

**İNSAN BEYİN ASETİLKOLİNESTERAZ
ENZİMİNİN KLONLANMASI, *E. coli*'de
EKSPRESYONU ve ENZİMİN
KARAKTERİZASYONU**

Hamid CEYLAN

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Anabilim Dalı

Genetik Bilim Dalı

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

2016

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İNSAN BEYİN ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİNİN
KLONLANMASI, *E. coli*'de EKSPRESYONU ve ENZİMİN
KARAKTERİZASYONU**

Hamid CEYLAN

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Genetik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2016**

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**İNSAN BEYİN ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİNİN
KLONLANMASI, *E. COLI*'de EKSPRESYONU ve ENZİMİN
KAREKTERİZASYONU**

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, **Hamid CEYLAN** tarafından hazırlanan bu çalışma **05/01/2016** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **Moleküler Biyoloji ve Genetik** Anabilim Dalı – **Genetik** Bilim Dalı'nda **Doktora** Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.**

Başkan : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Akın PALA

İmza :

Üye : Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 21.01.2016 tarih ve 4/32 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

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

İNSAN BEYİN ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİNİN KLONLANMASI, *E. coli*'de EKSPRESYONU ve ENZİMİN KARAKTERİZASYONU

Hamid CEYLAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Asetilkolinesteraz (AChE), sahip olduğu çoklu fonksiyonlarından ve özellikle kolinerjik sistemde üstlenmiş olduğu önemli rolünden dolayı dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, insan beyin AChE cDNA'sı pET SUMO vektörüne klonlandıktan sonra protein üretimi gerçekleştirildi. Oluşturulan rekombinant konstrakt çapraz PCR ile doğrulandı. Elde edilen rekombinant klon *Escherichia coli* BL21 (DE-3)'de ifade ettirildi. İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranozit (IPTG) indüksiyonu ile üretilen hekzahistidin (6xHis) kuyruğuna sahip füzyon proteini nikel (Ni^{2+}) afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Anti-His antikorları kullanılarak yapılan western blot sonucunda yaklaşık 90 kDa'luk füzyon proteini tespit edildi. Ellman metodu ile yapılan aktivite deneylerinde optimum sonuç pH 9 Glisin-NaOH tamponunda, oda sıcaklığında elde edildi. Kinetik parametre, K_M ve V_{max} , değerleri sırası ile 0.63 ve 0.69 olarak bulundu.

2016, 91 sayfa

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, klonlama, rekombinant protein, karakterizasyonu

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

CLONING, EXPRESSION in *E. coli*, and CHARACTERIZATION of HUMAN BRAIN ACETYLCHOLINESTERASE

Hamid CEYLAN

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Genetics Department

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

The molecular structure of acetylcholinesterase (AChE) attracts respectable interest, because of its versatility and significant role in cholinergic system. The objective of the present study was to clone full-length cDNA sequence of human brain acetylcholinesterase (hAChE) into pET SUMO vector and expressed successfully. The integrity of the constructed plasmid was confirmed by cross PCR. This recombinant clone was over expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE-3). In this work, we produced hexahistidine (6xHis) tagged fusion protein by Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction and purified using nickel (Ni^{2+}) affinity chromatography. Using anti-His antibody, we detected ~90 kDa fusion protein. The expression of the hAChE gene in a microbial host resulted in good biological activity. Using Ellman method, the recombinant AChE exhibited activity with optima at pH 9.0 glycine-NaOH buffer and room temperature. Kinetic parameters, K_M and V_{max} , determined as 0.63 and 0.69, respectively.

2016, 91 pages

Keywords: Acetylcholinesterase, cloning, recombinant protein, enzyme characterization

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel aşamaları Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarımda her türlü yardım ve desteği sağlayan, tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince fikirleri ile beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyeleri Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Harun BUDAK'a,

Yardımlarını hiç esirgemeyen, birlikte laboratuvar derslerinde ve sınavlarda görev aldığım asistan arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Dr. Yağmur ÜNVER, Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ ve Sayın Arş. Gör. Özkan BALTACI'ya,

Çalışmalarım sırasında yardım ve desteklerini eksik etmeyen Dr. Enver Fehim KOÇPINAR, Arş. Gör. Deryanur KILIÇ ve Yeliz DEMİR ile Genetik ve Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarlarındaki bütün lisansüstü arkadaşlarıma da sabır ve hoşgörülerinden dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatımın her anında hep yanımda olup desteklerini ve dualarını üzerimden eksik etmeyen aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Hamid CEYLAN

Ocak, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç ve Kapsam.....	1
1.2. Nörodejenerasyon.....	2
1.3. Nörodejenerasyonun Başlıca Nedenleri	3
1.3.1. Genetik faktörler.....	3
1.3.2. Protein katlanmalarında meydana gelen anormallikler	4
1.4. Alzheimer Hastalığı.....	5
1.4.1. Erken başlangıçlı (ailesel) alzheimer	6
1.4.2. Geç başlangıçlı alzheimer	7
1.4.3. Amiloid beta (A β) oluşumu.....	7
1.4.4. Hastalığa karşı terapötik yaklaşımlar	9
1.5. Kolinergik Sistem ve Asetilkolin	9
1.6. Enzimler	12
1.7. Asetilkolinesteraz Enzimi	13
1.8. SUMO Protein Ekspresyon Sistemi	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kullanılan alet, cihaz, kimyasal ve çözeltiler.....	25
3.1.2. Test mikroorganizmaları	32
3.1.3. Protein Ürününün cDNA Sekansı	32
3.1.4. T4 DNA ligaz	32
3.1.5. pET SUMO klonlama ve protein ekspresyon sistemi	32

3.1.6. Büyütme (besiyeri) ortamları	32
3.1.7. Plazmit saflaştırma kiti	33
3.1.8. Primerler	33
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Gen bölgesinin çoğaltılması	33
3.2.1.a. Gene ait primerlerin dizayn edilmesi.....	33
3.2.1.b. AChE genine ait cDNA sekansının çoğaltılması	34
3.2.2. PCR ürününün agaroz jel elektroforezi ile kalitatif tayini	35
3.2.3. PCR ürününün jelden ekstraksiyonu	35
3.2.4. Rekombinant vektörün elde edilmesi	36
3.2.5. Rekombinant vektörün kompetent hücelere transformasyonu.....	36
3.2.6. Koloni PCR	37
3.2.7. Plazmit izolasyonu	38
3.2.8. Çapraz kontrol PCR reaksiyonu	39
3.2.9. Pozitif sonuç veren bakterilerin gliserolde stoklanması.....	40
3.2.10. Rekombinant plazmitin konağa transformasyonu	41
3.2.11. Pilot (deneme) ekspresyon	41
3.2.12. Hücrelerin parçalanması ve örneklerin toplanması	42
3.2.13. Doğal şartlar altında kolondan rekombinant protein saflaştırma	43
3.2.13.a. ProBond™ kolonun hazırlanması	43
3.2.13.b. Rekombinant proteinin konsantre hale getirilmesi.....	45
3.2.13.c. Diyaliz basamağı	46
3.2.14. Karakterizasyon çalışmaları	47
3.2.14.a. Bradford metodu ile protein miktarının belirlenmesi	47
3.2.14.b. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	47
3.2.14.c. Aktivite tayini	48
3.2.14.d. Optimum pH, sıcaklık ve tampon konsantrasyonunun belirlenmesi.....	49
3.2.14.e. ATC substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	50
3.2.14.f. Western Blot Analizi.....	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	53
4.1. İnternet Ortamından AChE Enzimini Kodlayan Sekansın Bulunması	53

4.2. AChE Enzimine Ait Aminoasit Sekansı	54
4.3. AChE Genine Ait Primerlerin Belirlenmesi.....	54
4.4. cDNA Kütüphanesinden AChE Kodlama Bölgesinin PCR İle Çoğaltılması ve Agaroze Jel Elektrophorezi ile Kontrol Edilmesi	55
4.6. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi ve Konak Organizmaya Transformasyonu.....	55
4.7. Koloni PCR	56
4.8. Plazmit İzolasyonu ve Çapraz PCR.....	57
4.9. Rekombinant Plazmitin Protein Üretimi İçin Konağa Transformasyonu	59
4.10. Toplanan Örneklerin Analizi.....	60
4.10.1. Bradford metodu ile protein miktarının belirlenmesi.....	60
4.10.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrophorezi SDS-PAGE	61
4.10.3. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	63
4.10.4. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi	63
4.10.5. Optimum sıcaklık belirlenmesi	65
4.10.6. ATC substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar.....	66
4.10.7. Western blot analizi.....	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	69
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	92

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

aa	: Aminoasit
A β	: Amiloid beta
bç	: Baz çifti
BSA	: Bovine (sığır) serum albumin
cDNA	: Komplamenter DNA
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosid trifosfat
DTT	: Ditiotreitol
E.C.	: Enzim komisyon numarası
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EÜ	: Enzim ünitesi
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
IPTG	: İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit
kb	: Kilo baz
kDa	: Kilo dalton
K _M	: Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
LB	: Luria bertani
mRNA	: Messenger (haberci) ribonükleik asit
NCBI	: National center for biotechnology information- biyoteknoloji bilgi ulusal merkezi
Ni-NTA	: Nikel-nitrilotriasetik asit
OD	: Optik dansite
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PVDF	: Poliviniliden diflorid
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SUMO	: Small ubiquitin-like modifier

TAE	: Tris-asetat-EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
T _m	: Ayrılma sıcaklığı
Tris	: Trihidroksimetil aminometan
UV	: Ultraviyole
V _{max}	: Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Başlıca nörodejeneratif hastalıkların patolojisindeki genetik temeller.....	3
Şekil 1.2. Protein metabolizmasında meydana gelen anomaliler ve neden oldukları başlıca nörodejeneratif hastalıklar	4
Şekil 1.3. APP'nin genel proteoliz yolağı.....	8
Şekil 1.4. APP'nin farklı tipteki kesimleri sonucu oluşan A β versiyonları	8
Şekil 1.5. Asetilkolin sentezini gösteren reaksiyon	10
Şekil 1.6. vAChT'a H ⁺ değişimi ile ACh alınımı ve depolanması	12
Şekil 1.7. Asetilkolinin asetilkolinesteraz aracılığıyla asetat ve koline hidrolizlenmesini gösteren reaksiyon.....	14
Şekil 1.8. ACh'nin sentez, salınım, inaktivasyon ve presinaptik nörona geri alınım işlemleri.....	14
Şekil 1.9. Sinaptik alandaki ACh sentez ve transfer mekanizması.....	15
Şekil 1.10. AChE enzimine ait şematik çizimler	17
Şekil 1.11. İnsan AChE geninin genel yapısı ve gene ait alternatif RNA'lar.....	19
Şekil 1.12. pET SUMO vektör haritası.....	20
Şekil 1.13. pET SUMO vektörüne ait TA klonlama sitesi	20
Şekil 3.1. IMAC'ta kullanılan farklı metaller ve bu metallere ait afinite-spesifiklik karşılaştırması	44
Şekil 3.2. En çok tercih edilen IDA ve NTA'nın polihistidin kuyruğu içeren proteinlerle kurduğu etkileşime ait şematize gösterim.....	45
Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR ürünleri.....	55
Şekil 4.2. Transformasyon sonrası antibiyotikli besiyeri ortamında gelişen koloniler ..	56
Şekil 4.3. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen koloni PCR ürünleri.....	57
Şekil 4.4. Rekombinant vektörü aldığı doğrulanmış kolonilerin stoklama için ekiminin yapıldığı katı besiyeri.....	58
Şekil 4.5. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen çapraz PCR ürünleri	59
Şekil 4.6. Plazmitlerin ekspresyon konağına aktarılmasından sonra meydana gelen koloniler.....	60

Şekil 4.7. Bradford analizi ile proteinlerin kantitatif tayinini için kullanılan standart grafik.....	61
Şekil 4.8. Pilot ekspresyon sonucu elde edilen hücre lizatına ait SDS-PAGE fotoğrafı.....	62
Şekil 4.9. Kısmi saflaştırma yapılan enzime ait SDS-PAGE fotoğrafı.....	62
Şekil 4.10. hAChE enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda Glisin-NaOH tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen absorbans değerleri	64
Şekil 4.11. hAChE enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda Glisin-NaOH tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen aktivite ölçüm sonuçları	64
Şekil 4.12. hAChE enzimine ait optimum sıcaklık şiddetini belirlemek için farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen absorbans değerleri	65
Şekil 4.13. hAChE enziminin optimum sıcaklık ölçümü için farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen aktivite değerleri	66
Şekil 4.14. AChE enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik ATC derişimi-aktivite çizelgesi	67
Şekil 4.15. hAChE enzimi için 5 farklı ATC konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	67
Şekil 4.16. Western blot ile elde edilen bantlar ve bu bantlara ait ImageJ nispi yoğunluk sonuçları	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması	13
Çizelge 1.2. Serin hidrolaz süper ailesi içerisinde bulunan bazı enzim grupları	16
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar	25
Çizelge 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar.....	26
Çizelge 3.3. Tez kapsamında kullanılan tampon ve çözeltiler.....	27
Çizelge 3.4. AChE geninin amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyon karışımı	34
Çizelge 3.5. AChE geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon koşulları	34
Çizelge 3.6. Ligasyon işlemi için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	36
Çizelge 3.7. Koloni PCR reaksiyon karışımı	38
Çizelge 3.8. Koloni PCR reaksiyon şartları	38
Çizelge 3.9. SUMO vektörüne ait primer bilgileri	40
Çizelge 3.10. Plazmitten yapılan kontrol PCR reaksiyonları	40
Çizelge 3.11. AChE aktivite ölçümünde kuvvet içeriği	49
Çizelge 3.12. Kullanılan tamponlar ve pH aralıkları	50
Çizelge 3.13. SDS jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli değerleri.....	51
Çizelge 3.14. SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli değerleri.....	52
Çizelge 4.1. AChE genine ait primerlerin özellikleri	54
Çizelge 4.2. Bradford yöntemi ile belirlenen protein miktarları.....	61
Çizelge 4.3. Farklı pH aralığındaki tamponlar kullanılarak elde edilen değerler.....	63
Çizelge 5.1. Rekombinant insan farmasötik proteinler için kullanılan üretim sistemlerinin karşılaştırılması	73
Çizelge 5.2. Farklı çalışmalarda elde edilen AChE'a ait kinetik değerler.....	76

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Canlılığın temel özelliklerinden olan ve birçok farklı çeşitte gerçekleşebilen reaksiyonlar enzim olarak adlandırılan katalizörler aracılığı ile yürütülürler. Teknoloji ve özellikle informatik alanındaki gelişmeler bu aracı moleküllerin yapı ve işlevleri üzerinde istenilen değişikliklerin yapılarak daha etkin kullanılmalarını mümkün kılmaktadır. Özellikle moleküler teknikler kullanılarak doğal ortamlarına oranla daha yüksek kapasitede çalışan enzimler üretilmektedir. Bu ürünler çok geniş bir kullanım yelpazesine hizmet etmektedir. Günümüzde enzimler tıp, gıda ve çevresel amaçlar için kullanılmakta ve bahsi geçen bu alanların tüm kademelerinde kendilerine yer bulabilmektedirler.

Mevcut enzimlerin bu şekilde geliştirilmesi; zaman alan işlemlerin hızlandırılması, *in vitro* ortamda çalışmaya izin vermesinden dolayı ilaç geliştirilmesi ve canlıda meydana gelen olayları taklit etmeye imkan sağlaması gibi özelliklerinden dolayı doğa bilimleri alanları içerisinde oldukça önemli bir konuma sahip olmuştur.

Yukarıda da özetle bahsedildiği üzere gen, protein ve enzim mühendisliği gibi güncel alanlardaki gelişmeler canlılarda meydana gelen olaylar hakkında yorum yapabilme ve aydınlatılmayı bekleyen mekanizmalara ışık tutma imkanı sağlamaktadır. Bu çalışmalarla elde edilen veriler doğrultusunda günümüzde birçok hastalığa yönelik terapötik yaklaşım geliştirilerek insanlığın hizmetine sunulmaktadır.

