune Tüpü						$1/V$ ( $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$1/S$ $\text{mM}^{-1}$
	Su(mL)	Tris-HCl Tamp (mL)	$\text{DTNB}$ (mL)	İnhibitör(mL)	Asetiltiyokolin iyodat (mL)	Asetiltiyokolin iyoda (mL)	su (mL)	Tris-HCl (mL)	İnhibitör (mL)	AChE (mL)	$\text{DTNB}$ (mL)		
[I] <sub>0</sub>	0,842	0,1	0,05	-	0,008	0,08	0,832	0,1	-	0,01	0,05	45,24	12,5
	0,838	0,1	0,05	-	0,012	0,012	0,828	0,1	-	0,01	0,05	35,84	8,33
	0,834	0,1	0,05	-	0,016	0,016	0,824	0,1	-	0,01	0,05	28,32	6,25
	0,830	0,1	0,05	-	0,020	0,020	0,820	0,1	-	0,01	0,05	24,27	5
	0,826	0,1	0,05	-	0,024	0,024	0,816	0,1	-	0,01	0,05	21,23	4,16



**Şekil 4.7.** AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat subsuratıyla elde edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği

**Çizelge 4.3.** eritrositlerden elde edilen AChE'nin Asetiltiyokolin iyodat substratı ile yapılan kinetik çalışmanın sonuçları

<b>Kinetik Çalışmalar</b>	
Optimum sıcaklık (°C)	20
Optimum pH	7,4
$K_M$ (mM)	0,372
$V_{max}$ (EÜ/mL.dk)	0,065

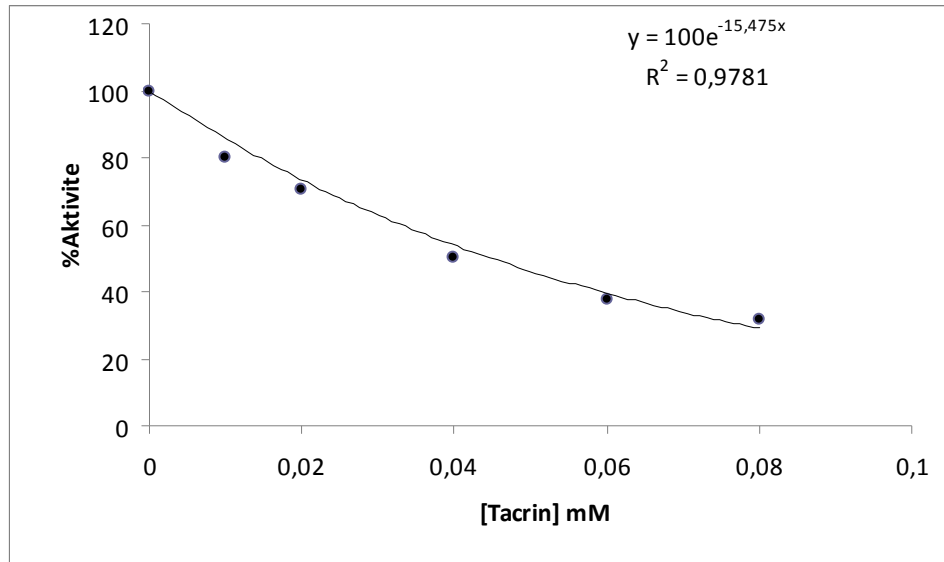
#### 4.4.2. Takrin inhibitörü $K_i$ ve $I_{50}$ değerlerinin bulunması

Bu çalışmada takrin inhibitörü saf suda çözülerek AChE enzimi üzerine Asetiltiyokolin iyodat substratı için etkileri incelendi. Asetiltiyokolin iyodat substratı doyunluğun altında alındı ve böylece reaksiyon hızı için Asetiltiyokolin iyodat'a bağlı olarak bulundu.

$I_{50}$  değerlerini tespit etmek için, sabit substrat konsantrasyonunda (Asetiltiyokolin iyodat 10 mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonlarında her bir inhibitör konsantrasyonu için aktivite değerleri hesaplandı (çalışmalarda kullanılan total takrin çözeltisi 1mM). Elde edilen bu değerler ve deney prosedürü Çizelge 4.3'de gösterildi ve % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek  $I_{50}$  değerleri bulundu. Bu grafik Şekil 4.8'de gösterildi.

**Çizelge 4.4.** Takrin inhibitörü için afinite kolonundan elde edilen AChE için, asetiltiyokolin iyodat substratıyla yapılan % Aktivite-konsantrasyon deney prosedürü.

Kör Tüpü						Numune Tüpü						% Aktivite	[I]m M
Inhibitör no	su (mL)	Tris-HCl (mL)	DTNB (mL)	inhibitör (mL)	Asetiltiyokolin iyodat (mL)	su (mL)	Tris-HCl (mL)	DTNB (mL)	inhibitör (mL)	Asetiltiyokolin iyodat (mL)	AChE (mL)		
	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
takrin	0,790	0,1	0,05	0,01	0,05	0,780	0,1	0,05	0,01	0,05	0,01	65,15	0,01
	0,780	0,1	0,05	0,02	0,05	0,770	0,1	0,05	0,02	0,05	0,01	60,61	0,02
	0,760	0,1	0,05	0,04	0,05	0,750	0,1	0,05	0,04	0,05	0,01	49,90	0,04
	0,740	0,1	0,05	0,06	0,05	0,730	0,1	0,05	0,06	0,05	0,01	37,73	0,06
	0,720	0,1	0,05	0,08	0,05	0,710	0,1	0,05	0,08	0,05	0,01	31,23	0,08