Hastalıklarla bağlantılı enzimlerin saflaştırılması, klonlanması ve karakterizasyonu ile biyokimyasal kimliklerinin tanımlanması üzerine yapılan çalışmalara ilgi gittikçe artmaktadır. Elde edilen rekombinant ürünler en az canlıdaki doğal halleri kadar işlevsel olabildikleri için yapılan çalışmaların kabul edilebilirliği de o ölçüde özgün olmaktadır.

Bu rekombinant ürünlerin doğal ortamlarına kıyasla daha yüksek miktar ve aktivite değerleri ile üretilmesi ticari açıdan da oldukça önemli kabul edilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi böylesi büyük bir öneme sahip enzimleri daha düşük maliyet ve daha yüksek miktarlarda elde etmeye imkan sağladığı için günümüzde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Arzu edilen gen parçasının bir taşıyıcı (vektör) aracılığı ile yine uygun bir konağa transferi sonucu elde edilen protein uygun yöntemlerle saflaştırıldığında laboratuvar ortamında kullanılabilir hale gelebilmektedir. Söz konusu strateji verimliliğin yanı sıra daha düşük bir maliyetle üretimi de sağlayabilmektedir.

Mevcut çalışmada, sahip olduğu klinik önem ilerideki bölümlerde de verilecek olan literatür bilgileri ile kanıtlanmış olan asetilkolinesteraz enziminin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilmesi ve biyokimyasal özellikleri incelenmesi amaçlanmıştır.

1.2. Nörodejenerasyon

Nörodejenerasyon, insan beynindeki nöronların doğrudan etkilendiği durumlar söz konusu olduğunda meydana gelen ve nöral işlev kayıpları ile sonuçlanan olaylar dizisidir. Bu sürecin önemli nedenlerinden bir tanesi de sinir hücrelerinin rejenerasyon yeteneklerinin olmaması yani kusurlu hücrenin yerine yenisinin getirilememesidir (Barzilai 2010). Birçok tipi olan bu hastalık grubunda görülme sıklığı en fazla olan patolojiler; Parkinson hastalığı (Polymeropoulos *et al.* 1997), Alzheimer hastalığı (Tanzi 1999), Huntington hastalığı (Bano 2011) ve Amyotrofik lateral skleroz'dur (Bertram and Tanzi 2005).

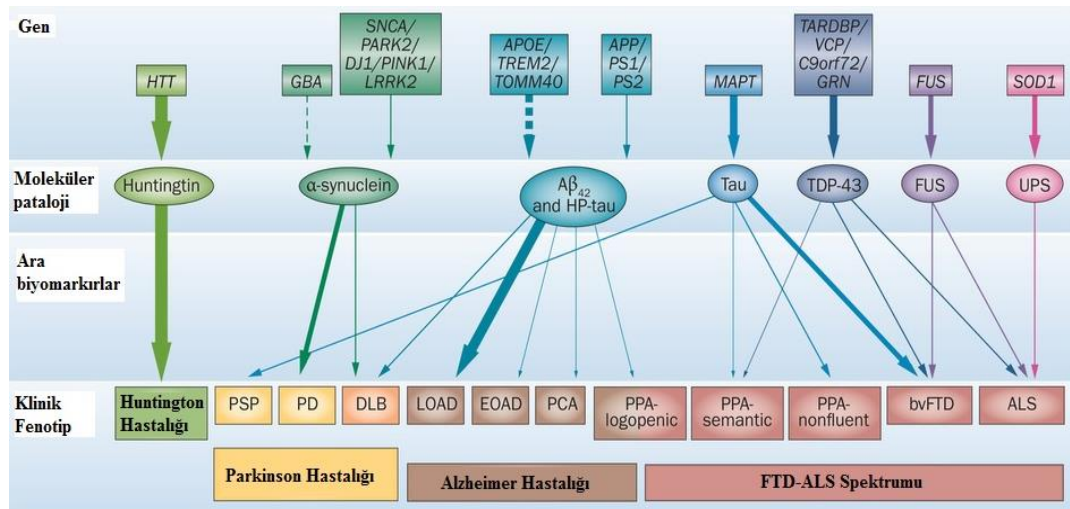
Bu hastalıkları birbirinden ayıran temel etken hastalık sürecinde etkilenen doku veya hücre tiplerinin birbirinden farklı olmasıdır. Örneğin; Parkinson hastalığında korteks ve beynin diğer birçok bölgesindeki nöronlar etkilenmezken substantia nigradaki dopaminerjik nöronların yaygın hasarı söz konusudur (Kim *et al.* 2003). Bunun tam zıttı olarak Alzheimer hastalığında ise nöron hasarı hipokampus ve neokortekste çok ciddi

düzyededir (Scheff and Price 2006). Amyotrofik lateral skleroz'da motor nöronlar ve kortikal nöronlarda hasar oluşmaktadır (Nihei *et al.* 1993). Huntington hastalığında ise patolojik değişiklikler esas olarak neostriatumda sınırlanmıştır fakat mutant gen beyin ve birçok başka organda eksprese olabilmektedir (DiFiglia 1990).

1.3. Nörodejenerasyonun Başlıca Nedenleri

1.3.1. Genetik faktörler

Birçok nörodejeneratif hastalık canlıda meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkar. Bu mutasyonlar hastalıkla doğrudan ilişkili genlerde olabildiği gibi bazı durumlarda hastalığı indirekt olarak ilgilendiren bir yolakta görev yapan genlerde de meydana gelebilmektedir (Şekil 1.1).



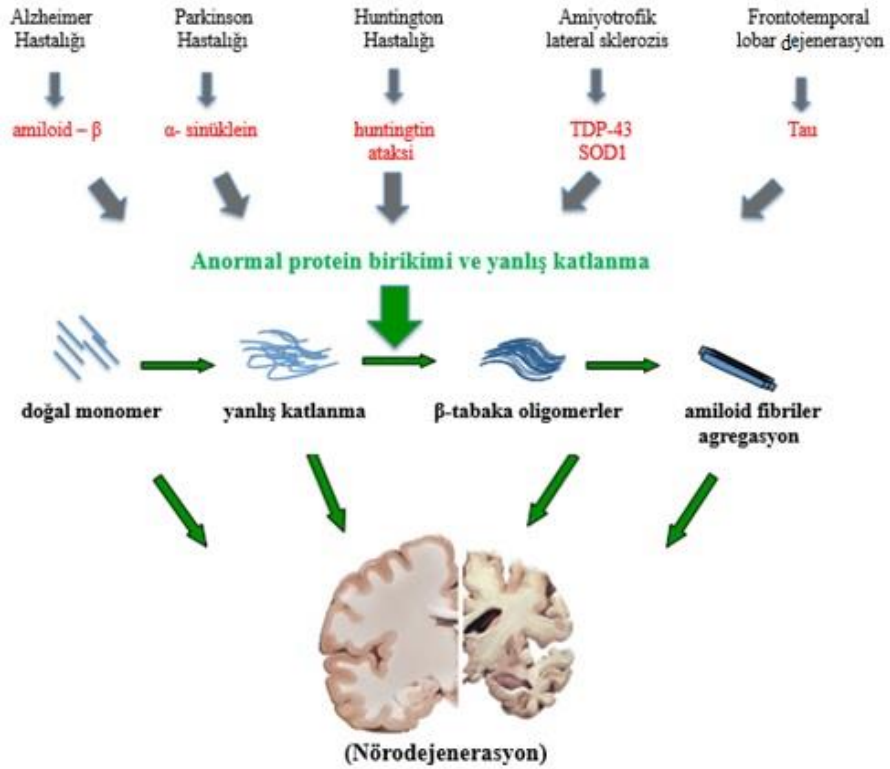
Şekil 1.1. Başlıca nörodejeneratif hastalıkların patolojisindeki genetik temeller (Pievani *et al.* 2014)

Bu tip hastalıkların birçoğunda mutasyona uğrayan genlerdeki ortak özellik sitozin-adenin-guanin (CAG) nükleotit tripletlerinin tekrarlanmasıdır. Bu tekrar sonucunda glutamin amino asidi meydana gelmektedir. Hücrede oluşan ekstra glutamin kalıntıları; düzensiz protein katlanmaları, hücre içi lokalizasyon bozukluklarında artış ve diğer

hücre proteinleri ile anormal interaksiyon gibi toksik karakterde kaskadlara neden olur (Thompson 2008).

1.3.2. Protein katlanmalarında meydana gelen anormallikler

Yapısal olarak anormal proteinlerin hücre, doku ve organlarda fonksiyon bozukluğu oluşturmaya proteopati adı verilmektedir (Walker and LeVine 2000). Bu süreçte proteinler meydana gelen yanlış konfigürasyondan dolayı ya toksik etki oluşturan bir forma dönüşürler (Şekil 1.2) veya fonksiyonlarını tamamen kaybederler (Luheshi *et al.* 2008). Alzheimer, Parkinson ve prion hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların kaynağı olarak proteopati denilen bu anomali gösterilmektedir (Chiti and Dobson 2006). Nitekim Alzheimer hastalığının sebeplerinden beta amiloid (β -amilod) kalıntıları ile nörofibriler yumaklar da bu durumun en bilindik örnekleri arasındadır (Ksiezak-Reding *et al.* 1994).



Şekil 1.2. Protein metabolizmasında meydana gelen anomaliler ve neden oldukları başlıca nörodejeneratif hastalıklar (Di Carlo *et al.* 2011)

Protein metabolizması kaynaklı bir diğer etken ise meydana gelen yanlış katlanmış veya işlenmiş protein kalıntılarının sağlıklı bir şekilde ortadan kaldırılamamasıdır. Bu aşamadaki temel problem protein degradasyon süreçlerinde gerçekleşen eksikliklerdir. Bunlardan en önemlisi olarak görülen ubikuitin-proteazom yolağındaki enzimler özellikle proteopati sonucu oluşan birçok proteinin degradasyonunu sağlamaktadır. Eğer parçalama süreci yanlış işlerse hastalıkların oluşmasındaki esas etken olarak kabul edilen birikme eğilimi gösteren protein kalıntıları oluşacaktır (Dobson 2003). Bu yüzden mevcut araştırmalar bu yolaktaki enzimlerin neden işlev yapmadığından çok ilgili enzimlerin neden yanlış işlev gösterdiği üzerinde yoğunlaşmaktadır (Rubinsztein 2006; Herrmann *et al.* 2007).

1.4. Alzheimer Hastalığı

Vücudumuzun diğer kısımlarında olduğu gibi ilerleyen yaşlarda beynimizde de değişimler meydana gelmektedir. İnsan beyinde yaklaşık olarak 100 milyar civarında sinir hücresi (nöron) bulunmaktadır. Bu hücreler birbirleri ile kusursuz işleyen bir iletişim ağı ile bağlantı kurarlar. Alzheimer bu hücrelerin zarar görmesi veya ölmesi sonucu meydana gelen nörodejeneratif bir hastalıktır (Azevedo *et al.* 2009).

1907 yılında Alman bir psikiyatr ve nöropatolog olan Alois Alzheimer tarafından tanımlanan ve bu bilim adamının adı verilen Alzheimer; hafıza başta olmak üzere konuşma, insanları tanıma ve yön bulma gibi bir insanın gündelik yaşamında defalarca tekrarladığı davranış ve düşüncelerin zamanla zayıfladığı, ilerleyici bir nöral hastalıktır (Cummings 2004).

Hastalığıdaki yaşa bağlı ilerlemenin temel nedeni daha önce bahsedilen protein degradasyon sürecinde görev alan enzimlerin yanlış işlev göstermesi ve dolayısıyla agregasyon eğiliminde olan kalıntıların birikimidir. Bahsi geçen enzimlerin bu şekilde yanlış işlev göstermesinde bireyin karşılaştığı çevresel olguların yanı sıra genetik faktörler de rol almaktadır. Bu yüzden hastalık “erken başlangıçlı” ve “geç başlangıçlı” olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Koedam *et al.* 2009).

1.4.1. Erken başlangıçlı (ailesel) alzheimer

Hastalığın bu tipi nadir görülen formudur. Alzheimer hastalarının yaklaşık %5'lik gibi küçük bir kısmında görülmektedir ve 30 ile 60 yaş arasındaki grupta ortaya çıkmaktadır. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı kalıtsaldır ve ailesel Alzheimer hastalığı (AAH) olarak isimlendirilmektedir. AAH'a 1., 14. ve 21. kromozomlar üzerinde bulunan bazı genlerin mutasyonu sonucu meydana gelmektedir (Koedam *et al.* 2009).

Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığına Amiloid β (A4) prekürsör protein (APP), Presenilin 1 (PSEN1), Presenilin 2 (PSEN2) genlerinde meydana gelen 200'den fazla mutasyonun neden olduğu tespit edilmiştir. Meydana gelen bu mutasyonlar sonucu daha önce de üzerinde durulduğu gibi proteaz enzimleri hatalı işlev gösterir. Bu nedenle amiloid prekürsör proteini üzerinde gerçekleşen degradasyon işlemi yanlış bir süreç izler ve özellikle birikme eğilimi yüksek olan 42 aminoasitlik β -amiloid oranı aşırı derecede artar. Hipokampus ve korteks β -amiloid birikiminin olduğu temel bölgelerdir (Turner *et al.* 2003).

Erken başlangıçlı Alzheimer vakalarının %40'ından fazlası 14. Kromozomda bulunan presenilin1 (PSEN1) genindeki mutasyon ile bağlantılıdır. Bu gendeki mutasyon sonucu kanda ve serebrospinal sıvıda β -amiloid miktarı artar. Diğer bir etken ise 1. kromozom üzerindeki presenilin2 (PSEN2) geninin mutasyona uğramasıdır (Drouet *et al.* 2000).

Bu iki gen tarafından kodlanan presenilin 1 ve 2 proteinleri esasında amiloid öncü proteinleri proteolitik yıkıma uğratan gama (γ) sekretaz enziminin katalitik bileşenleridir (Wakabayashi and De Strooper 2008). PSEN1 geninde *in vitro* ortamda oluşturulan nokta mutasyonları toksik karakterdeki β -amilod peptidlerin oluşumunu arttırdığı görülmüştür. Yine benzer şekilde PSEN1 genine sahip olmayan fare embriyolarından elde edilen nöral hücre kültürlerinde APP'nin γ sekretaz kesiminde azalma olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle bahsi geçen genlerde meydana gelen mutasyonlar hastalık tedavisinde hedef haline gelmiştir (De Strooper *et al.* 1998; Holcomb *et al.* 1998; Scheuner *et al.* 1996).

1.4.2. Geç başlangıçlı alzheimer

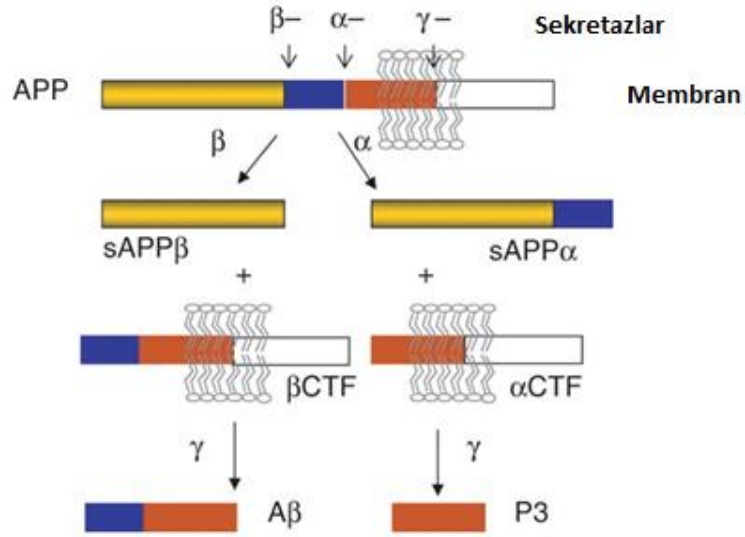
Alzheimer vakalarının büyük kısmı 60 yaşından sonra ortaya çıkan geç başlangıçlı Alzheimer'dır. Hastalığın bu tipi için spesifik bir gen tanımlanmamasına rağmen önemli bir genetik riskin hastalığa zemin oluşturduğu düşünülmektedir. Bu risk 19. kromozom üzerinde bulunan ApolipoproteinE ile ilişkilidir. ApoE'nin 3 farklı formu vardır; ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3 ve Alzheimer hastalığından etkilenenlerin yaklaşık olarak %40'ında bulunan ApoE ϵ 4'tür. ApoE4 alleli taşıyan bireyler Alzheimer gelişimi yönünden büyük risk altındadırlar (Handley *et al.* 2006). ApoE beyin β -amilod seviyesinin düzenlenmesinde, birikiminde ve tasfiyesinde önemli bir role sahiptir (DeMattos *et al.* 2001; Zlokovic *et al.* 2005).

1.4.3. Amiloid beta (A β) oluşumu

PSEN2 ve PSEN1 gen ürünleri, APP geni tarafından kodlanan amiloid öncü proteinlerinin toksik β -amiloid peptidlere parçalanmasına neden olan γ -sekretaz enziminin katalitik bileşenlerini oluştururlar. Bu genlerdeki mutasyonlar sonucu sekretaz enzimi yanlış kesim yapar (Şekil 1.1) ve böylece Alzheimer'a neden olan β amiloid peptidler meydana gelir (Wakabayashi and De Strooper 2008).

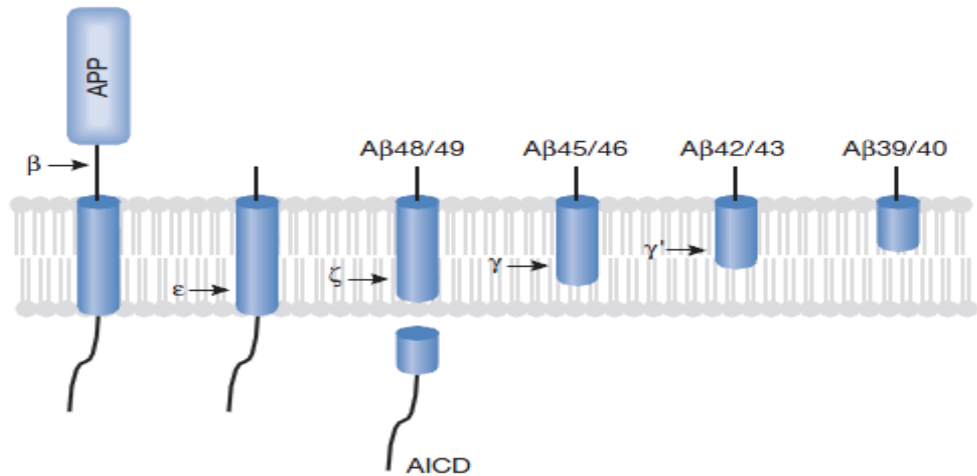
Amiloid plaklar APP'nin hatalı kesimi sonucu oluşmaktadır. Normalde bu işlem nöral aktivite tarafından regüle edilmektedir. Proteoliz γ -sekretaz, beta (β) sekretaz ya da alfa (α) sekretaz enzim aktiviteleri tarafından sağlanmaktadır. APP, α -sekretaz enzimi ile transmembran bölgesinden 12 aminoasit uzaklıktan kesime maruz kalır. Bu işlem sonucunda çözünebilir özellikte olan çözünebilir α -APP fragmanları oluşur ve bu fragmanlar ekstraselüler aralığa salınır. α -sekretaz enzimine alternatif olarak β -sekretaz enzimi tarafından da bir kesim gerçekleşebilir. Bu işlem sonucu da proteinin amino terminaline 16 aminoasit yakından bir bölgeden kesim gerçekleşmiş olur. Bunun sonucunda β -APP'ler meydana gelir. APP'nin ikinci kesilme işlemi α -sekretaz ya da β -sekretazla kesimi takiben γ -sekretaz tarafından gerçekleştirilir (Şekil 1.3). α -sekretaz

tarafından gerçekleştirilen kesim sonucu p3 fragmanı, β -sekretaz kesimi sonucu ise $A\beta$ peptidi meydana gelir (Saka 2010).



Şekil 1.3. APP'nin genel proteoliz yolağı (Tian *et al.* 2010).

Aynı zamanda γ -sekretaz kesimi meydana gelecek olan $A\beta$ peptidinin boyunu belirleyen unsurdur. Presenilin genlerinde meydana gelen mutasyon nedeniyle APP'nin ϵ kesiminde kayma meydana gelir. Bunun sonucunda $A\beta_{42}$ 'nin öncü ürünü $A\beta_{48}$ oluşur (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. APP'nin farklı tipteki kesimleri sonucu oluşan $A\beta$ versiyonları (Wolfe 2007)

*APP: Amiloid öncü protein, AICD: Amiloid öncü protein intraselüler domain

1.4.4. Hastalığa karşı terapötik yaklaşımlar

Buraya kadar verilen bilgiler hastalığın temel moleküler mekanizmasına ait olan literatür bilgileridir. Bu bilgilerin verilişindeki temel amaç hastalık hakkında genel bir bakış açısının oluşturulmasıdır. Bu gibi mekanizmaların bilinmesi hastalığa karşı en uygun yaklaşımı, hastalık için etkin bir tedavi önerisini ve hatta hastalığın tamamen önlenbilmesi noktasındaki fikirlerin gün yüzüne çıkması için esas teşkil etmektedir. Nitekim bu bilgiler ışığında hastalık için farklı tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Anti-amiloid tedavi ve kolinerjik tedavi olarak iki temel gruba ayrılan bu stratejiler günümüzde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Doraiswamy 2002).

Anti amiloid tedavinin temel yaklaşımı farklı nedenlerle meydana gelen, gerek hücre içerisinde gerekse hücre dışında biriken amiloid plakların yok edilmesi veya miktarının azaltılması üzerinedir. Bu yaklaşımın ana gerekçesi özellikle hücre dışında meydana gelen bu birikimin nörotransmitter madde trafiğini etkilediği ve dolayısıyla sinir hücreleri arasındaki iletişimi zaafa uğrattığı yönündedir. Oluşan bu plakların miktarı azaltıldığında uyarıcı madde akışının daha rahat gerçekleşeceği varsayılmaktadır. İşte tam da bu noktada ikinci tedavi stratejisi olan kolinerjik tedavi ortaya çıkmaktadır. Bu stratejiye göre; sinir hücrelerinin ölmesi sonucu nörotransmitter madde üretimi azalacaktır. Diğer taraftan da az miktarda olan bu uyarıcı maddeler plaklar dolayısı ile daralan sinaptik alanda rahat bir şekilde iletilmeyecektir. Bu nedenle bu maddelerin miktarının artırılması veya bu maddeleri parçalayan enzimlerin aktivitelerinin azaltılması kolinerjik tedavinin temel yaklaşımı haline gelmiştir (Francis 1999).

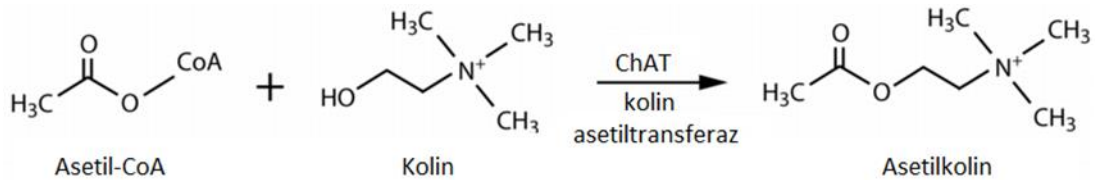
1.5. Kolinerjik Sistem ve Asetilkolin

Nöroloji alanındaki yaklaşık son 40-50 yıllık süreç merkezi sinir sistemindeki (MSS) nörotransmisyonun (sinir iletimi) mekanizmasını anlamak üzerine geçmiştir. Elde edilen veriler MSS’de bulunan nöronlar arasındaki iletimin kısmen geniş bir alanda ve sürekli olduğunu göstermiştir (Descarries *et al.* 1997).

Merkezi kolinerjik sinir iletiminin bilişsel fonksiyonlar için oldukça önemli olduğu düşüncesi çok eskilere dayanmaktadır. Diğer nörotransmitterlerin öğrenme ve hafıza performansına olan etkisi bilinmesine rağmen kolinerjik sistem fonksiyonlarının öğrenme ve hafıza üzerine etkisi bu alandaki çalışmaların önüne geçmektedir. Söz konusu çalışmaların genel yaklaşımı; “nörotransmitterler vardır, önemli görevleri yürütmektedirler ama bu aracı moleküllerin özellikle sinaptik alandaki akıbetleri ve işlenişleri nasıldır” şeklindedir. Bu açıdan bakıldığı zaman kolinerjik sistemin hafıza ve öğrenme noktasında muhtemelen kilit bir rol üstlendiği düşünülmektedir. Dahası, yaşlanma ve nöral hastalıkların etkisi ile oluşan bilişsel fonksiyon bozukluğunun çözümü olarak çeşitli sebeplerle (yaşlanma, antagonistler, lezyonlar vs.) zaafa uğrayan kolinerjik fonksiyonların iyileştirilmesi görülmektedir (Blokland 1995).

Asetilkolin (ACh) aracılı nörotransmisyon (sinir iletimi) sinir sistemi fonksiyonu için oldukça önemlidir (Soreq and Seidman 2001). Asetilkolin seviyesindeki ani düşüş ölümcül olabilirken bu seviyenin kademeli düşüşü Alzheimer gibi ilerleyici bilişsel bozuklukların yanı sıra otonomik ve nöromusküler bozukluklara neden olmaktadır (Wright *et al.* 1993; Ohno *et al.* 2000).

Asetilkolin, kolinasetiltransferaz (ChAT) tarafından katalizlenen bir reaksiyon sonucu asetilkoenzim A'dan gelen asetil ile kolinin birleştirilmesi sonucu oluşan (Şekil 1.5) tanımlanmış ilk nörotransmitterdir. Bu reaksiyon ile meydana gelen asetilkolin, nöron gövdesinden akson terminali üzerinden sinir uçlarına kadar taşınır ve sonrasında sinaptik alana salınır (Čolović *et al.* 2013).



Şekil 1.5. Asetilkolin sentezini gösteren reaksiyon (Soderberg 2012)

Tüm sinir hücresi terminal proteinlerinde olduğu gibi ChAT da vücuttaki kolinerjik sinir hücrelerinde üretildikten sonra akson üzerinden sinir sonlanmasına transfer edilir. ChAT ve ACh bir nöronun her bölgesinde bulunabilir fakat en yoğun oldukları yer akson terminalidir. Kolinerjik nöron saptamada ChAT bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Ichikawa *et al.* 1997).

ACh sentezindeki tek kısıtlama kolin ve asetil-KoA'ya ulaşımıdır. Nöral aktivitenin artış gösterdiği durumlarda mitokondri kaynaklı asetil-KoA miktarında yükselme görülür. Aynı şekilde sinaptik boşluktan kolin alınımı da doğru orantılı olarak artış gösterir. Her iki durumda da Ca^{2+} düzenleyici bir etki gösterir. ACh döngüsünden elde edilen bu kolinin yarısından fazlası yeni ACh yapımında kullanılır. ACh sentezinde kullanılan bir diğer kolin kaynağı fosfolipidlerin yıkımından elde edilen fosfatidilkolindir. Bu sentez mekanizması göz önüne alındığında ACh miktarının arttırılması için diyetle kolin alınımı alternatif bir strateji olarak görülmektedir. Fakat merkezi sinir sisteminde alınan koline ulaşım arttırılamadığı için bu yaklaşım etkili sonuçlar verememektedir (Weihe *et al.* 1996).

Sentezlenen ACh'nin büyük bölümü sinir sonlanmalarında şeffaf veziküller içerisine paketlenir. Çok küçük bir kısmı sitozolde serbest olarak bulunmaktadır. Vezikül bağlı ACh asetilkolinesteraz enzimi için ulaşılamaz bir substrattır. ACh'nin vezikül içeresine alınması enerji bağımlı bir mekanizma sonucu vezikülün asidikleştirilmesiyle gerçekleşir. Karşılıklı H^+ ve ACh değişimi vezikülün devamlı olarak izoozmotik ve elektronötral kompozisyonunu korumasını sağlar. Asidik yapı daha sonra ACh molekülleri için proton değişiminde veziküler ACh taşıyıcı (vAChT) olarak kullanılır (Şekil 1.6). vAChT geni kolinasetiltransferaz geninin birinci intronunda yer almaktadır. Bu durum üretimden sorumlu enzimle elde edilen ürünün paketlenmesinin bir korelasyon içerisinde olduğunu da doğrulamaktadır (Erickson and Varoqui 2010).

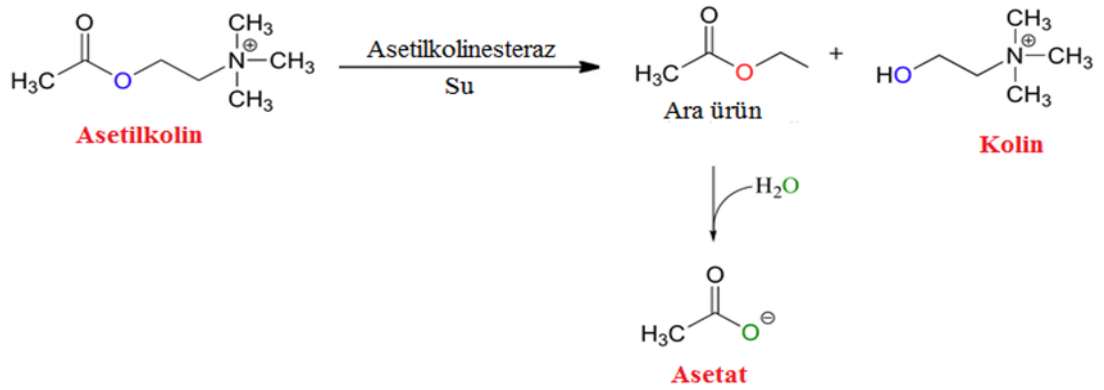
yönden etkilenebilirler. Bunların yanı sıra pH, sıcaklık gibi parametreler de enzim aktivitesine etki gösteren önemli unsurlar olarak gösterilmektedir. Enzimler, katalizleme özelliği gösterdikleri reaksiyon mekanizmalarına ve tiplerine göre altı temel sınıfa ayrılırlar (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması (Keha and Küfrevioğlu 2012)

Enzim Grubu	Katalizlediği Reaksiyon	Örnek
Oksidoredüktazlar	Hidrojen ve oksijen atomunu veya bir elektronu bir substrattan bir diğerine taşırlar.	Dehidrogenazlar Oksidazlar
Transferazlar	Spesifik bir gurubu (fosfat, metil vs) bir substrattan diğerine taşırlar.	Transaminazlar Kinazlar
Hidrolazlar	Substratı hidroliz ederler	Esterazlar
İzomerazlar	Substratın molekül formunu değiştirirler.	Fosfohekzo izomeraz Fumaraz
Liyazlar	Bir grubu eklerken veya çıkarırken hidroliz etmeden taşırlar.	Dekarboksilazlar Aldolazlar
Ligazlar (sentetazlar)	Yeni bağlar aracılığı ile iki molekülün birleşmesini katalizlerler.	Sitrikasit sentetaz

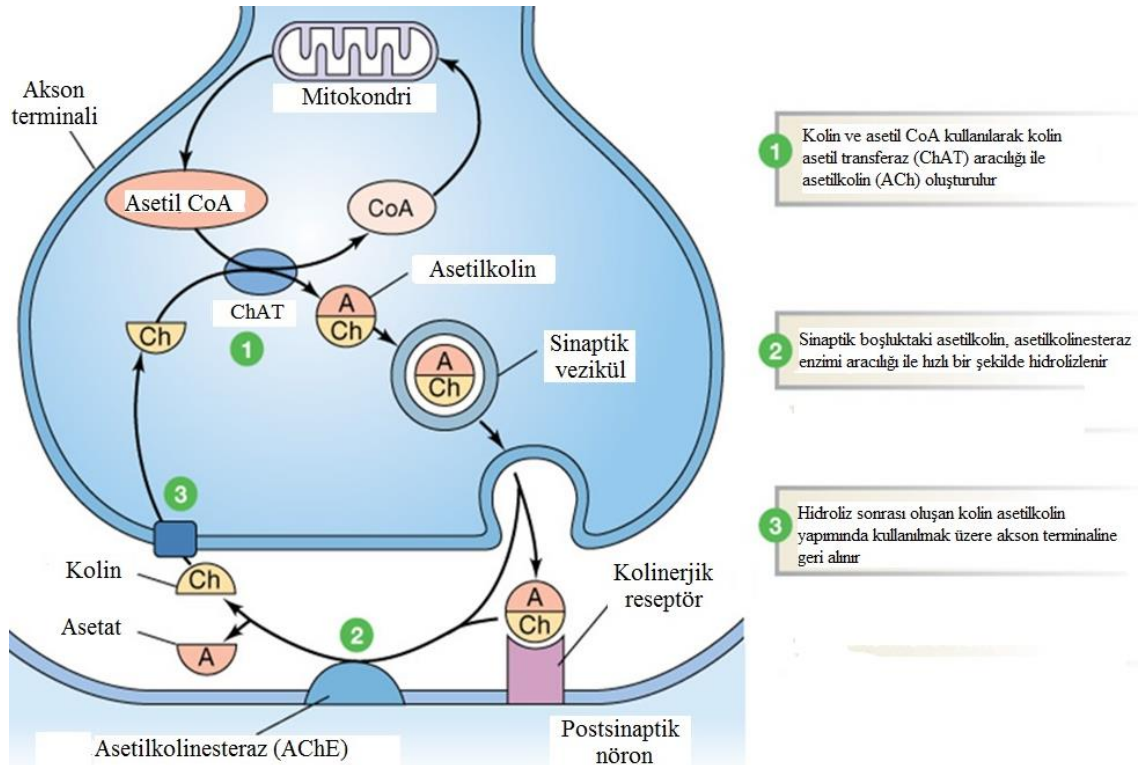
1.7. Asetilkolinesteraz Enzimi

Asetilkolinin keşfi, kendisinin hemen ardından bu molekülün hidrolizinden sorumlu enzim olan asetilkolinesterazın (E.C.3.1.1.7) keşfini de beraberinde getirmiştir. Sağlıklı bir kolinerjik iletim, sinaptik boşluğa salınan asetilkolinin kolinesteraz enzimi tarafından hızlı bir şekilde hidroliz edilmesi sonucu sonlandırılmasına bağlıdır (Zimmerman and Soreq 2006). Bu degradasyon sonucu oluşan kolin daha sonra yapılacak olan asetilkolin sentezinde kullanılmak üzere presnaptik nörona geri alınır (Şekil 1.7). En önemli kolin kaynağı bu reaksiyon sonucu elde edilen kolindir (Freeman and Jenden 1976).