**Şekil 4.8.** AChE için asetiltiyokolin iyodat substratına bağlı olarak takrin ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Kullanılan takrin ligandı için, inhibisyon tipinin belirlenmesi ve  $K_i$  değerinin tesbit edilmesi amacıyla 5 farklı asetiltiyokolin iyodat substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit takrin konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. İnhibitörsüz asetiltiyokolin

iyodat substratıyla yapılan tüm çalışmalarda kullanılan aktivite ölçümü değerleri ve prosedürü Çizelge 4.4’de gösterildi. İnhibitörlü çalışmaların aktivite ölçüm değerleri ve deney prosedürleri ise Çizelge 4.6’da gösterildi. Aktivite değerleri bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde belirlendi. Elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri bulundu.  $K_i$  değerleri bulunmasında kompetitif inhibisyonlar için formülü

$$K^I_M = K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

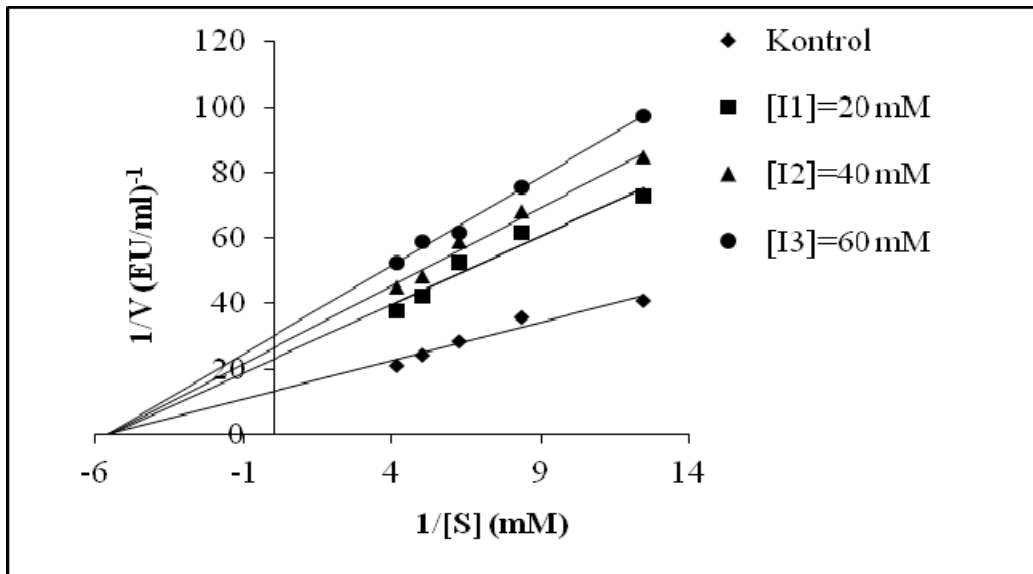
Non kompetitif inhibisyonlarda ise

$$V^I_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

formülü kullanıldı. Bu grafik Şekil 4.9’da gösterildi. Elde edilen  $K_i$  değerleri ise Çizelge 4.6’da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.5.** AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla takrin eşliğinde elde edilen  $1/V, 1/[S]$  değerleri ve deney prosedürü.

İnhibitör no	Kör Tüpü					Numune Tüpü						$1/V$ ( $\mu\text{mol}/\text{ml. min}^{-1}$ )	$1/S$ $\text{mM}^{-1}$
	Asetiltiyokolin i (mL)	Su(mL)	Tris-HCl (mL)	İnhibi-tör	$\text{DTNB}$ (mL)	Asetiltiyokolin iyodat (mL)	Su (mL)	Tris-HCl (mL)	İnhibitör (mL)	AChE	$\text{DTNB}$ (mL)		
[I] <sub>1</sub>	0,008	0,822	0,1	0,02	0,05	0,008	0,812	0,1	0,02	0,01	0,05	75,75	12,5
	0,012	0,818	0,1	0,02	0,05	0,012	0,808	0,1	0,02	0,01	0,05	61,72	8,33
	0,016	0,814	0,1	0,02	0,05	0,016	0,804	0,1	0,02	0,01	0,05	52,35	6,25
	0,020	0,810	0,1	0,02	0,05	0,020	0,800	0,1	0,02	0,01	0,05	42,55	5
	0,024	0,806	0,1	0,02	0,05	0,024	0,796	0,1	0,02	0,01	0,05	37,70	4,16
[I] <sub>2</sub>	0,008	0,802	0,1	0,04	0,05	0,008	0,792	0,1	0,04	0,01	0,05	84,75	12,5
	0,012	0,798	0,1	0,04	0,05	0,012	0,788	0,1	0,04	0,01	0,05	68,02	8,33
	0,016	0,794	0,1	0,04	0,05	0,016	0,784	0,1	0,04	0,01	0,05	58,81	6,25
	0,020	0,790	0,1	0,04	0,05	0,020	0,780	0,1	0,04	0,01	0,05	48,54	5
	0,024	0,786	0,1	0,04	0,05	0,024	0,776	0,1	0,04	0,01	0,05	45,24	4,16
[I] <sub>3</sub>	0,008	0,782	0,1	0,06	0,05	0,008	0,772	0,1	0,06	0,01	0,05	97	12,5
	0,012	0,778	0,1	0,06	0,05	0,012	0,768	0,1	0,06	0,01	0,05	75,72	8,33
	0,016	0,774	0,1	0,06	0,05	0,016	0,764	0,1	0,06	0,01	0,05	61,70	6,25
	0,020	0,770	0,1	0,06	0,05	0,020	0,760	0,1	0,06	0,01	0,05	58,81	5
	0,024	0,766	0,1	0,06	0,05	0,024	0,756	0,1	0,06	0,01	0,05	52,35	4,16



**Şekil 4.9.** AChE enzimi için asetiltiyokolin substratıyla takrin eşliğinde elde edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği.



**Çizelge 4.6.** AChE enziminin üç farklı inhibitör konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $K_i$  değerleri ve sabit substrat konsantrasyonunda 5 farklı inhibitör konsantrasyonuna karşı çizilen aktivite – [inhibitör] grafiğinden elde edilen  $I_{50}$  değerleri

İnhibitör	$I_{50}$ (mM)	[inhibitör] (mM)	$K_i$ değeri (mM)	Ortalama $K_i$ (mM)	İnhibisyon şekli
		$2,10^{-5}$	$2,8.10^{-5}$		
takrin	$4,5.10^{-5}$	$4.10^{-5}$	$3,8.10^{-5}$	$3,76.10^{-5} \pm 1.10^{-5}$	Yarışmasız
		$6.10^{-5}$	$4,6.10^{-5}$		

## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Enzim çalışması oldukça pratik öneme sahiptir. Bazı hastalıklarda, özellikle kalıtsal bozukluklarda bir ya da daha fazla enzim eksikliği veya tamamen yokluğu sözkonusu olabilir. Diğer bir grup hastalığa da enzimin aşırı aktivitesi neden olabilir. Enzimlerin aktivitelerinin kan plazmasında, eritrositlerde veya doku örneklerinde ölçümü belli hastalıkların tanısında önemlidir. Birçok ilaç, biyolojik etkilerini enzimlerle etkileşerek ortaya çıkarır. Enzimler sadece tıpta değil aynı zamanda kimya endüstrisinde, gıda sanayinde ve ziraatte büyük öneme sahiptirler.

Asetilkolinesteraz enzimi kolinerjik sinapsis ve kavşaklarda hem sinir uçlarından hem de kavşak sonrası veya postsinaptik membran üzerinde yerleştiği gözlenmiştir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, asetilkolinesterazın beyinde nonkolinerjik nöronlarda da bulunduğu gösterilmiştir.

Asetilkolinesteraz membrana bağlı bir enzimdir. Beyinin gri cevherinde, sinir hücrelerinde, kasta, akciğer, dalak ve eritrositlerde bulunur (Milatovic and Schetinger 2000). Aynı zamanda sarkoplazmik retikulum, lökosit, trombosit, kemik iliği ve plasentada mevcuttur (Wilson and Nachmansohn, 1954). Asetilkolinesteraz kolinerjik sinapsiste nörotransmitter asetilkolini hidroliz ederek birkaç fiziksel olayın düzenlenmesinde önemli rol oynar.

Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlara kolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesterazlar denilmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri asetilkolinesterazın yıkımını inhibe ederek santral ve periferik kolinerjik fonksiyonu güçlendirmektedir. II Dünya Savaşından önce sadece reversibl kolinesteraz inhibitörleri bilinirken savaş sırasında uzun süre etkili ve oldukça toksik bileşikler olan irreversibl bileşikler geliştirilmiştir. Bu inhibitörler, enzimi tersinir veya tersinir olmayan şekilde inhibe ederek asetilkolin hidrolizini engeller ve reseptörler üzerinden artmış bir etkinin ortaya çıkmasına neden olurlar (Ercan 2002).

Kolinesteraz inhibitörleri klinik olarak Myastenia Gravis, glokom, ve Alzheimer Hastalığı gibi hastalıklarda kullanılmaktadır. Alzheimer Hastalığı tedavisi için ilk olarak takrin geliştirilmiş daha sonra donepezil, rivastigmin ve galantamin kullanıma girmiştir. Aynı zamanda takrin hem asetilkolinesteraz hemde butirikolinesterazın her ikisini de inhibe etmektedir.

Alzheimer hastalığında kolinerjik kayıp olduğu bilgisi 1970'lerden itibaren tedavi için bir umut ışığı haline gelmiştir. Parkinson hastalığında dopamin eksikliğinin giderilmesi ile hastalığın belirtilerinin tedavi edilir hale gelmesi ile paralellik kurulmuş ve Alzheimer hastalarında da kolinerjik sistemin güçlendirilmesinin hastalığı tedavi edebileceğinden yola çıkılmıştır. Ancak zamanla araştırmalar göstermiştir ki Alzheimer hastalığının karmaşık yapısı sadece kolinerjik eksikliği değil, hem belirgin hücre kaybını, hem de diğer beyin kimyasallarının dengesinde kayda değer bir bozulmayı içermektedir.

Kolinesteraz inhibitörleri 1990'larda Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanıma sunulmuştur.

Bu ilaçlar içinde ilk kullanıma giren takrindir. Daha sonra Donepezil, Rivastigmine ve Galantamine kullanıma sunulmuştur. Bu ilaçların hepsi Asetilkolinin yıkımını engellerler. Asetilkolin dikkat ve bellek süreçlerinde özellikle önemli rol oynayan bir kimyasal habercidir. Yıkımının azalmasının, beyinde kullanılabilirliği artırması ve yukarıda sözü edilen zihinsel süreçleri iyileştirmesi beklenir. Yapılan klinik çalışmalarda erken ve orta evre Alzheimer hastalarında bu ilaçların zihinsel işlevlerde kısmen iyileştirici ya da zihinsel yıkımı yavaşlatıcı etkisinin görüldüğü bildirilmiştir. Ancak bu yüz güldürücü sonuçlar tüm Alzheimer hastalarının %30-40'ında görülmektedir, diğer hastalarda bir etki gözlenmemektedir.

Alzheimer hastalığı henüz nedeni tam aydınlatılmayan şekilde beyin hücrelerinin programlanandan daha erken ölmesi nedeniyle olmaktadır (yaşla beraber her kişide beyin hücre ölümü olmaktadır ama Alzheimer hastalığında bu süreç çok hızlı ve erken

olmaktadır). Hastalığın nedeni tam olarak bilinmese de bir takım risk yaratan durumlar günümüzde tanımlanmıştır. Bu faktörlerden yaş değiştirilemez faktör iken geçmişte yaşanan depresyonlar değiştirilebilir faktördendir. Damar hastalıkları (kalp krizi, hipertansiyon, kolesterol yüksekliği) geçmişte ciddi kafa yaralanmaları ve düşük eğitim düzeyi de hastalığa sebep olan faktörler arasındadır.

Bu hastalık yeni bir hastalık olmasa da hastaların sayısı giderek artmaktadır. Çünkü hastalıkla ilgili en önemli risk faktörü yaştır ve yaşlanma kaçınılmaz bir durumdur. Günümüzde tüm dünyada en hızlı artan yaş grubu 65 yaş ve üzeridir. Şu an Türkiye’de 300 bin alzheimer hastası olduğu düşünülmektedir. Genç nüfusun giderek yaşlanacağı bir ülke olarak Türkiye’de 30-40 yıl sonra bu hastalığın en önemli sağlık sorunu olacağını söylemek müneccimlik olmayacaktır.

Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlara kolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesterazlar denilmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri asetilkolinesterazın yıkımını inhibe ederek santral ve periferik kolinerjik fonksiyonu güçlendirmektedir. Bu inhibitörler, enzimi tersinir veya tersinir olmayan şekilde inhibe ederek asetilkolin hidrolizini engeller ve reseptörler üzerinden artmış bir etkinin ortaya çıkmasına neden olurlar (Ercan 2002).