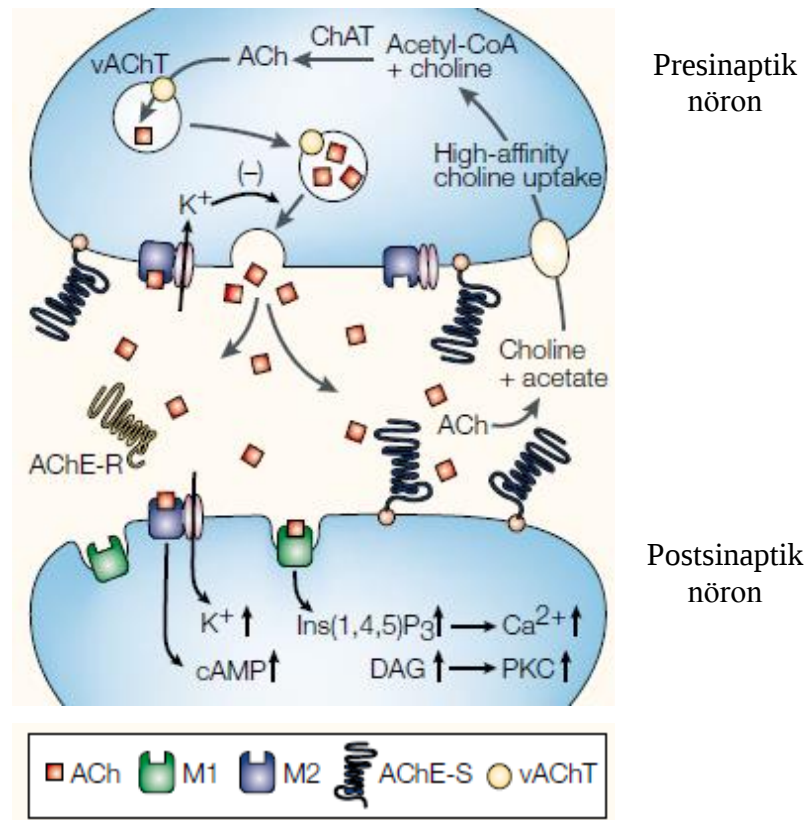
Şekil 1.7. Asetilkolinin asetilkolinesteraz aracılığıyla asetat ve koline hidrolizlenmesini gösteren reaksiyon (Soderberg 2012).

Presinaptik nöronda ChAT tarafından sentezlenen ACh, AChE tarafından hidroliz edilerek sinaps aralığındaki aracı molekül konsantrasyonunun regülasyonu sağlanmış olur (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. ACh'nin sentez, salınım, inaktivasyon ve presinaptik nörona geri alınım işlemleri (Knowles 2003)

Normal koşullarda ACh, veziküler ACh taşıyıcı (vAChT) tarafından paketlenmiş halde bulunur (Şekil 1.9). Aksiyon potansiyeli mevcut ACh'in sinaptik boşluğa salınmasını tetikler. Bunun neticesinde ACh pre ve postsinaptik membran üzerinde yerleşim gösteren muskarinik reseptörlere bağlanır. Presinaptik membranda bulunan muskarinik M2 reseptörü negatif geri besleme cevabı aracılığı ile ACh salınımını düzenler. Postsinaptik alanda ise M1 reseptörleri yer almaktadır. M1 reseptörleri, diaçilgliserol (DAG), inozitol-1,4,5- trifosfat (Ins(1,4,5)P3) ve Ca^{2+} bağımlı protein kinaz (PKC)'ın dahil olduğu bir yolak ile sinyal trafiğine katkı sağlar. ACh, sinaptik boşlukta AChE-S (sinaptik form) tarafından hidroliz edilir. Bu degradasyon sonucu oluşan ürünlerden kolin daha önce de belirtildiği gibi koline yüksek derecede afinitesi bulunan bir mekanizma ile presinaptik nörona geri kazandırılır (Soreq and Seidman 2001).



Şekil 1.9. Sinaptik alandaki ACh sentez ve transfer mekanizması (Soreq and Seidman 2001)

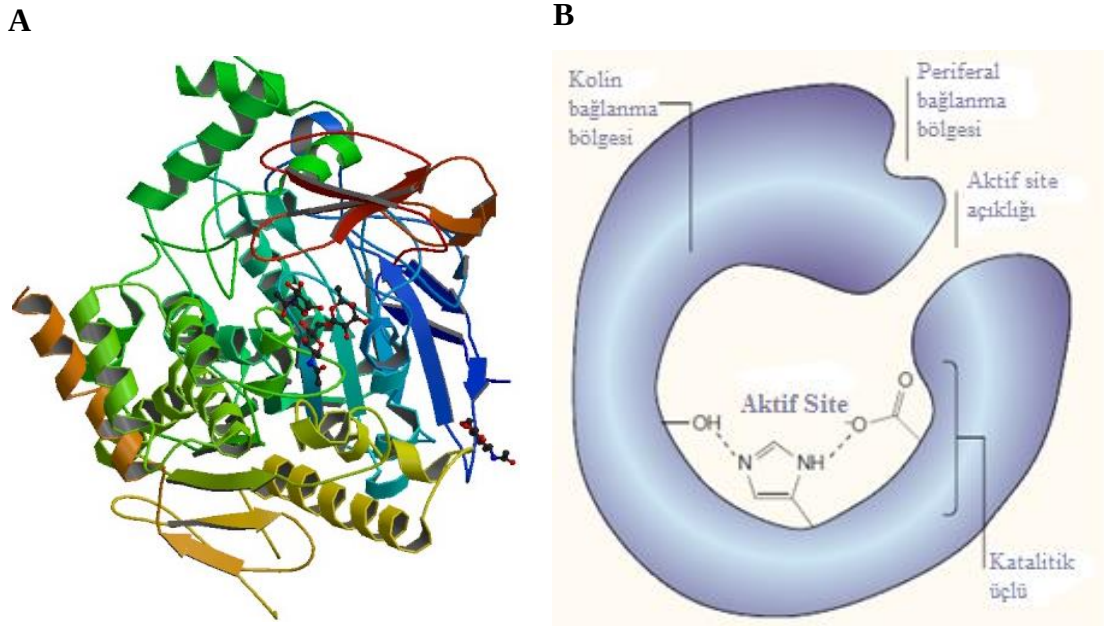
AChE, serin hidrolaz süper ailesine dahil bir enzimdir (Çizelge 1.2). Bu enzim ailesi, insan proteomundaki genlerin %1'ini yani yaklaşık 200 enzimi kapsayan bir büyüklüktedir. Bu grubun en önemli karakteristiği; substratların hidrolizi için kullanılan nükleofilik serine sahip bir aktif site bulundurmalarıdır. Diğer nonkatalitik serinlerin aksine bu hidrolazların nükleofilik serini bir asidik (aspartat veya glutamat) veya bazik (genellikle histidin) kalıntı içeren proton çarkı ile aktive edilir (Simon and Cravatt 2010).

Çizelge 1.2. Serin hidrolaz süper ailesi içerisinde bulunan bazı enzim grupları (Long and Cravatt 2011)

Enzim grubu	Örnek
Serin proteazlar	Tripsin, kimotripsin ve subtilisin
Ekstraselüler lipazlar	Pankreatik lipaz, gastrik lipaz, hepatik lipaz, endotelial lipaz ve lipoprotein lipaz
İntraselüler lipazlar	Hormon duyarlı lipaz, monoasilgliserol lipaz, adipoz trigliserid lipaz ve diaçilgliserol lipaz
Kolinesterazlar	Asetilkolinesteraz, bütilkolinesteraz
Küçük moleküllü tioesterazlar	Yağ asit sentaz ve açıl-KoA tioesteraz
Bazı fosfolipazlar	Fosfolipaz A2 ve trombosit aktive edici faktör asetilhidrolaz
Protein ve glikan hidrolazlar	Protein fosfat metilesteraz 1, açiloksiaçil dihidrolaz ve sialik asit asetilesteraz
Bazı amidazlar	Yağ asit amid hidrolaz
Bazı peptidazlar	Dipeptidil peptidaz 4, fibroblast aktivasyon protein ve prolilendopeptidaz

AChE, oldukça yüksek seviyede katalitik aktiviteye (saniyede 25000 ACh molekülü) sahip bir enzimdir (Taylor and Radic 1994). Enzimin aktif sitesi anyonik ve katyonik olmak üzere iki temel bölümden meydana gelmektedir (Sussman *et al.* 1991).

AChE, periferik ve aktif olmak üzere iki temel bağlanma bölgesine sahip bir enzimdir. Aktif ve katalitik özelliği yönüyle kendisine has özel bir yapısı vardır. Enzimin aktif bölgesi dar bir oluk yapısının dip kısmında yer alır (Şekil 1.10). Aktif bölge de anyonik (negatif) bölge ve katalitik kısmı içeren katalitik üçlü (esteratik-Ser203, Glu334 ve His447) bölge olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir. Katalitik bölge ile enzim substratın açıl bölgesine geçici bir afinite gösterir. Tüm AChE’larda bulunan bir diğer bölge ise aktif çukurun girişinde konumlanan periferik anyonik bölgedir (PAS). Substrat bağlayıcı özellikteki bu bölge enzimin hem pek çok inhibitör ile etkileşimine hem de katalitik etkinliğin düzenlenmesine aracılık eder (Grisaru *et al.* 1999; Talesa 2001).



Şekil 1.10. AChE enzimine ait şematik çizimler

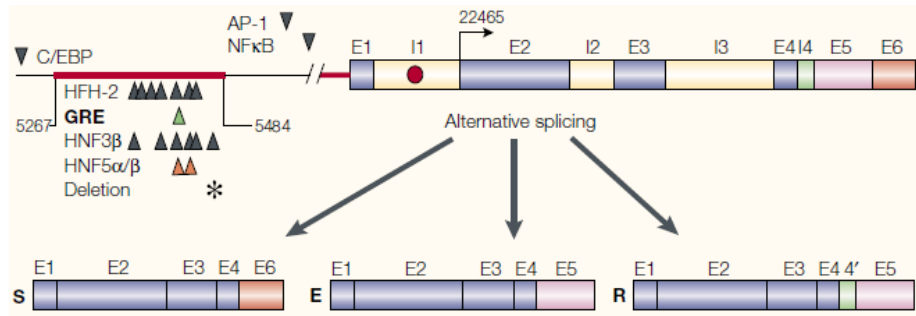
*üç boyutlu yapı (A), bazı yapısal bölgeler (B) (Soreq and Seidman 2001)

AChE, bu yapısal özelliğinden dolayı birçok farklı aktiviteye sahiptir. Enzimin çoklu aktivite fikri önceleri net ve açık bir şekilde bilinmemekteyken canlıların farklı gelişim evrelerine ait farklı hücre tiplerinde görülmesi bu fikri desteklemiştir (Fitzpatrick-McElligott and Stent 1981). Farklı karakterde işlev göstermesinin en önemli nedenlerin bir tanesi de enzimi kodlayan genin farklı mRNA işlenme sürecine maruz kalması ve translasyon sonrası geçirdiği modifikasyonlardır. Bu değişik işlemlerden dolayı

AChE'in bilinen üç formu meydana gelmektedir. AChE_T (tail) beyin, kas ve diğer dokularda bulunan başlıca formdur. AChE_H (hidrofobik) özellikle eritroit dokularda bulunur. Kesilebilir bir hidrofobik peptidi içerir. AChE_R, *Torpedo* sp. ve farelerde bulunan formdur. Stres cevabı ve inflamasyonda rol aldığı düşünülmektedir (Massoulie *et al.* 2008).

Asetilkolinesteraz enziminin farklı özelliklerde aktivite göstermesi doku/hücre farklılığı, canlının bulunduğu ortamdan kaynaklanan etkiler veya canlının fizyolojik durumu gibi etkenlere karşı oluşturulan metabolik cevaptan dolayı transkripsiyonel, transkripsiyon sonrası, translasyonel ve translasyon sonrası düzeylerde farklı şekillerde düzenlenmesinden de kaynaklanmaktadır. Moleküler mekanizmasının bilinmesine rağmen enzimin bir dokudaki miktarı, alternatif izoformlarının dağılımı, hücre içi dağılımı, glikolizasyon ve proteolitik işlenmesi gibi olayların nasıl bir düzenlemeye maruz kaldığı tam olarak bilinmemektedir (Velan *et al.* 1993). AChE'ye ait pre-mRNA'nın (Şekil 1.11) sekansiyel sıplaysı ile 5' ve 3' ucundaki düzenlemeler doku veya hücre tipine göre hızlı bir fizyolojik düzenleme cevabı oluşmasında oldukça önemlidir. Enzimin transkripsiyonel çeşitliliği proksimal promoter (Li *et al.* 1993; Atanasova *et al.* 1999) ve birinci intronda yer alan internal enhansıra bağlıdır (Chan *et al.* 1999).

AChE enzimine ait çekirdek bölge üç ekzon ve çeşitli spesifik özelliklere sahip karboksi terminal sekanslarını kodlayan ek bölgelerden oluşmaktadır. Transkripsiyon E1'de başlar. E2 ise olgun proteinin yapısında görünmeyen lider sekansı kodlar. Proksimal promotör (E1'e bitişik kırmızı çizgi) ve distal enhansır bölge (daha uzaktaki kırmızı çizgi) zengin düzenleyici bölgelerdir.



Şekil 1.11. İnsan AChE geninin genel yapısı ve gene ait alternatif RNA'lar (Soreq and Seidman 2001)

AChE ekspresyonu bu moleküler düzenlemelerin yanı sıra hücre farklılaşması (Rotundo 1990), düşük AChE seviyesi (Galyam *et al.* 2001), anti AChE moleküllerine maruziyet (Kaufer *et al.* 1998) ve çeşitli travmatik etkilere de bağlıdır (Nordberg *et al.* 1999).