Asetilkolinesteraz inhibitörleri Asetilkolini parçalayan asetilkolinesterazı inhibe ederek sinaptik aralıktaki asetilkolin miktarını ve dolayısıyla kolinerjik iletimi artırır. 6-9 ay kadar tabloyu bulunduğu noktada sabitlerler. Progresyonu yavaşlatırlar ancak tedaviye erken evrede başlanmalıdır. Etkileri üçüncü ayda belirginleşir. İlaç kesildikten 4-6 hafta sonra kaybolur.

Asetilkolinesteraz enzimi literatürde bilinen enzimin saflaştırılması üzerine birçok kromatografik metod olup mevcut yöntemler hem uzun hemde maliyeti bizim bulduğumuz yöntemle göre daha pahalıdır. Bulduğumuz yöntemle enzim çok az miktardan kısa sürede, saflaştırılmakta ve böylece inhibisyon çalışmalarına daha fazla olanak sağlamaktadır.

Afinite kromatografisi proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden biri olup spesifik ligand esasına dayanır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bugün bir çok protein afinite kromatografisiyle çok kere bir basamakta çok kompleks karışımlardan saflaştırılması başarılmıştır. Afinite kromatografisinde, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir teknik olarak bilinmektedir. Genelde dolgu maddeleri Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jellerden oluşur. Ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesine sahip olması gerekir. Matriksle ligand arasında etkileşmeler olmaması için uzantı kolları takılır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimlerin afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması çok önemlidir. Bu sebeple eritrositlerden saflaştırılan asetilkolinesteraz için sepharose 4 B–L tirozin takrin kolonu ilkez bu çalışmada hazırlandı. Bu hazırlanan kolondan saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri, SDS-PAGE elektroforezi ve kullanılan ligandların kinetik özellikleri belirlendi. Elde edilen değerleri tartışmadan önce araştırmada kullanılan yöntemlerin seçiliş sebeplerini açıklayalım

Çalışmalarımız esnasında hazırlanan afinite kolonlarından elde edilen elüatlardaki enzim muhtevası 280 nm de absorbans ölçümünde proteinlerin yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin, triptofan) söz konusu dalga boyunda UV ışınlarını absorblama esasına dayanmaktadır. AChE enzimi için aktivite ölçümü ise 412 nm de yapıldı.

Kantitatif protein tayinler Bradford metoduyla ile belirlendi. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle bulundu. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein–boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford and Williams 1976).

Protein tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi ve standart grafik hazırlandı: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltilisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı. Her bir tüpe Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden 4,9 ml ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak numune yerine 100 µl aktivite tayin tamponu ve 4,9 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri standart grafik halinde hazırlandı. Protein tayini yapılan numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

Kolinesteraz aktivite tayini, güçlü antikolinesteraz aktivitesi taşıyan insektisitlerle oluşan akut ve kronik zehirlenme olaylarında tedaviye yön verilmesi bakımından klinik yönden önemlidir. Serum ve eritrosit kolinesteraz aktivite değerleri çeşitli patolojik durumlarda anlamlı bir klinik veri olarak kabul edilmektedir. Asetilkolinesteraz enziminin aktivitesi Ellman Metoduyla yapıldı.

Asetilkolinesteraz asetilkolinin tiyokoline hidrolizini katalizler. Tiyokolinin oluşum oranı, 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin oluşumundan kaynaklanan bir sarı rengi üreten 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile tiyokolinin reaksiyonunun takibiyle ölçüldü. Sarı anyonun oluşum oranı 412 nm'de ölçüldü. (Ellman *et al.* 1961). Aktivite tayininde 1 enzim ünitesi 10mM asetiltiyokolin'in dakika başına 37 °C'de pH:8 tiyokoline ve asetat'a çeviren enzim miktarı olarak tanımlandı.

Takrinin Asetilkolinesteraz enzimini inhibe ettiği literatür de de bilinmektedir. Fakat bu inhibitörün detaylı kinetik özellikleri hakkında bir çalışmaya rastlanmadı. Takrin yapısında –sebest NH<sub>2</sub> bulundurur ve amino grubu aromatik halkada diazonyum tuzu oluşturabilir ve L-Trozin molekülüne bağlanabilir. Diazonyum tuzu oluşturularak yapılan afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı.

Daha önce karbonik anhidrazın saflaştırılmasında kullanılan jel aktifleştirme metodu ve tirozin takılması tarafından bulunmuştu, Bu amaçla biz basit modifikasyonlalar aşağıdaki şekilde takrini jele modifiye etmeyi başardık (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Yapılan yöntemde, CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4 °C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4 °C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbanı vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 ml 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı.

25 mg takrin, 0 °C civarında 10 ml, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO<sub>2</sub> bulunan 0 °C'deki 5 ml çözelti, takrin çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan takrin 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH: 9,5'a çıkarılarak sabit tutulacak ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> pH:7,4) içine alınarak jel süspanse edilerek ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

Hazırlanan afinite kolonuna numune tatbiki için hemolizat hazırlandı ve kolona tatbik edildi ve kolon 0.1 M Na-fosfat (pH:7,4) çözeltisi ile yıkandı. Böylece AChE enzimi

kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 0.2 mM NaCl/10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH:7,4) tamponu tatbik edilerek AChE enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı. Alınan bu elüatların 412 nm'de aktivite ölçümü yapıldı.

Çizelge 4.1'de eritrositlerden saflaştırılan enziminin saflaştırma basamakları gösterilmektedir. Takrin ligand olarak kullanıldığında 30 mL kandan elde edilen 5 mL hemolizat kolona tatbik edildiğinde saflaştırma basamaklarının sonunda spesifik aktivite 9,22 olup enzim 658 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları sonunda yüzde verim değeri ise 23,5 olarak bulunmuştur.

Literatürde saflaştırma prosedürü gerçekten çok uzun ve oldukça maliyetlidir. Oysa bizi hazırladığımız afinite jelinin tekrar tekrar çok uzun süre kullanmak tek kolonla saflaştırmak daha az zaman alıcı ve daha az maliyetli olduğu da gözükmektedir.