1.8. SUMO Protein Ekspresyon Sistemi

Rekombinant DNA teknolojisinde yaygın olarak kullanılan plazmitler, DNA klonlama işlemi sırasında vektör olarak kullanımı için temelde üç bölgeye sahip olacak şekilde tasarlanır. Bu üç bölge; replikasyon orijini, seçim için marker gen (direnç geni) ve eksojenik DNA fragmentlerinin insert edilebileceği bölgelerdir.

The Champion™ pET SUMO protein ekspresyon sistemi *E. coli*'de doğal proteinlerin ekspresyon ve ifadesine izin veren küçük ubiquitin benzeri bir modifiye edici (SUMO; small ubiquitin-like modifier) kullanmaktadır. SUMO füzyonları, rekombinant proteinlerin ekspresyonunu ve çözünürlüğünü arttırabilir bir özelliktir.

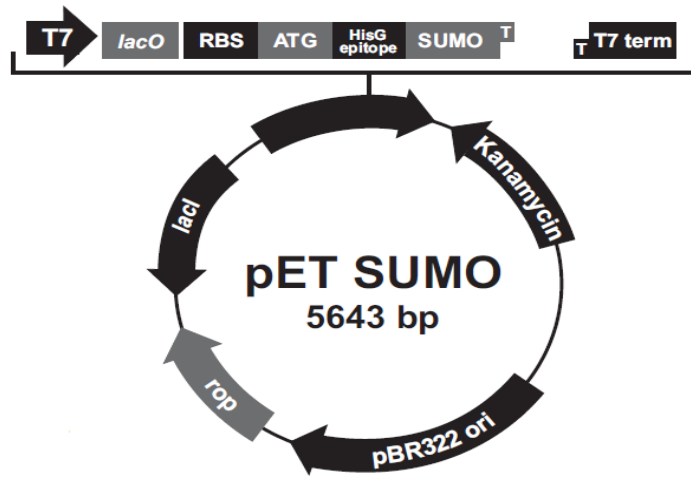
Sistem vektörü olan pET SUMO önemli özelliklere sahip bir vektördür;

- 1. T7lac promotoru:** pET SUMO vektörü IPTG ile indüklendiği zaman sahip olduğu bu bölge sayesinde yüksek miktarda ekspresyon kapasitesine ulaşmaktadır.
- 2. N-Terminal Polihistidin (6xHis) Kuyruğu:** Bu bölge aracılığı ile elde edilen protein kolay bir şekilde saflaştırılabilmektedir.

3. TA Klonlama Sitesi: Bu bölge sayesinde amplifiye edilen ve adenin kuyruğu içeren PCR ürünü etkili bir şekilde klonlanabilir.

4. Kanamisin Direnç Bölgesi: Antibiyotik direncinden sorumlu bölge.

5. pBR322 Replikasyon Orijini: Bu replikasyon orijini *E. coli* içerisinde kopyalama ve onarım faaliyetlerinden sorumludur.



Şekil 1.12. pET SUMO vektör haritası

121	ATAGGCGCCA	GCAACGCAC	CTGTGGCGCC	GGTGATGCCG	GCCACGATGC	GTCCGGCGTA	GAGGATCGAG	ATCTCGATCC
201	CGCGAAATTA	ATACGACTCA	CTATAGGGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	CCCCTCTAGA	AATAATTTTG	TTTAACTTTA
281	AGAAGGAGAT	ATACAT	ATG	GGC AGC AGC	CAT CAT CAT CAT CAT CAC	GGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC		
			Met	Gly Ser Ser	His His His His His His	Gly Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser		
354	GCT AGC ATG TCG GAC TCA GAA GTC AAT CAA GAA GCT AAG CCA GAG GTC AAG CCA GAA GTC AAG CCT GAG ACT							
	Ala Ser Met Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr							
426	CAC ATC AAT TTA AAG GTG TCC GAT GGA TCT TCA GAG ATC TTC TTC AAG ATC AAA AAG ACC ACT CCT TTA AGA							
	His Ile Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Lys Thr Thr Pro Leu Arg							
498	AGG CTG ATG GAA GCG TTC GCT AAA AGA CAG GGT AAG GAA ATG GAC TCC TTA AGA TTC TTG TAC GAC GGT ATT							
	Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile							
570	AGA ATT CAA GCT GAT CAG ACC CCT GAA GAT TTG GAC ATG GAG GAT AAC GAT ATT ATT GAG GCT CAC AGA GAA							
	Arg Ile Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile Ile Glu Ala His Arg Glu							
642	CAG ATT GGT GGT	PCR product	AGACAAG	CTTAGGTATT	TATTGCGCGC	AAAGTGCCTC	GGGTGATGCT	
	GTC TAA CCA CCA		TCTGTTC	GAATCCATAA				
	Gln Ile Gly Gly							
701	GCCAACTTAG	TCGAGACCA	CCACCACCAC	CACTGAGATC	CGGCTGCTAA	CAAAGCCCGA	AAGGAAGCTG	AGTTGGCTGC
781	TGCCACCGCT	GAGCAATAAC	TAGCATAACC					

Şekil 1.13. pET SUMO vektörüne ait TA klonlama sitesi

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Canlıda meydana gelen DNA hasarının giderilmesi genom stabilitesinin sağlanması için anahtar faktördür. Bu mekanizmalar normal bir hücre döngüsünü kontrol altında tutarak hücresel dengenin devamlılığını sürdürür. Dolayısıyla bir hücre için sağlıklı gelişme, büyüme ve farklılaşma seyri bu mekanizmalara bağlıdır. Hücre döngüsü düzenlenmesi, tamir yolları, hücresel metabolizma ve programlı hücre ölümü bu DNA onarım mekanizmalardaki sorunlarla doğrudan ilişkilidir (Rothkamm *et al.* 2003; Brnzei and Foiani 2008).

Sinir hücrelerinin organizmanın hayat döngüsü süresince yenilenemeyen bir karakteri olduğu düşünüldüğünde hasar defans mekanizmalarının ne denli önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Sağlıklı bir sinir hücresinde meydana gelen genetik onarım kusurları tolere edilebilir bir seviyeyi geçtiği takdirde söz konusu hücrelerde zamanla artan bir fonksiyon kaybı oluşacaktır. Bu işlevsel eksiklik hücrenin tamamen iş göremez hale gelmesini takiben hücre ölümü ile sonuçlanacaktır. Sinir sisteminde bu şekilde gerçekleşen artan hücre ölümleri nörodejeneratif hastalıkları da birlikte getirecektir (Barzilai 2010).

Birçok nöral hastalığın temelinde genetik mutasyonların olduğu artık açık bir şekilde bilinmektedir. Genel olarak düşünüldüğünde iki tip mutasyon bulunmaktadır. Bunlardan ilki fonksiyon kazandırıcı mutasyonlardır. Bu tip mutasyonlar ilgili proteine sahip olmadığı bir özelliği katabilmesinin yanı sıra var olan aktivitesini de arttırabilmektedir. Fonksiyon kaybına neden olan ikinci grup mutasyonlar ise ilkinin tam tersine ilgili proteinin mevcut aktivitesini düşürebilir veya tamamen işlev göremez hale getirebilmektedir. Poligulitamin hastalıklarında meydana gelen ekstra glutamin kalıntıları ilgili proteinin toksik özellik göstermesine neden olur. Meydana gelen bu olumsuz gelişmeler hastalıkla direkt veya indirekt ilgili proteinlerin katlanmasına, önemli yollarla, hücresel organizasyona ve hücreler arası etkileşime olumsuz yönde etki ederler (Thompson 2008).

Kalıtsal Alzheimer vakalarında PSEN1 için 160, PSEN2 için 10 mutasyon tespit edilmiştir. Hastalık için bilinen bir diğer gen olan APP'de de yine birçok mutasyon tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar gerek proteazlarda gerekse de bu enzimlerin işlev gösterdiği substratlarda meydana gelebilen mutasyonların Alzheimer hastalığı için öne sürülen amiloid hipotezini doğrular nitelikteki bulgularla sonuçlanmıştır (Hardy and Selkoe 2002).

Presenilinler, farklı proteinlerle bir araya gelerek membran proteinlerinin proteolizinde rol alan sekretazların yapısında yer alırlar. Bu nedenle presenilinlerin özgünlüğünün ve düzenlenmesinin bilinmesi Alzheimer gibi birçok hastalığa karşı tedavi yöntemi geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir. Presenilin/ γ -sekretaz kesimi birçok proteinin transmembran domeininin işlenmesi için özgün bir reaksiyondur (Wakabayashi and De Strooper 2008).

Kolinerjik sistem beyindeki en önemli düzenleyici nörotransmitter sistem olup bilinç ve dikkat gibi kritik aktiviteleri kontrol eder. Sinir hücrelerinin uç kısımlarında bulunan muskarinik asitlerin antagonist ilaçlarla engellenmesi bireylerde halüsinasyon seviyesini arttırmış dikkat seviyesini ise düşürmüştür. Benzer şekilde yapılan çalışmalar göstermiştir ki; beyinde meydana gelen dejeneratif hastalıklarda bilinç olgusundaki değişiklikler kolinerjik sistemdeki bölgesel bozukluklarla doğrudan ilişkilidir (E. Perry *et al.* 1999).

Rekombinat proteinler özellikle son 20-30 yıldır tedavi uygulamalarında artan bir ilgiye maruz kalmakta olup hâlihazırda birçok protein klinik düzeyde kullanılmaktadır (Matasci *et al.* 2008). Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından verilen bilgilere göre bu amaçla kullanılmakta olan 150'nin üzerinde rekombinant terapötik mevcut olup yine yüzlercesi daha geliştirilme seviyesindedir. Böylesi ürünlere ait ticari pazar gün geçtikçe genişleyen bir ekonomik hacime sahiptir (Matasci *et al.* 2008).

Rekombinant terapötikler mikrobiyal sistemler, hayvan ve bitkisel konaklar kullanılarak elde edilebilmektedir. Mikrobiyal sistemler düşük maliyet tablosunun yanı sıra hızlı ve

verim yüzdesi yüksek ürün verebilme kapasitesine sahip olduğundan dolayı diğer araçlara göre bu noktada bir adım öne çıkmaktadır. Bunlara ek olarak mikrobiyal sistemlerin bulaşıcı viral endişesi taşımaması otoriteler tarafından bu amaç için önerilen en uygun konaklar olarak kabul edilmektedir (Picanco-Castro *et al.* 2013).

Protein yapıdaki terapötikler günümüzde medikal tedavi için kullanılmakta olup tercih edilme sıklığı hızlı bir biçimde artmaktadır. Bu amaç için üretilen ilk protein olan insan insülininden sonra konu hakkında bilgi birikimi sürekli olarak artış gösterip kendini yenilemektedir. Tüm bu gelişmelere ve kullanım sıklığının fazla olmuş olmasına rağmen protein terapötiklerinin asıl amacına tam olarak ulaşmadığı ve şu an hala emekle aşamasında olduğu savunulmaktadır (Leader *et al.* 2008).

Asetilkolinesteraz, sinaps aralığında bulunan asetilkolini hidroliz ederek sinir iletimini sonlandıran enzim olarak bilinmektedir (Brown *et al.* 1981). Bu özelliğinin açığa çıkarılmasından sonra özellikle Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılması yönünde birçok görüş bildirilmiş ve bu hipotezi destekleyici sonuçlar elde edilmiştir. AChE'nin farmakolojik inhibitörleri kullanılarak asetilkolin aracılı sinir iletiminin kontrol edilmesi önemli bir yaklaşımdır. Örneğin Alzheimer hastalığında beyindeki kolinerjik sinir hücrelerinin kaybı bilinen bir patolojidir. Böylesi hücre kayıpları doğal olarak sinaps aralığındaki asetilkolin miktarının azalmasına neden olacaktır. Bu durumda ortamdaki AChE enzimi inhibe edilebilir veya aktivitesi normale göre daha düşük bir düzeye indirilebilirse mevcut asetilkolin molekülleri daha az parçalanacak ve dolayısıyla asetilkolin konsantrasyonu göreceli olarak daha fazla seviyede tutulacaktır (Soreq and Seidman 2001).

Asetilkolinesteraz enzimi ilk kez elektrik balığı *Torpedo marmorata*'nın bu enzimi olağanüstü konsantrasyonda (200.000 molekül/vezikül) bulunduran elektrik organından ekstraksiyon yöntemi ile izole edilmiştir (Nachmansohn 1939). AChE'a ait birçok özellik elektrikli yılan balığı (*Electrophorus electricus*)'ndan saflaştırılan enzim üzerinde yapılan çalışmalar sonucu keşfedilmiştir (Lawler 1961). Enzimin

saflaştırılmasında afinite kromatografisi kullanıldığında en etkili saflaştırılmanın yapılabileceği görülmüştür (Cuatrecasas *et al.* 1968).

Kolinerjik tedavi stratejisi üzerine farklı çalışma grupları tarafından *in vitro* ortamda enzime karşı ilaç ve inhibitör araştırmaları yapılmıştır. İlgili çalışmalarda model olarak çoklukla insan rekombinant asetilkolinesteraz (hAChE) ve insan rekombinant bütilkolinesteraz (hbAChE) kullanılmıştır (Singh *et al.* 2013).

Farklı amaçlar için insan (Velan *et al.* 1991), sıçan (Legay *et al.* 1993; Coussen *et al.* 1995) ve fare (Vellom *et al.* 1993) gibi değişik canlı türlerine ait asetilkolinesteraz enzimi rekombinant olarak elde edilmiştir. Çalışmaların başlıca hedefleri yapısal analiz (Kronman *et al.* 1992), proteinin olgunlaşması sürecinde meydana gelen translasyon sonrası düzenlemeler (Coussen *et al.* 1995), AChE'nin diğer kolinesterazlardan farklı olan substrat ilişkisinin açıklanması (Vellom *et al.* 1993) gibi enzime ait değişik görevlerin açığa kavuşturulması ve bunların nedenleri üzerine olmuştur. Bu çalışmalarda enzim memeli hücre hatlarından (Lazar *et al.* 1993) bitkilere (Yamamoto *et al.* 2009) kadar birçok farklı konakta başarı ile üretilmiştir.