Saflaştırılan AChE enziminin saflığını kontrol etmek amacı ile bölüm 3.5.3.'de anlatıldığı gibi SDS-PAGE elektroforezi yapıldı. Elektroforezin 1 kanalına molekül ağırlığı paramyosin (80 kDa), fusion ile MBP ve chitin bağlı domain) (58 kDa), CBD-Mxe Intein-2CBD (46 kDa) proteinler konuldu. Şekil 4.3'ten görüldüğü gibi AChE enzimi literatürde belirtildiği gibi tek bant ve yaklaşık 80.000 kDal molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edildi.

Hazırlanan takrin kolonu için asetilkolinesteraz enzimini tutma kapasitesi çalışmaları yapıldı. Enzimin kolona tutma kapasitesi bulunurken sıcaklık, pH ve iyonik şiddet parametrelerini incelendi ve protein/gram-jel cinsinden asetilkolinesteraz enziminin tutma kapasitesi belirlendi. Kapasite tayin işleminde hazırlanan jelden 1 ml alınarak dengeleme tamponuyla dengelenmiş 1x10 cm'lik bir kolona alındı ve daha önceden afinite ile elde edilen asetilkolinesteraz enzimi ile doyuruldu. Enzimin fazlası yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra bağlanmış olan asetilkolinesteraz enzimi uygun elüsyon tamponuyla elüe edilerek protein miktarı bulundu ve jel kurutularak tartılarak ve mg



protein/gram-jel cinsinden asetilkolinesteraz enziminin tutma kapasitesi belirlendi (Aslan *et al.* 1996).

Asetilkolinesteraz enziminin safalaştırılmasında hazırlanan kolondan sıcaklığın kolon kapasitesine etkisini belirlemek amacı ile pH 7,4 da 2, 10, 15, 20 ve 25°C farklı sıcaklıklarda tutma kapasitesi belirlenerek (mg protein /g jel başına) grafik edildi. Şekil 4.4'ten görüldüğü gibi 2°C de jel bağlanma kapasitesi diğer sıcaklıklardan daha verimli oldu.

Asetilkolinesteraz enzimi için kolonda pH'nın bağlanmayı nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile farklı pH'larda (pH 6,6 ile 8,2 arasında) tamponlar kullanılarak her pH için sonuçlar (mg protein/gram-jel başına) Şekil 4.5'de grafik edildi. Buradan pH:7,4 civarında maksimum bağlanma olduğu tespit edildi. Kolonların bağlanma kapasitelerini etkileyen iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacı ile enzimin optimum pH ve en uygun bağlanma sıcaklığında denemeler yapıldı ve bu iyonik şiddet 0,05 M ile 0,25 M arasında değiştirilerek, sonuçlar grafik ile gösterildi. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi 0,1 M konsantrasyonunda bağlanma maksimum olduğu belirlendi. Hazırladığımız afinite kolonundan asetilkolinesteraz enzimi için tutma kapasitesi testleri yapılmış oldu. 2°C'de pH 7,4'de 0,1M iyonik şidet konsantrasyonunda optimum bağlanma 0,07 mg/gjel olarak tespit edildi.

Optimum pH ve 20°C'de asetiltiyokolin iyodat substratı için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerini belirlemek üzere, her bir enzim için en az beş farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri yardımıyla lineweaver-burk grafikleri çizilerek Şekil 4.8'de  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu. Sonuçlar Çizelge 4.2'de verildi. Elde edilen sonuçlardan görüldüğü gibi  $K_M$  değerleri, eritrositlerden elde edilen asetilkolinesteraz için 0,372 mM, olarak bulundu. Bulunan bu sonuç daha önce farklı yöntemlerle saflaştırılan asetilkolinesteraz için literatürle uygunluk içerisindedir. Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi, asetiltiyokolin iyodat substratı için eritrositlerden elde edilen asetilkolinesteraz  $V_{max}$  değeri, için 0,065  $\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{dk}$  olarak bulundu.

Eritrositlerden afinite kromatografisi ile elde edilen asetilkolinesteraz enzimi için yapılan saflaştırma ve kinetik çalışma sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Parametreler	Eritrosit AChE enzimi
Protein (mg/30 ml)	0,0153
Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	9,22
Saflaştırma katsayısı	658
Optimum pH	7,4
Optimum Sıcaklık (°C)	37
$K_M$ (mM)	0,372
$V_{Max}$ (EÜ/ml)	0,065
Molekül ağırlığı (kDa)	80

Ligand olarak kullanılan takrin inhibitörü için detaylı kinetik çalışma yapıldı. Asetiltiyokolin iyodat substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doygun olmayan asetiltiyokolin iyodat (10 mM) reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplandı ve elde edilen bu değerlerle % Aktivite- Konsantrasyon grafikleri çizilerek  $I_{50}$  değerleri bulundu.

Asetilkolinesteraz için bu grafik Şekil 4.9'de gösterildi. Elde edilen  $I_{50}$  değerleri ise Çizelge 4.6'de gösterildi. Bu sonuçlara göre  $I_{50}$  değeri  $4,5 \cdot 10^{-5}$  olarak belirlendi.

Daha sonra elde edilen asetilkolinesteraz enzimleriyle 5 farklı asetiltiyokolin iyodat substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Takrin için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Şekil 4.10'da inhibisyon çeşiti ve  $K_i$  değerleri bulundu. Elde edilen bu değerler Çizelge 4.6'da gösterildi. Bu değerlere göre takrin yarışmasız inhibisyon etkisi göstermektedir.  $K_i$  değerleri ise  $3,76 \cdot 10^{-5}$  dir. Böylece saflaştırmada kullanılan ligandın detayli kinetik parametreleri ve inhibisyon tipi de ilk kez bu tez kapsamında tespit edilmiş oldu.

İlk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo mormoreta*) elektrik organında ekstraksiyon yoluyla saflaştırılan bu enzim diğer esterazlardan asetilkolini hidrolize

etmesi özelliğinden dolayı kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Düşük konsantrasyonda substrat enziminin aktif bölgesindeki proteinin çok az bir miktarı ile reaksiyona girdiği tespit edilmiştir (Akman 2007).