Mevcut çalışmada ise literatür taramaları göz önünde bulundurularak insan beyin dokusuna ait asetilkolinesteraz enziminin rekombinant DNA yöntemleri aracılığı ile hızlı ve etkili bir yöntem denenerek prokaryotik bir konakta üretilmesi, saflaştırılması ve daha sonrasında ise biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan alet, cihaz, kimyasal ve çözeltiler

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar

Cihaz	Marka / Model
Saf su cihazı	mpMiniPure DestUp
Otoklav	Hırayama Hiclave Autoclave
İnkübatör	Binder Red Line
PCR cihazı	Bio Rad C-1000 Thermal Cycler
Çalkalamalı inkübatör	Edmund Bühler GmbH KS-15
Çalkalamalı inkübatör	Zhicheng ZHWY 200D
Elektroforez tankı (yatay)	Thermo EC 135-90
Elektroforez tankı (dikey)	BioRad Mini Protean
Semi-Dry Blotlama Cihazı	BioRad Trans-Blot SD
UV görüntüleme cihazı	Vilber Lourmat Quantum
Mikrodalga Fırın	Beko MD-1500
Isı Blokları	Lab-Line, VWR Digital Heatblock
Steril Kabin	WCS Class II Type Biosafety Cabinet
Çeker ocak	WCS Space Series Fume Cupboard
Soğutmalı santrifüj	Hettich Mikro 220R
Soğutmalı santrifüj	Hettich Mikro 22R
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU-730
pH metre	Schott pH-Meter CG840
Hassas terazi	Denver Instrument
Karıştırıcı (Vorteks)	Fisonswhirli-mixer

Çizelge 3.1. (devam)

Karıştırıcı (Dikey)	Hybaid Midi Dual 14
Otomatik pipetler	Eppendorf
Otomatik pipetler	Eppendorf
Güç kaynağı	BioRad PowerPac HV
Çalkalayıcı	Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	Chilten Hotplate Magmetic Stirrer
Kar makinesi	Scotsman AF-20
Buzdolapları (+4°C'ye kadar)	Arçelik, Bosch
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	Uğur UDD 400 BK
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	Glacier Ultralow Freezer's

Çizelge 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Marka
İnsan beyin cDNA	Invitrogen
pET SUMO protein ekspresyonu kiti	Invitrogen
Primer	Metabion
T4 DNA ligaz	Promega
N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin	Sigma-Aldrich
Ditiyoeritrol	Sigma-Aldrich
Standart serum albümin	Sigma-Aldrich
İmidazol	Sigma-Aldrich
Taq DNA polimeraz	Sigma-Aldrich
dNTP	Sigma-Aldrich
Kanamisin	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit	Merck
Trihidroksimetilaminometan	Merck
Glisin	Merck
Etanol	Sigma-Aldrich
Gliserin	Sigma-Aldrich
Sodyum dodesil sülfat	Sigma-Aldrich

Çizelge 3.2 (devam)

Amonyum persülfat	Sigma-Aldrich
β -merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
100 bp DNA marker	Invitrogen
100 bp plus DNA marker	Thermo Fisher
10X jel yükleme boyası	Invitrogen
PageRuler Prestained protein marker	Thermo Fisher
Luria bertani broth	Sigma-Aldrich
IPTG	Promega
GenElute jel ekstraksiyon kiti	Sigma-Aldrich
GeneJet plazmit izolasyon kiti	Thermo Fisher
Ni NTA reçine	Thermo Fisher
Amicon filtre	Millipore
Coomassie brilliant blue g250	Sigma-Aldrich
DTNB	Sigma-Aldrich
AChI	Sigma-Aldrich
PVDF membran	Bio-Rad
SuperSignal Femto	Thermo Fisher
SuperSignal Pico	Thermo Fisher
HisG fare antikor	Invitrogen

Çizelge 3.3. Tez kapsamında kullanılan tampon ve çözeltiler

LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri (pH:7, 1000 ml)	Boş bir otoklav şişesine %1 tiription, %0,5 maya ekstraktı ve %1 NaCl tartıldı. Bu karışım 950 ml saf suda çözdürüldü. pH 7'ye ayarlanıp son hacim 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlandı. Eğer antibiyotik katılması gerekiyorsa otoklav sonrası 55°C'ye soğuyunca kadar beklenip antibiyotik eklendikten sonra +4°C'de karanlıkta saklandı. Eğer katı besiyeri isteniyorsa aynı besiyerine 15g/L olacak şekilde agar katıldı.
---	--

Çizelge 3.3 (devam)

Antibiyotikli katı LB besiyerleri	Daha önce anlatıldığı gibi sıvı ortamdan farklı olarak içerisinde agar bulunan besiyeri otoklavlandı. Sıcaklık 40°C civarına düşmesi ile pET-SUMO vektörün kullanım protokolüne uygun olarak ortama 50 µg/ml kanamisin eklendi. 85 mm'lik petri kaplarına 20-25 ml'lik katı besiyerinden döküldü. Agar sertleşinceye kadar beklenildi ve daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de bir ay saklandı.
IPTG stok çözeltisi (50 mM)	0,6 g IPTG alınarak, son hacim 50 ml olacak şekilde üzerine steril saf su ilave edildi. 0.2 µm'lik filtre ile steril edildikten sonra alüminyum folyoya sarılıp +4°C'de saklandı.
Kanamisin stok çözeltisi (1 mg/ml)	10 mg kanamisin alınarak 10 ml steril saf suda çözüldü. 0.2 µm'lik filtre ile steril edildikten sonra alüminyum folyoya sarılıp +4°C'de saklandı.
%10'luk amonyum persülfat	1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.
%10'luk SDS	1 g SDS 9 g suda çözülerek elde edildi.
%30 Akrilamid - %0,8 Bisakrilamid	15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.
2X SDS-PAGE Numune Tamponu	0.5 M Tris-HCl (pH:6.8), gliserol, β-merkaptoetanol, bromfenol blue ve SDS karıştırılıp steril su ile son hacim 10 ml'ye tamamlanır. Alikuatlara bölünüp -20°C'de muhafaza edilir.
1X SDS-PAGE Numune Tamponu	2X numune tamponundan sadece konsantrasyon olarak farklılık gösterir. Aynı şekilde hazırlanıp muhafaza edilir.
Yürütme tamponu	1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü; %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.

Çizelge 3.3 (devam)

SDS-PAGE İçin Ayırma Jeli	15 mL Tris-HCl (pH 8,8), 13,2 mL %30'luk akrilamid- %0,8'lik bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin) ve 9,4 mL su karıştırılır. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'lik amonyum persülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ ilave edilir.
SDS-PAGE İçin Yığma Jeli	1 M'lik Tris-HCl'den 1,24 mL, %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %0,1'lik SDS'den 0,1 ml, %5'lik TEMED'den 0,1 ml ve sudan 7,8 ml alınarak karıştırılır. Son olarak yine günlük hazırlanmış, %1,5'lik PER'den 0,2 ml ilave edilir.
Sabitleştirme çözeltisi	%50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
Jel boyama çözeltisi	50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı
Jel yıkama çözeltisi	50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi.
Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1 L'ye tamamlandı.
3 M imidazol çözeltisi	20,42 g imidazol, 2,93 g NaCl, 0,24 g NaH_2PO_4 alınıp 80 ml saf suda çözüldü. pH 6,0 a ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı. İmidazol bileşiğinin çözünmesi zor olduğundan 40-50°C'de ısıtıldı.
5XDoğal Saflaştırma Tamponu	7 g NaH_2PO_4 ve 29,2 g NaCl 180 ml deiyonize suya ilave edilir, pH'sı 8'e ayarlanır. Son hacim 200 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanır.
1XDoğal Saflaştırma Tamponu	5X Doğal Saflaştırma Tamponundan 20 ml alınarak son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Çizelge 3.3 (devam)

Doğal Bağlanma Tamponu	30 ml 1X doğal saflaştırma tamponu bağlanma tamponu olarak kullanılır.
Doğal Yıkama Tamponu	50 ml 1x doğal saflaştırma tamponuna 335 µl 3 M imidazol (pH 6) ilave edilerek pH'sı 8'e ayarlanır.
Doğal Elüsyon Tamponu:	13,75 ml 1x doğal saflaştırma tamponuna 1,25 ml 3 M imidazol (pH 6) ilave edilerek pH'sı 8'e ayarlanır.
Sodyum Fosfat Tamponu (1M, pH 8, 100 ml)	93,2 ml 1 M Na_2HPO_4 ile 6,8 ml 1 M NaH_2PO_4 karıştırıldıktan sonra otoklavlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi. Farklı pH ve konsantrasyonlar bu stoktan hazırlandı.
TrisHCl Tamponu (1M, pH 8, 100 ml)	12.1 gr Tris tartılıp yaklaşık 80 ml saf suda çözündürüldü. Üzerine yaklaşık 4-4,5 ml HCl eklendikten sonra pH kontrol edilip son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi. Farklı pH ve konsantrasyonlar bu stoktan hazırlandı.
GlisinNaOH Tamponu (1M, pH 10, 100 ml)	7,5 gr glisin yaklaşık 80 ml saf suda çözündürüldü. Konsantre NaOH ile pH ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi. Farklı pH ve konsantrasyonlar bu stoktan hazırlandı.
10 mM Asetiltiyokolin iyodat (AChI)	0,058 g asetiltiyokolin iyodat tartılıp saf suyla 20 ml'ye tamamlanır.
0,5 mM DTNB	0,004 g DTNB ve 0,2 g sodyum sitrat tartılıp saf suyla 20 ml'ye tamamlanır.
10X Transfer Çözeltisi	29 g Glisin, 58 g Tris, 3,7 g SDS 900 ml destile su içerisinde çözülür ve pH 8,3'e ayarlanır.
10X TBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris 900 ml destile su içerisinde çözülür. 1M HCl ile pH 7,4'e ayarlanır ve toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlanır. Otoklav edildikten sonra kullanıma hazır hale gelir.
10x Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisi	30,2 g Tris, 188 g Glisin, 100 ml %10 SDS 1 litre destile su içerisinde çözülür.

Çizelge 3.3 (devam)

5X SDS Yükleme Çözeltisi	2,5 ml Tris/HCl çözeltisi, 0,771 g DDT, 0,05 g brom fenol mavisi, 5 ml %50 gliserol, 1 g SDS alınır ve toplam hacim destile su ile 10 ml'ye tamamlanır. Alikuatlara ayrılır ve -20°C'de saklanır.
TBST	10x TBS'den 100 ml alınır ve 900 ml destile su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra 1 ml Tween-20 ilave edilir
1XTAE tamponu	40 mM Tris, 5 mM sodyum asetat, 1 mM EDTA (pH=8,0) olacak şekilde dH ₂ O kullanılarak 1 litre tampon hazırlandı.
Lizis Tamponu (pH:7.8, 100 ml)	Taze olarak kullanılması daha sağlıklı olacağı için küçük hacimlerde hazırlandı. 50 mM potasyum fosfat, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, %10 gliserol, %0.5 triton X-100 ve 10 mM imidazol 90 ml saf suda çözündürüldü. pH ayarlanıp son hacim 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	12,11 g Tris (0,1mol) tartılarak 80 ml suda çözöldü, pH ayarı 1 M HCl ile yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözöldü, pH ayarı 1 M HCl yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
%1'lik agaroz jel	0,3 gram agaroz tartıldı üzerine 30 ml 1XTAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu eklendi. Kısa bir süre mikrodalga fırın içerisinde ısıtılmaya bırakıldı. Oda sıcaklığında bir süre soğuduktan sonra üzerine son konsantrasyon 5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilip karıştırıldı. Elektroforez tankına dököldükten sonra vakit kaybetmeden taraklar yerleştirilip donmaya bırakıldı.

3.1.2. Test mikroorganizmaları

Çalışmada konak mikroorganizma olarak *E. coli* One Shot® Mach1™-T1^R ve *E. coli* BL21(DE3) One Shot® suşları kullanıldı.

3.1.3. Protein Ürününün cDNA Sekansı

Taşıyıcı moleküle (vektör) aktarılabacak AChE genine ait cDNA sekansı, ticari olarak temin edilen insan beyin cDNA kütüphanesinden dizayn edilen ileri (forward) ve geri (reverse) primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aracılığı ile çoğaltıldı.

3.1.4. T4 DNA ligaz

Proteini kodlayan gen bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak vektöre aktarıldı.

3.1.5. pET SUMO klonlama ve protein ekspresyon sistemi

Protein ürününe ait dizi PCR reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra klonlama ve protein üretimi için ticari olarak temin edilen bu sisteme AT klonlama yolu ile aktarıldı.

3.1.6. Büyütme (besiyeri) ortamları

Ligasyon sonrası elde edilen rekombinant vektör, *E.coli* hücrelerine transforme edildikten sonra bu hücrelerin gelişmesini sağlamak amacıyla kullanıldı. Kullanılan büyütme ortamları, tampon çözeltiler ve ayıraçlara ait hazırlama protokolleri EK 1’de verilmiştir.

3.1.7. Plazmit saflaştırma kiti

Rekombinant vektörü içeren doğru kolonilerden plazmit saflaştırmak için kullanıldı.

3.1.8. Primerler

Çalışmada insan beyin cDNA kütüphanesinden gen bölgesini çoğaltılması ve transformasyondan sonra başarılı kolonilerin seçilmesi amacıyla iki farklı primer kombinasyonu kullanıldı. Bu primerlerden gen bölgesini çoğaltmak için olanı elle dizayn edilirken vektör için kullanılan primerler ise klonlama kiti ile hazır alındı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Gen bölgesinin çoğaltılması

3.2.1.a. Gene ait primerlerin dizayn edilmesi

Gen bölgesi için kullanılan primerler elle online veri tabanları kullanılarak dizayn edilirken, koloni seçiminde kullanılan primerler ise üretici firmadan klonlama kiti ile hazır olarak satın alındı.

AChE genine ait ileri ve geri primerler NCBI (National Center for Biotechnology Information)'da tespit edilen *Human acetylcholinesterase* (Ache), mRNA (Nucleotide-M55040.1) transkriptine ait cDNA sekansına göre dizayn edildi. Rekombinant protein üretimi için kullanılan pET SUMO sisteminde tek bir vektörle hem klonlama hem de üretim yapılabilir. Bu sistemde kesim enzimi kullanılarak gen bölgesinin bir vektörden alınıp diğer vektöre tekrar ligasyonu gibi bir işlem gerekmemektedir. Bu nedenle primerlere kesim bölgesi eklenmesi gibi ekstra bölgeler eklendmedi. Gen bölgesinin başlama ve bitiş sinyallerini içeren kısımlarını kapsayan diziler rasgele seçildi.

Farklı parametreler belirlemediği için seçilen primerler sadece <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> web sayfasında blastlanarak başka bir gene ait diziyi de amplifiye edip edemeyeceği tespit edildi. Seçilen primer dizilerinin sadece hedef gen dizisine spesifik olduğu görüldükten sonra her iki diziye <http://eu.idtdna.com> online veri tabanı kullanılarak Tm sıcaklıklarının birbirlerine yakın olması için baz ekleme çıkarma işlemi yapıldı.

3.2.1.b. AChE genine ait cDNA sekansının çoğaltılması

cDNA sekansının amplifikasyonu için dizayn edilen ileri ve geri primerler kullanılarak ve uygun PCR protokolü uygulanarak AChE genine ait sekans çoğaltıldı. Birçok farklı reaksiyon kombinasyonu ile denemeler yapıldıktan sonra Çizelge 3.4 ile 3.5'te gösterilen ve en iyi sonucun alındığı parametreler kullanıldı.

Çizelge 3.4. AChE geninin amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyon karışımı

PCR Bileşeni	Kullanılan Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	6.1	-
Primer R (10 pmol)	1	0.66 pmol
Primer F (10 pmol)	1	0.66 pmol
Tampon (10X)	1.5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1.3	2.1 mM
dNTP (10 mM)	0.6	0.4 mM
Taq Polimeraz (5 u/µl)	0.5	1 Ünite
cDNA	3	-
Toplam Reaksiyon Hacmi	15 µl	

Çizelge 3.5. AChE geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94°C / 4 dk
Denatürasyon	94°C / 150 sn
Yapışma (Annealing)	66°C / 30 sn
Uzama (Extension)	72°C / 2 dk
Son Uzama	72°C / 5 dk
Bekleme	+4°C / ∞

3.2.2. PCR ürününün agaroz jel elektroforezi ile kalitatif tayini

Bu aşamada %1'lik bir agaroz jeli hazırlandı. Bunun için hazırlanan miktara göre %1 oranında tartılan agaroz gereken miktarda TAE (Tris-acetate-EDTA, pH:8) içerisine alındı. Mikrodalga fırında eritilen bu karışım 35-40°C'ye soğuduğunda son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr (Etidyum bromür) eklenip jel donmaya bırakıldı. Jelin donmasını takiben kuyucuklara 6X yükleme boyası ile karıştırılmış PCR ürünü yüklenip 60-70V'ta markırla birlikte yaklaşık 1 saat yürütüldü.

3.2.3. PCR ürününün jelden ekstraksiyonu

PCR ile amplifiye edilen AChE geni ligasyon öncesinde jelden ekstraksiyonla saflaştırıldı. Bu işlem aşağıdaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirildi. Tüm santifüj basamakları 12000-16000 g'de (11000-13000 rpm) yapıldı. İzolasyon aşamasında GenElute™ Gel Extraction Kit (NK1111, Sigma) izolasyon kiti kullanıldı.

1. Agaroz jelde yürütülen ve UV ışık altında görülen bantlar bant kesme aparatı veya bisturi ile jelden kesildi.
2. Alınan bantların ağırlığı tespit edildi.
3. Her 100 mg jel için 300 µl Gel Solubilization Solution (jel çözme solüsyonu) eklenerek karışım 55°C'de 10 dk inkübe edildi. Her 2-3 dk'da bir vortekslendi.
4. Bağlama kolonu (Gen Elute Binding Column G) 2 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirilerek üzerine 500 µl kolon hazırlama solüsyonu (Column Preparation Solution) eklendi. 1 dk santrifüjlenerek sıvı kısım atıldı.
5. 3. basamaktaki 1 jel hacmi kadar saf izopropanol eklenerek homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı.
6. Karışım 4. basamakta hazırlanan kolona aktarıldı. 1 dk santrifüj edilerek sıvı kısım atıldı.
7. %95-100'lük etanol eklenmiş 700 µl yıkama solüsyonu (Wash Solution Concantre G) kolona eklenerek 1dk santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırılıp kolon tekrar yerleştirilerek ekleme yapılmadan 1 dk santrifüjlendi.