Asetilkolinesteraz enzimi insan eritrositlerinden, balık karaciğer ve beyninden yine balık üzerinde yapılan çalışmalarda balığın plazma ve eritrositlerden, kobra yılanı zehrinden bildircin beyninden izole edilmiştir. Literatürde belirtildiği gibi Main ve arkadaşları (1974) tarafından yapılan çalışmada at serumundan saflaştırılma oranı 4160 kat, Ralston ve ark. (1985) tarafından yapılan çalışmada da cenin durumundaki sığır serumundan saflaştırılan asetilkolinesteraz enziminin saflaştırma oranı 44000 kat olarak, yapılan bir başka çalışmada Waxmoth (*Galleria mellonella L.*) beyninden saflaştırılan asetilkolinesteraz enziminin saflaştırma oranı 283 kat olarak bulunmuştur (Akman 2007). Biz yaptığımız çalışmada takrin afinite kromatografisi yöntemiyle eritrositlerden 658 kat AChE enzimini saflaştırdığı tespit edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda inhibitör olarak N-metilakridinium (Dudai *et al.* 1972; Sekar *et al.* 1980) edrophonium (Chan *et al.* 1973; Hodgson *et al.* 1983) ve procainamid (Ralston *et al.* 1983; De la Hoz *et al.* 1986) kullanılan ligand afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

Corroll ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise takrin afinite kromatografisi ile asetilkolinesteraz enzimi yılan balığından %92 sığır eritrositlerinden %59 ve elektrik balığından %27-%60 verimle saflaştırma işlemi yapılmıştır. Corroll ve arkadaşlarının deney prosedürü epoxy aktive sepharose 6B 10 gram alınarak 200 ml suda şişirilmiş %50 formaldehit içeren 50 mM 100 ml soydum karbonat içine 5,13 gram takrin ilave edilmiş jel yapılırken serbest epoxy güçlü nükleofillerle yerdeğiştirmiş olup jel kullanıldıktan sonra 20 ml guanidin HCl ile yıkanmış böylece afinite ligandının serbest kalması engellenmiştir ve aynı zamanda saklama tamponuna son konsantrasyonun %5'i kadar etanol ilave edildi. Bu koşullarda jel bir yıl saklanabildi. Bizim hazırladığımız afinite jeli için herhangi bir saklama tamponuna gerek yoktur, jel hazırlanırken 25 mg takrin kullanıldı Corroll ve arkadaşlarının yapmış olduğu jelde ise 5,13 gram takrin

kullanılmış olup neredeyse bizim kullandığımız miktarın 200 katıdır. Bu çalışma 5mL hemolizattan gerçekleştirilmiştir.

Lesser grain borer'dan afinite kromatografisi ile AChE saflaştırılırken Zhu ve blindley tarafından tanımlanan afinite ligandı 3 karboksi fenil etil dimetil amonyum afinite ligandı olarak hazırlanırken bazı modifikasyonlarda yapılmıştır. Enzim %54 verimle 771 kat saflaştırılmıştır (Zhu *et al* 1998). Bu çalışmada elüsyondan elde edilen enzim çözeltisi %0,1 tritonX100 Net<sub>4</sub>I içeren 0,1M pH 7,5 sodyum fosfat tamponuna karşı diyaliz edilmiştir. Elüsyon tamponu 0,1M pH 7,5 sodyum fosfat içeren %0,1 tritonX100 ile 0,2 M Net<sub>4</sub>I ve yıkama tamponu ise 0,1M pH 7,5 sodyum fosfat içeren %0,1 tritonX100 ile 0,2M NaCl kullanılmıştır. Bu çalışmada elüsyon sonrası herhangi ek işleme gerek duymadan aktive ölçümü yaptık. Bilindiği üzere enzimlerin aktiviteleri sıcaklıkla değişir AChE enzimi 4°C'de aktivitesini birgün koruyabilir bir haftada enzim aktivitesinin %40'nı 10 gün sonra %70'ni kaybeder enzimi en iyi saklama koşulu -80 °C'dir. Mevcut tez kapsamında takrin afinite kromatografisi ile eritrositlerden %23,5 verimle enzim saflaştırılmıştır.

Asetilkolinesteraz enziminin saflaştırılması ile ilgili birçok kromatografik yöntem olmasına rağmen enzimlerin saflaştırılmasında çok önemli bir yöntem olan afinite kromatografisi ile ilgili literatür de çok detaylı saflaştırma prosedürü yoktur. Bu çalışmada kullandığımız siyanojen bromürle aktive edilmiş Sepharose 4B matriksi kullanılarak afinite kromatografisi tekniği ile AChE enzimin saflaştırılması ile ilgili hiçbir bilgiye rastlanmamıştır.

Takrin afinite jelinin diğer kullanılan jellere üstünlüğü ise; sentezinin daha kolay olması, daha ucuz olması ve çeşitli biyolojik materyallerden AChE nin spesifik olarak saflaştırılmasında seçiciliğidir. Saflaştırılan enzim için inhibisyon, aktivasyon, kinetik, optimum pH, optimum sıcaklık, optimum substrat konsantrasyonu belirleme amacıyla çalışmalar literatürde farklı dokulardan olmak üzere yapılmıştır.

Bu tez kapsamında, asetil kolin esteraz enzimi farklı bir matriks ve uzantı kolu kullanılarak bilinen inhibitörlerinden ligand seçilerek afinite jeli hazırlanması hedeflenmiş ve bu jelle saflaştırılması planlanmıştır. Elde edilen elüatlardan aktivite gösteren fraksiyonlar toplanıp ve hemolizat ve saf enzim için protein tayin AChE aktivitesi belirlenmiş ve spesifik aktiviteler belirlenerek saflaştırma oranına gidilmiştir. Enzim saflaştırıldıktan sonra ortamdaki tuzları uzaklaştırmak için diyaliz işlemi uygulanmıştır. Daha sonra SDS-PAGE ile enzim saflığı kontrol edilmiştir.