8. Kolon yeni bir tüpe konarak merkezine 50 µl elüsyon tamponu (Elution Buffer) eklendi ve 1 dk bekledikten sonra 1 dk santrifüj yapıldı. Alınan son elüsyon içerisinde PCR ürününün olup olmadığı agaroz jel elektroforezi yapılarak tespit edildi.

3.2.4. Rekombinant vektörün elde edilmesi

AChE enziminin üretimi ile ilgili gen bölgesi (cDNA) dizayn edilen ileri ve geri primerler ile PCR'da çoğaltıldıktan sonra uygun şartlarda (Çizelge 3.6) pET SUMO vektörüne ligasyon yapıldı. Bu işlem sonucunda rekombinant vektör elde edildi.

Çizelge 3.6. Ligasyon işlemi için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Kullanılan Miktar (µl)
PCR Ürünü	3
SUMO vektör	2
Ligaz Buffer	2
T4 Ligaz	1
dH ₂ O	2

3.2.5. Rekombinant vektörün kompetent hücrelere transformasyonu

Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen rekombinant vektörün ligasyon işleminde başarılı olup olunmadığını kontrol etmek amacıyla klonlama için uygun konağa transferinden sonra antibiyotikli büyüme ortamına ekimi yapıldı. Bu aşamada önceki adımda elde edilen ligasyon ürünü kullanıldı. Bu işlem için pET SUMO sisteminde belirtilen yol izlendi;

- a. -80°C'de korunan komponent hücreler (*E.coli* One Shot® Mach1™-T1^R) buz üzerinde yavaş bir şekilde çözündürüldükten sonra üzerine 2 µl ligasyon ürünü eklendi.
- b. Buz üzerinde 5-30 dk boyunca inkübe edildi.
- c. Hemen ardından hızlı bir şekilde 42°C'de 30 sn inkübe edildi.

- d. Tüpler tekrar buz üzerine alındı.
- e. Her bir tüpe 250 µl S.O.C. besiyeri (2%tripton, 0.5%maya ekstraktı, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ ve 20 mM glukoz.) eklendi.
- f. Ağız sıkıca kapatılan tüpler 1 saat 37°C'de 200 rpm'de inkübe edildi.
- g. İnkübasyon ürünü antibiyotik içeren petrilere 100-200 µl şeklinde yayıldı.

Ekim yapılan bu petriler büyüme için gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.6. Koloni PCR

Bu işlem rekombinant vektörü taşıyan kolonilerin belirlenmesi amacıyla AChE için tasarlanmış primerlerle yapıldı. pET SUMO sisteminde klasik klonlama işleminde tercih edilen X-gal gibi substrat içeren besiyeri kullanılmamaktadır. Bu nedenle transformasyon sonrası elde edilen koloniler morfolojik olarak birbirlerine benzerler. Fakat bu durumda tüm hücrelerin doğru plazmiti aldığı yorumu getirilemez. Sistem vektörü lineer bir yapıdadır ve insert edilecek gen parçasının A-T uçlarına sahip olması yeterlidir. Ancak bazı durumlarda gen bölgesi A-T klonlama sitesine ters bir şekilde yapışabilmektedir. Bu nedenle ligasyon sonrası transformasyon işleminde elde edilen koloniler kontrol edildikten sonra plazmit izolasyonu yapılmalıdır.

İlk transformasyon sonrası elde edilen kolonilerden bazıları rastgele seçilip (9 koloni) numaralandırıldı. Doğru rekombinant vektörü taşıyıp taşımadıklarını tespit etmek amacıyla PCR'da template olarak mikro pipet ucuyla alınan koloniler kullanıldı (Çizelge 3.7). Gene ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun (Çizelge 3.8) ürünleri agaroz jel elektroforezinde markera karşı yürütüldü. Pozitif çıkan kolonilerden daha sonra vektöre ait ileri ve geri primerler kullanılarak ayrı bir kontrol PCR'ı yapıldı.

Çizelge 3.7. Koloni PCR reaksiyon karışımı

PCR Bileşeni	Kullanılan Miktar (µl)
dH ₂ O	6.1
Primer R (10 pmol)	1
Primer F (10 pmol)	1
Tampon (10X)	1.5
MgCl ₂ (25 mM)	1.3
dNTP (10 mM)	0.6
Taq Polimeraz (5 u/µl)	0.5
Kalıp DNA	Tek koloni
Toplam Reaksiyon Hacmi	≈12 µl

Çizelge 3.8. Koloni PCR reaksiyon şartları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94°C / 10 dk
Denatürasyon	94°C / 150 sn
Yapışma (Annealing)	66°C / 30 sn
Uzama (Extension)	72°C / 2 dk
Son Uzama	72°C / 5 dk
Bekleme	+4°C / ∞

3.2.7. Plazmit izolasyonu

Koloni PCR'ın ardından rekombinant vektörü aldığı doğrulanan kolonilerin stoklama amacıyla antibiyotik içeren katı besiyerine ekimi yapıldı. Bir gece inkübasyona bırakılan bu petriden koloni PCR'da pozitif sonuç veren ve yine rastgele alınan iki koloni (2. ve 4. koloniler) bir gece 10 ml'lik antibiyotik içeren sıvı LB besiyerinde büyütüldü. Bu besiyerlerinden daha sonra çapraz PCR yapmak ve ekspresyon konağına transforme etmek için rekombinant vektör izole edildi. İzolasyon için GeneJET Plasmid Miniprep Kit (K0502, Thermo) kullanıldı. İzolasyon aşağıda belirtilen şekilde yapıldı;

- a. Bir gece 37°C’de LB ortamında büyütölmüş besiyerinden 1-5 ml alınıp 8000 rpm’de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- b. Pelet üzerine 250 µl süspansiyon solüsyonu (Resuspension Solution) eklenip çözödüröldü.
- c. Yeni bir ependorfa alınan homojenatın üzerine 250 µl Lysis Solution eklenip hafifçe 4-6 kez tersyüz edildi.
- d. Yine aynı tüpe 350 µl nötralizasyon tamponu (Neutralization Buffer) eklenip hafifçe tersyüz edildi.
- e. 5 dk 12000 g’de santrifüj yapıldı. Sıvı faz GeneJET spin kolonuna transfer edildi.
- f. Kolon takılı tüp 1 dk 12000 g’de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı kısım atıldı.
- g. Kolon üzerine saf etanol eklenmiş 500 µl yıkama solüsyonu (Wash Solution) bırakıldı.
- h. 1 dk 12000 g’de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı kısım atıldı. 7. basamak tekrarlandı.
- i. Aynı kolon bu sefer bir şey eklenmeden etanolün uzaklaştırılması için 1 dk boş santrifüj edildi.
- j. Kolon yeni bir tüpe alındıktan sonra kolon merkezine 50 µl elüsyon tamponu (Elution Buffer) eklendi. 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2 dk santrifüj edildi.
- k. Kolon atıldıktan sonra plazmit içeren elüsyon sıvısı -20°C’de saklandı.

3.2.8. Çapraz kontrol PCR reaksiyonu

SUMO sisteminde A-T klonlama yapıldığı için gen ürünü bazen ters bir şekilde bağlanabilmektedir. İzolasyon sonrası elde edilen plazmitlerden PCR yapılarak genin vektöre doğru bir şekilde bağlanıp bağlanmadığı kontrol edildi. Bu işlemlerde vektör için primer olarak Çizelge 3.9’da belirtilen ve ekspresyon kiti ile ticari olarak temin edilen primerler kullanıldı. Koloni PCR’da pozitif sonuç veren kolonilerden izole edilen plazmitlerin kalıp DNA olarak kullanıldığı 4 farklı PCR kobinasyonu Çizelge 3.10’da belirtilen şekilde tasarlandı.

Çizelge 3.9. SUMO vektörüne ait primer bilgileri

Primer	Sekans (5' → 3')	Tm (°C)	Uzunluk (bç)
SUMO İleri	AGATTCTTGACGACGGTATTAG	60	23
T7 Geri	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	60	20

Çizelge 3.10. Plazmitten yapılan kontrol PCR reaksiyonları

Reaksiyon	Kalıp DNA	İleri Primer	Geri Primer	Büyüklik (bp)
1	2.koloni plazmit	Rekombinant plazmitin kendisi		7488
2	4.koloni plazmit			7488
3	2.koloni plazmit	Vektör	Vektör	2103
4	4.koloni plazmit	Vektör	Vektör	2103
5	2.koloni plazmit	Gen	Vektör	1998
6	4.koloni plazmit	Gen	Vektör	1998
7	2.koloni plazmit	Vektör	Gen	1950
8	4.koloni plazmit	Vektör	Gen	1950
9	2.koloni plazmit	Gen	Gen	1845
10	4.koloni plazmit	Gen	Gen	1845

3.2.9. Pozitif sonuç veren bakterilerin gliserolde stoklanması

Bu aşamada doğru vektörü alan koloniler daha sonra tekrar kullanılmak üzere stoklandı. Bunun için tüm PCR kontrollerinde pozitif sonuç veren koloniler sıvı LB ortamında büyütüldükten sonra üzerlerine %15'lik gliserol eklendi. Gliserol+hücre karışımı alikuatlara ayrıldıktan sonra sıvı azot içerisinde ani dondurma işlemine tabi tutulup ardından hemen -80°C'ye alınarak stoklandı.

3.2.10. Rekombinant plazmitin konağa transformasyonu

Geni doğru şekilde alan pET-SUMO-hAChE plazmitleri belirlendikten sonra klasik ısı şoku yöntemi ile protein üretimi için konak organizma olan *E. coli* BL21 (DE3) bakteri hücrelerine aktarıldı.

Bu aşamanın gerçekleştirilmesinde pET SUMO sisteminde önerilen yol takip edildi;

- a. -80°C’de saklanan *E. coli* BL21(DE3) One Shot® çıkarılıp buz üzerinde çözünmesi beklendi.
- b. Çözünen hücrelerin üzerine 3 µl plazmit eklendi.
- c. 30 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- d. Hızlı bir şekilde 42°C’ye alınıp 30 sn bekletildikten sonra hemen geri buz üzerine alınıp üzerine 250 µl S.O.C. besiyeri eklendi.
- e. 1 saat 37°C’de 200 rpm’de inkübe edildi.
- f. Tüpten 50 µl kadar antibiyotikli katı besiyerine kalanı ise antibiyotikli sıvı besiyerine inoküle edildi. Ekim sonrası katı LB petrisi inkübatörde, sıvı besiyeri ise 37°C’de 200 rpm’de inkübe edildi.

3.2.11. Pilot (deneme) ekspresyon

Bu aşamada rekombinant vektörün aktarıldığı hücreler daha büyük besiyerlerinde büyütüldü ve indükleyici ile ekspresyon seviyesindeki değişimler saptandı. Bunun için;

- a. İlk olarak önceki geceden transformasyona uğramış hücreler 200 ml antibiyotikli besiyerine alındı.
- b. OD₆₀₀ 0.4-0.6 olana kadar inkübatörde 37°C’de büyütüldü.
- c. Yeterli büyüme düzeyine ulaştıktan sonra bu besiyeri eşit hacimlerde iki yeni erlene bölündü.
- d. Erlenlerden birine hiçbir şey eklenmezken diğerine son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde IPTG eklendi. IPTG eklenen erlenden 2 saatte bir örnekler alındı. Alınan bu

örnekler 3000 rpm’de 6 dk santrifüj edilip sulu fazı uzaklaştırıldıktan sonra -20°C’de saklandı.

Pilot ekspresyon, rekombinant proteinin üretilip üretilmediğini görmek için gerçekleştirildi. Pilot aktivite tayini ve SDS-PAGE yapıp ürün varlığından emin olunduktan sonra daha büyük miktarda besiyeri kullanılarak rekombinant proteinin üretimi yapıldı. Aşağıda belirtilen örnek toplama, hücre parçalama ve aktivite tayini gibi işlemler hem pilot ekspresyonda hem de gerçek çalışmalarda benzer şekilde yapıldı. Bu noktadan itibaren bahsedilecek olan yöntemler gerçek ekspresyon çalışmaları esnasında takip edilen yöntemleri kapsamaktadır.

3.2.12. Hücrelerin parçalanması ve örneklerin toplanması

Bu aşamada ilk olarak indükleyici içeren ortamda inkübe edilen bakteriler yaklaşık 7 saat sonra parçalama işlemine tabi tutularak ürettirilen proteinin hücre dışına çıkarılması amaçlandı. Elde edilen lizat içerisindeki proteinin varlığı ve işlevselliği farklı yaklaşımlarla kontrol edildi.

IPTG eklenmesi ile indüklenen besiyeri ortamının bulunduğu erlenden 2 saatte bir olmak kaydıyla örnekler toplandı. İndükleme sonrası hücreler 15 ml’lik falcon tüplere alınıp 3000 rpm’de 6 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı faz uzaklaştırıldı. Altta kalan peletin üzerine yeniden bakteri eklenip benzer şekilde santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Örneklerin bu şekilde toplanarak birim lizis tamponu içerisinde daha fazla peletin çözündürülmesi sağlandı ve dolayısı ile daha yoğun miktarda protein elde edilmesi amaçlandı.

Lizis işlemi için toplanan örneklerden elde edilen peletler üzerine uygun miktarda lizis tamponu eklendikten sonra yavaş yavaş erimesi beklendi. Örnekler soğuk su içerisinde 15 sn’lik sonikasyonu takip eden 45 sn’lik bir bekleme süresi olacak şekilde 3-4 kez tekrarlanan bir işlemle parçalandı.

Sonikasyonu takiben hücreler ayrıca sıvı azot yardımıyla da parçalandı. Bunun için tüpler önce sıvı azotta bekletilip iyice donmaları sağlandı. Tamamen şoklanan hücreler 42°C'lik su banyosuna alınarak tekrar çözündürüldü. Bu işlem 3-4 kez tekrarlandı. Son çözme işlemi sonrası hücreler 2 ml'lik ependorf tüplere transfer edildi. Bu tüpler 12000 g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra enzimin bulunduğu sıvı faz hemen soğuk ortama alındı.

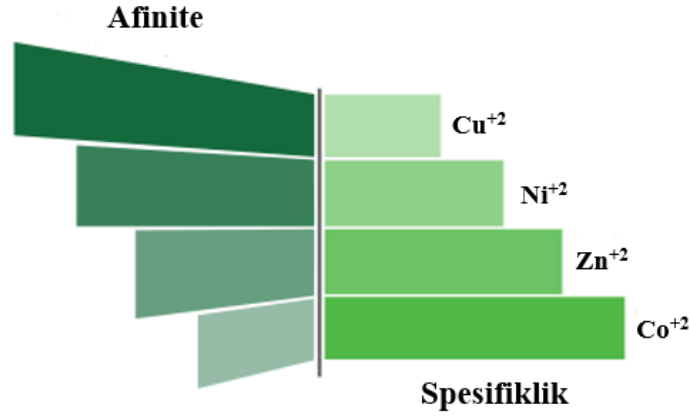
3.2.13. Doğal şartlar altında kolondan rekombinant protein saflaştırma

3.2.13.a. ProBond™ kolonun hazırlanması

Protein saflaştırması, bir karışımdan tek bir tip proteininin izole edilmesi için izlenen bir süreçtir. İlgili proteinin işlevi, diğer proteinlerle etkileşimi ve yapısının kimliklendirilmesi için bu proteinin saflaştırılması şarttır (Waugh 2005). Rekombinant proteinler, farklı kromatografi teknikleri kullanılarak saflaştırılırlar. Rekombinant proteinler genelde afinite kromatografisi ile izole edilebilir (M. Li *et al.* 2004). Yöntem genelde doku veya mikrobiyal bir kültür gibi birden fazla protein içerebilecek kaynaklar için kullanılır. Çeşitli adımlar sonucunda ilgili protein bulunduğu ortamdaki diğer protein ve protein olmayan bileşenlerden tamamen ayrılır. Ayırıştırma basamağında proteinlerin sahip olduğu fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerden yararlanılır. Proteinin üretimini sağlayan vektörlerde bulunan ekstra aminoasitler kolayca tanınmayı sağlayan afinite kuyruğu olarak görev yaparlar (Young *et al.* 2012). Bu kuyruğa sahip olmayan protein ve diğer moleküller kolona tutunamadan geçerler. Hedef proteinin kolonla olan ilişkisini bozacak bir çözelti eklendiği zaman bu protein artık tutunamayacak ve kolondan ayrılacaktır.