Bu amaçla ilk defa asetilkolinesteraz enzimi mevcut metotlara göre farklı bir afinite jeli hazırlanıp saflaştırılması yeni bir yöntem olarak literatüre katkı sağlayacak olması çalışmamızı önemli kılmaktadır. Takrin gibi diazonyum tuzu oluşturacak inhibitörler enzimin saflaştırılmasında afinite kolonunun ligandı olarak ilk kez kullanılmıştır.1,4 dihidro piridin enzimin inhibitörü ve takrin ile benzer yapıya sahip olmasına rağmen serbest amino grubu içermediğinden kolon materyali olarak kullanılamamıştır. Bunun yanında takrin ise serbest amino grubundan dolayı diazonyum tuzu oluşturmakta ve enzimi mevcut yöntemlere göre çok iyi bağladığı sonuçlarımızdan görülmektedir. Bu çalışmamız asetilkolinesteraz enziminin saflaştırılmasında (diğer inhibitörlerin donepezil, rivastigmin ve eptastigmin gibi) araştırılması gerektiğini inhibitörler içerisinde en iyi ligand belirlenmesi için bir başlangıçtır. Asetilkolinesteraz enzimi için bulduğumuz afinite kromatografisi tekniği mevcut yöntemlere göre daha ucuz, daha kısa ve daha verimli ve hazırlanan kolon materyali defalarca kullanılabilir özelliktedir.

**Sonuç Olarak;**

1. Asetilkolinesteraz enzimi mevcut yöntemler haricinde Sepharose-4B-L-tirozin-takrin jeli ile saflaştırılması ilk defa bu çalışmada gerçekleştirildi.
2. Enzimin literatürde mevcut saflaştırma yöntemlerine üstünlüğü ortaya konularak hazırlanan kolonun çok uzun süre kullanılabilirdiği ve daha ekonomik olduğu tespit edildi.
3. Afinite ile saflaştırılan enzim için  $K_M$  ve  $V_{max}$  gibi kinetik parametreleri tespit edildi.
4. Bu çalışmada ligand olarak kullanılan takrin için detaylı kinetik parametreler  $K_i$ ,  $I_{50}$  ve inhibisyon tipleri ilk defa bulundu.
5. Hazırlanan affinite kolonunun bağlama kapasitesi sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi parametreleri hesaplandı.

**KAYNAKLAR**

- Alaşehirli, B., 2005. Kolinesteraz İnhibitörleri (Antikolinesterazlar) Türkiye Klinikleri J. int. Med Sci, 1 (18 ), 47-57.
- Al-Jafari, A., Kamal ., A., Greig, N., H., Alhomida, S., A., Perry, R., E., 1998. Kinetics of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by a novel derivate of physostigmine :phenserine. Biochemical and Biophysical Research Communications 248, 180-185.
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Osdemir, H. and Kufrevioglu O.I.,1996, A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. Turk J. Med. Sci. 26,163.
- Beeri, R., Le Novere, N., Mervis, R., 1997. Enhanced hemicholinium binding and attenuated dendrite branching in cognitively impaired AChE-transgenic mice. J Neurochem, 69:2441-2451.
- 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.
- Carroll, T.R., Grimm, L.J., Hepburn ,W.T., and Emmerling, R.M., 1995. Purification of acetylcholinesterase by tacrine affinity chromatography. Prot. Expr. Purif. 6:389\_393.
- Chatel, M. J., Grassi,Y. Frobert, J. Massoulie, and Vallette , M. F., 1993. Existence of an inactive pool of acetylcholinesterase in chicken brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2400\_2403.
- Chatonnet, F.E., Boudinot, A Chatonnet, L., Taysse, S. Daulon, Champagnat, J.; Foutz, A. S.2003. Respiratory survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mouse. Eur. J. Neurosci. 18(6), 1419-1427.
- Cole, L. M., and Casida, J. E., 1983. Pyrethroid toxicolog in the frog. Pesticide Biochem. Physiol.20, 217-224.
- Dave, K.R., Syal, A.R., and Katyare, S.S., 2000. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties, Z. Naturforsch. 55, 100–108.
- David, G., Wilkinson, P.T., Schwam, E., Parrish, J.P., 2004, Cholinesteraseinhibitors used in the treatment of alzheimer’s disease. the relationship between pharmacological effect and clinical efficacy, Drugs Aging, 21, 7, 453-478.
- De La Hoz, D., Doctor, B. P., Ralston, J.S. Rush, R.S., and Wolfe, A. D., Simple general acid-base catalysis of physiological acetylcholinesterase reactions 1986.LifeSci. 39, 195-199.
- Demir, H., Turkoglu, V., 2005, Effects of neostigmine methylsulphate onenzyme activity of acetylcholinesterase in rat serum, plazma, muscle and liver in vivo. Scand.J.Lab. Anim. Sci.32, 1, 25-30.
- Doctor, B. P., chapman. T. C., Christner. C. E., Gentry. M. K., and Orgert. M. A., 1990. Complete amino acid sequence of fetal bovine serum acetylcholinesterase and its comparison in various regions with other acholinesterases 266:123-127.
- Dudai, Y., Silman, L.Shinitzky, M., and Blumberg, s. 1972. Purification by affinity chromatography of the moleculer forms of acetylcholinesterase present in

- fresh electric organ tissue of electric ee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2400-2403.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V & Featherstone R, M. A ,1961. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemica Pharmacology* 7:88-95.
- Ercan,S.Z.,2002.Alzheimerhastalığı tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleri. *Demans dergisi*, 2,5-9.
- Ferry B, Wirth S, Di Scala G (1999c): Functional interactionbetween entorhinal cortex and basolateral amygdala duringtrace conditioning of odor aversion in the rat. *Behav Neurosci* 113:118 –125.
- Fleisher, S., Packer, L, 1974. *Methods in Enzymology (Biomembranes, part A)* Academic Press, London 168-169.
- Galbraith, D.A., and WattsChanges D.C., 1980. In some cytoplasmic enzymes from red cells fractionated into age groups by centrifugation in Ficoll/Triosil gradients.comparison of normal humans and patients with Duchenne muscular dystrophy.*Biochem. J.* 191, (63–70).
- Geula, C., & Mesulam, M.M.,1999.Cholinergic systems in Alzheimer's disease. In: *Alzheimer Disease* (R. D. Terry, R. Katzman, K. L. Bick & S. S. Sisodia, Eds.), pp. 269–292. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Gilbert, H.F., 1992. *Basic Concepts in Biochemistry*, Mc Graw-Hill Inc. 81, Germany.
- Gilson, M.K., Straatsma, T.P., McCammon, J.A., Ripoll, D.R., Faerman, C.H., Axelsen PH, Silman, I., Susman, J.L.,1994. Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science.* 263,1276–1278.
- Greig, N., Utsuki, T., Yu, Q., 2001. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyryl-cholinesterase, 17:1-7.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq H., 1999, Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology, *Eur J. Biochem.*,264, 672-686.
- Guyton ve Hall. 1996. *Tıbbi Fizyoloji*, 9. Ed. Nobel Kitabevi.
- Güven, A., 2000. Asetilkolinesteraz'ın Önemi ve inhibitörleri.Kafkas Üniversitesi, veterinerlik Fakültesi Dergisi, 6 (1-2),145-151.
- Harel,M.,Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Goeldner, M., 1993. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 90, 9031-9035.
- Hogson, A. J., and Chubb, I.W., 1983.*J. Neurochem.* 41, 654-652.
- İseri, K., P., Efendi, H., 2003. Efficacy and safety of donezepil and rivastigmine in Alzheimer's disease. *Geriatrici* 6 (4), 119-123. Kadlubowski, M. & Agutter, P.S., 1977. *Br. J.Haematol.* 37, 111-125.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya*. 6. Baskı. Aktif yayınevi. İstanbul
- Kent, M., 2000. 'Advanced Biology 'Oxford Üniversitesi Pres.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227,680.
- Li, B., Stribley, J.A., Ticu A., Xie, W., Schopfer, L.M., Hammond, P., Brimijoin, S., Hinrichs, S.H., Lockridge, O.2000. Abundant Tissue Butyrylcholinesterase and Its Possible Function in the Acetylcholinesterase Knockout Mouse. *Journal of Neurochemistry.* 75(3):1320-1331.



- Liebelt, L., E. : Eski Antidotlar, Yeni Antidotlar Ve "Evrensel Antidot": Pediatrik Zehirlenmede Ne Kullanmalıyız? *Current Opinion in Pediatrics* 2007, 19:199-200.
- Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*, 110:627-639.
- Mesulam, M., 2004. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, ny)* 11(1):43-9.
- Noyan, A., 1996. Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji. *Metaksan A.Ş. Ankara*, 240-242.
- Nelson, D.L., Cox M.M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü: Prof.Dr.Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık.
- Neşe Ç.,2003, Butrylcholinesterase: Structure And Physiological Importance. *Turk J Biochem.*, 28(2);54-61.
- Ott, P., 1985. *Biochim. Biophys. Acta*,822, 375-392.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., Perry, R.,1999. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness. *Trends Neurosci*, 22: 273 80.
- Porcelli, F., Deflini, M., Del Giudice, M.R., 1999. The Kinetic Inhibition of Acetylcholinesterase from Human Erythrocyte by Tacrine and Some Tacrine Derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 27, 197-205(9).
- Potter,L.D.(1970). Control mechanisms in the nervous system, in *Handbook Neurochemistry*, plenum press, New York. 263-284.
- Ralston, J . S., Main, A. R., Kilpatrick, B.F., and Chasson, A.L.,1983. *Biochem.J.*211, 243-250 .
- Ropper, A.H., Brown, R.H., 2006. *Adams and Victor's Principles of Neurology*. Güneş Kitabevi.
- Saraçoğlu, M., Tanrıdağ, T., Tanrıdağ, O.: Alzheimer Hastalığında Kognitif Terapi Ve Yaklaşımları. *Demans Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 1998; 8(4):197-201.
- Sarter, M., Hasselmo, M., Bruno, J.,Givens B., 2005. Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain research reviews*, 48(1):98-111.
- Sabine, J.C., The clinical significance of erythrocyte cholinesterase titers. 1955.10, 1132-1138.
- Segel, I.H., 1975. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, p: 403.
- Sekar, M.C., Webb, G., and Roufogalis, B.D.,1980 *Biochim. Biophys. Acta* 613, 420-428.
- Susman, J., Silman, I., 1992. Acetylcholinesterase: : Structure and use as a model for spesification-protein interactions.*Curr Opin Biol*, 2:721-729.
- Şahin, A. H.,2002. Asetilkolin, Kolinesterazlar ve Alzheimer hastalığı. *Demans dergisi*, 2,69-73.
- Talesa, V.N., 2001, Acetylcholinesterase in alzheimer's disease. *Mech AgeingDev.*122, 1961-1969.
- Thacker P.D., 2003, Surprising discovery with alzheimer's medication, *Drug Discovery Today*.1, 8-9.
- Turkoglu, V., 2005. Purification and Characterization of Acetylcholinesterase from the Lake Van Fish (*Chalcalburnus Tarichii* P.1811). *Preparative and Biotechnology*. 33,137-145.

18. Ulusal Biyokimya Kongresi Özetleri. Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem] 2004; 29 (1); 1-176.
- Yalçın, Ç. : Alzheimer Hastalığında Kolinomimetik Tedavisi. İstanbul, Ekim-2001.
- Wilson, B. and Nachmansohn, D., 1954. In 'Ion transport across membranes' (HT Clarke Ed ). Academic Press, Newyork 35.
- Xie W, Stribley J.A., Chatonnet A., 2000. Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate ingene-targeted mice lacking AChE. J Pharmacol Exp Ther, 293:896-902.
- Zhu, K.Y., Brindley, W. A., 1992, Enzymological and inhibitory properties of acetylcholinesterase purified from lygus hesperus knight. Insect Biochem. Molec. Biol. 22:245-251.

## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Giresun Tirebolu'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Tirebolu'da tamamladı. 1998 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2002 yılında mezun oldu. 2000 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesinde hemşire olarak göreve başladı. 2009 yılında Antalya Akseki Şahinler Çok Programlı Lisesinde kimya öğretmeni olarak atandı. 2011 yılında Erzurum Anadolu Lisesine kimya öğretmeni olarak çalıştı. 2005 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Halen Erzurum Anadolu Lisesinde kimya öğretmeni olarak görev yapmaktadır.