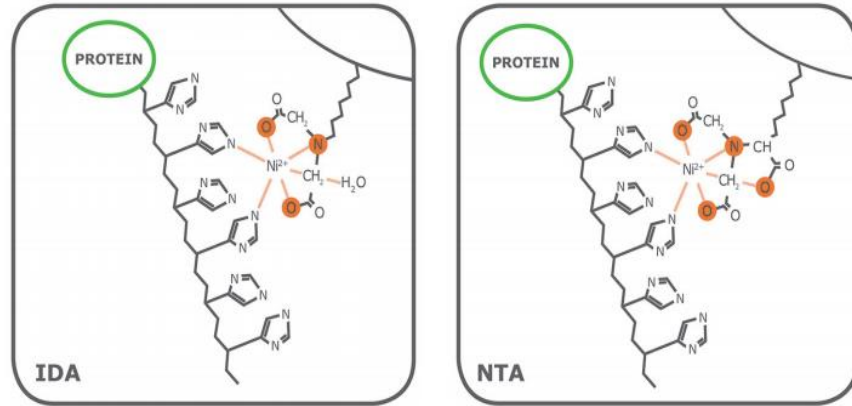
İmmobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) proteinlerin saflaştırılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Block *et al.* 2009). En popüler formu ise bir transisyon metali ile bir peptidin C veya N terminaline bağlanmış polihistidin (3-10 histidin) kuyruğunun imadazol halkası ile interaksiyona geçebilecek bir matrikse sahip olanıdır (Young *et al.* 2012). Yöntemde farklı özellikleri olan metaller kullanılabilmektedir

(Şekil 3.1). Kullanılan metallerin seçimi yapılan çalışmaya ve hedef proteinin karakterine göre değişebilmektedir.



Şekil 3.1. IMAC'ta kullanılan farklı metaller ve bu metallere ait afinite-spesifiklik karşılaştırması (Anonymus 2015)

ProBond sistem, 6xHis kuyruğu olan rekombinant proteinleri saflaştırmak için dizayn edilmiştir. Kolon materyali nikel içermektedir. Nikel şelatlayabilen reçine ile 6Xhis-tag kuyruğuna sahip vektörler kullanılarak farklı konak tiplerinde ifade ettirilmiş rekombinant füzyon proteinler kolay bir şekilde saflaştırılabilmektedir (Hochuli *et al.* 1987). Bu kolon materyali yüksek seçicilikle çalışmaktadır. Nikel şelatlayıcı reçinelerde ligant olarak Ni^{+2} ile üçlü koordinasyon bölgesi oluşturan iminodiasetik asit (IDA), dörtlü koordinasyon bölgesi oluşturan nitriloasetik asit (NTA) (Şekil 3.2) ve beşli koordinasyon bölgesi oluşturan tris karboksimetiletilediamin (TED) kullanılmaktadır (Hefti *et al.* 2001; Janknecht *et al.* 1991).



Şekil 3.2. En çok tercih edilen IDA ve NTA'nın polihistidin kuyruğu içeren proteinlerle kurduğu etkileşime ait şematize gösterim (Anonymus 2015)

Rekombinant proteinin doğal şartlar altında saflaştırılması için öncelikle kolon materyali hazırlandı. Bu işlem için; 10 ml'lik saflaştırma kolonuna 2 ml Probond™ nikel şelatlayıcı reçine dökülerek kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. 6 ml steril saf su ilave edilip reçine ters çevrilerek ve kolona hafifçe vurularak yeniden süspanse edildi. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı.

Doğal şartlar altında saflaştırma için 6 ml doğal bağlanma tamponu (EK 1) ilave edildi. Reçine ters çevrilerek ve kolona hafifçe vurularak yeniden süspanse edildi. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Son işlem tekrarlandı.

3.2.13.b. Rekombinant proteinin konsantre hale getirilmesi

Rekombinant protein teknolojisi normalde fermantör adı verilen kompleks cihazlarda gerçekleştirilen bir işlem olup birim miktarda daha yoğun ürün ve aktivite amaçlanır. Böyle bir sistem mevcut olmadığı için protein farklı yollarla konsantre edildi. Bu aşamada moleküler ağırlığı 60 kDa'dan fazla olan proteinleri tutan bir kolona sahip büyük falkonlar kullanıldı. Önceki basamaklarda ısı şoku ile hücre içeriği çıkarılan hücrelerden elde edilen 30 ml lizat 'amicon filtre' (Milipore) ile 3 ml'ye kadar

indirgendi. Böylece protein yaklaşık 50 kat (5 kez yapılan hücreden pelet elde edilme safhası dahil) daha konsantre hale getirildikten sonra hazırlanan saflaştırma kolonuna yüklendi.

Reçineyi yüklenen solüsyon içerisinde süspanse halde tutmak için yavaşça çalkalama ile 30-60 dk süresince bağlanması sağlandı. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. 8 ml ‘doğal yıkama tamponu’ (EK 1) ile yıkama yapıldı. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi 3-4 kez tekrarlandı. Dik pozisyonda kelepçe ile bağlanan kolonun alt uçtaki kapağı çıkarılarak 8-12 ml ‘doğal elüsyon tamponu’ (EK 1) ile protein elüe edildi.

3.2.13.c. Diyaliz basamağı

Diyaliz, hedef proteinin kolondan ayrılması için kullanılan tampon çözeltilerde bulunan tuz gibi küçük moleküllerin arındırılması için yapılan bir işlemdir. Bu teknik tuz ya da diğer küçük moleküllerin hücre kısımlarından uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Tuzlar, proteinlerden yarı geçirgen bir zar kullanılarak ayrılabilir. Elüe edilen protein karışımı diyaliz torbasının içine konur ve bu torba da küçük moleküllerin taşınacağı bir tampon çözelti içerisine yerleştirilir. Bu esnanda diyaliz torbasının gözenek çapından daha büyük boyutlara sahip moleküller diyaliz torbasının içerisinde hapsolürken daha küçük çaplı moleküller ise difüzyon esasına dayanarak diyaliz tamponuna geçer.

Kolondan saflaştırma sonucu elde edilen numune, diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle diyaliz tamponuna (20 mM sodyum fosfat, pH 8) karşı iki defa diyaliz edildi. Buz banyosunda gerçekleştirilen bu işlemin ardından elüsyon örneği daha sonraki karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere soğukta muhafaza edildi.

3.2.14. Karakterizasyon çalışmaları

3.2.14.a. Bradford metodu ile protein miktarının belirlenmesi

Kültür sıvısındaki toplam protein miktarı Bradford metodu kullanılarak belirlendi. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976). Elde edilen absorbands değerleri ile çizilen standart grafik kullanılıp toplam protein miktarı belirlendi. Bunun yanı sıra bu yöntemle konsantre etme, saflaştırma ve indükleyici ajanın protein üretimi üzerine olan etkisi de gözlemlendi.

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alınıp tüm tüplerin hacmi saf su ile 0,1 ml'ye tamamlandı ve 4,9 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dk sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okunmuştur. Kör olarak 0,1 ml saf su ve 4,9 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik çizildi. Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulanıp standart grafik kullanılarak miktar tayini yapıldı.

3.2.14.b. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Protein ekspresyonunun başarısını kontrol etmek ve doğruluğundan emin olabilmek için jele farklı aşamalarda elde edilen ürünler yüklendi. Bu sayede indükleyici ajanın, saflaştırma yönteminin ve konsantrasyon artırma işlemlerinin etkisi gözlemlenebildi.

Hücreler parçalandıktan sonra elde edilen lizat ve konsantre ürün uygun yükleme tamponu ile inkübe edildip jele yüklendikten sonra markıra karşı yürütüldü. Yürütme işleminin ardından jel coomassie blue yöntemiyle boyandı. Boyama işleminin ardından elde edilen jelde ürün varlığı tespit edildi. İşlem özetle aşağıda belirtilen şekilde yapıldı;

1. Lizat dondurulmuş ise buz üzerinde çözdürüldü.
2. Lizatın 20µl'si SDS-PAGE jel yükleme tamponu ile karıştırıldı.
3. 5 dk kaynatılıp jele 18-20 µl yüklendi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 60 voltta 30 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Bu ilk yürütmeden sonra akım 120 volt'a çıkartılarak numuneler jelin alt sınırına gelene kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı.
4. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel kasetten çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde bir gece bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

3.2.14.c. Aktivite tayini

AChE enziminin aktivitesinin ölçümü için bu enzime spesifik olan Ellman metodu kullanıldı. Bu yöntemde kullanılan Asetiltiyokolin iyodat (AChI; ATC)'ın AChE enzimi ile tepkimeye girmesi sonucu tiyokolin ve asetat oluşur. Oluşan tiyokolin 5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girerek sarı renkli bir bileşik oluşturur. Yöntemin prensibi bu sarı rengin 412 nm'de 5 dk ölçülmesine dayanır (Ellman *et al.* 1961).

Aktivite tayini için kullanılan yöntemdeki kuvvet içeriği ve kullanılan bileşenlerin miktarları Çizelge 3.11'de belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.11. AChE aktivite ölçümünde küvet içeriği

Küvet İçeriği	Kör Küvet	Numune Küveti
dH ₂ O	800 µl	750 µl
Tampon	100 µl	100 µl
AChI	50 µl	50 µl
Enzim	50 µl	50 µl
DTNB	-	50 µl

Absorbans değişimi 412 nm’de 5 dakika boyunca köre karşı ölçüldü. Sonra dakika başına aktivite hesaplandı. Aktivite hesaplamaları için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U} = \frac{\Delta OD}{13.6} \times \frac{V_c}{V_e} \times f$$

E $\ddot{U}$ = ml başına enzim ünitesi

ΔOD = 412 nm’de optik dansitenin dakika başına değişimi

V_c = Küvetteki çözeltilerin son hacmi

V_e = Küvetteki saf enzim çözeltisinin hacmi

f = Seyreltme faktörü

13.6= Asetiltiyokolin iyodat için molar absorbtivite kat sayısı

3.2.14.d. Optimum pH, sıcaklık ve tampon konsantrasyonunun belirlenmesi

Bu başlık altında yapılan çalışmalar enzimin aktivite gösterdiği pH, sıcaklık ve substrat miktarı gibi değişkenleri tespit etmek amacıyla yapılmıştır. İlk olarak enzimin optimum aktivite gösterdiği tampon çeşidi belirlenmiştir.

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH aralığının saptanması için farklı pH aralıklarına uygun tampon çözeltileri (Çizelge 3.12) kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi.

Çizelge 3.12. Kullanılan tamponlar ve pH aralıkları

Tampon	pH aralığı
Sodyum Fosfat	5,5-8,0
TrisHCl	7,5-9,0
GlisinNaOH	9,0-10,5

Maksimum aktivitenin alındığı tampon belirlendikten sonra bu tampon için konsantrasyon çalışması yapıldı. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum iyonik şiddeti belirlemek amacıyla Glisin-NaOH tamponunun AChE için optimal pH'sına yönelik 100, 200, 400, 800, 1000, 1200, 1400 ve 1500 mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak aktivite ölçümleri alındı.

3.2.14.e. ATC substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Asetiltiyokolin iyodat substratı için hücre homojenatındaki AChE enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için 7 farklı (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 ve 3.5 mM) asetilkolin iyodat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafiği çizilerek bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).

3.2.14.f. Western Blot Analizi

Nükleik asitlerin veya proteinlerin elektriksel yük karakterlerinden yararlanılarak uygun hareket ettirildikten sonra bir destek materyaline transfer edilip göreceli olarak miktarlarının belirlendiği tekniğe genel olarak blotlama adı verilmektedir. Söz konusu moleküllerden proteinlerin kalitatif veya kantitatif tayinine yardımcı olan western blot yöntemi ile hücre veya doku lizati gibi karmaşık ortamlarda spesifik proteinlerin kolay ve kesin bir şekilde ayırt edilmesi söz konusudur. Yöntem;

1. Karışımdaki proteinlerin SDS poliakrilamid jel lelektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül kütlelerine göre ayrılmasını takiben nitroselüloz veya PVDF membran üzerine transfer edildiği **blotlama** basamağı,
2. Membran üzerinde protein bulunmayan bölgelerin maskelendiği **bloklama** basamağı,
3. Hedef proteine afinite gösterebilecek **antikorlarla inkibasyon** basamağı,
4. Antikorla hibridizasyon sonrası membrandaki proteinlerin sahip olduğu moleküler ağırlık ve kısmi miktarının belirlenmesi için farklı yöntemlerle **görüntüleme** basamağı olmak üzere 4 temel işlemden oluşmaktadır (Erdoğan vd 2014).

Proteinin molekül külesine göre ayrımının yapılabilmesi için ayırma (Çizelge 3.13) ve yığma (Çizelge 3.14) olmak üzere iki kısımdan oluşan denatüre edici bir jel yapıldı. Çalışmada 7,5 ml %10'luk ayırma jeli ve 1 ml yığma jeli hazırlandı. İlk olarak ayırma jeli iki cam plaka arasına döküldü. Oluşan hava kabarcıkları izopropanol kullanılarak engellendi. Yaklaşık 15-20 dk polimerizasyon beklendikten sonra jel ters çevrilerek izopropanol uzaklaştırıldı ve yığma jeli yüklenip tekrar polimerize olmasına izin verildi.

Çizelge 3.13. SDS jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli değerleri (ml)

Jel Yüzdesi	%6	%8	%9	%10	%12
dH ₂ O	7,9	6,9	6,45	5,9	4,9
%30 Akrlil amid	3	4	4,5	5	6
1,5M Tris pH 8,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
%10 SDS	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
%10 APS	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
TEMED	0,012	0,009	0,075	0,006	0,006
Toplam	15	15	15	15	15

Çizelge 3.14. SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli değerleri

Bileşen	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
dH ₂ O	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4
%30 Akril amid	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83
1,5M Tris pH 8,8	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63
%10 SDS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
%10 APS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005

Proteinler jele yüklenmeden önce Bradford yöntemi ile konsantrasyon ölçümü yapıldı. 1X SDS yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler 95°C’de 10 dk kaynatılıp 10 dk buzda bekletildi. Jel ve numuneler hazırlandıktan sonra jel elektroforez tankına yerleştirilip tank yürütme tamponu ile dolduruldu. Numuneler yüklendikten sonra ilk önce 30 dk 50 voltta daha sonra 90 dk 120 voltta yürütüldü.

Yürütme işleminden sonra jel kasetinden çıkarılan jelin yığma jeli kısmı kesilerek uzaklaştırıldı. Ayrım jeli transfer tamponu içerisine bırakıldı. Transfer membranı 5 dk metanol ve 5 dk 1X transfer çözeltisi ile muamele edildi. Blotlama cihazına sırasıyla 2 parça blot kağıdı, mebran ve yine 2 parça blot kağıdı bırakılıp transfer çözeltisi ile iyice ıslatıldı. Cihaz kapatılıp 1 watt elektriksel alan altında 75 dk blotlama işlemi yapıldı.

Blotlamanın ardından PVDF membran 10 dk TBST ile yıkandı. 1 saat oda sıcaklığında bloklama çözeltisi olarak %5’lik yağsız süt tozu (skim milk powder) ile muamele edilip 4°C’de 1 gece antikor ile inkübasyona bırakıldı. Membran 5 kez 5 dk TBST ile yıkandı. Femto ve Pico substratları (ECL reagent) kullanılarak antikorun kimyasal sinyal oluşturması sağlandı. Son olarak membranın filmi çekildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İnternet Ortamından AChE Enzimini Kodlayan Sekansın Bulunması

Asetilkolinesteraz enzimine ait gen bölgesi NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılarak elde edildi. Aşağıda verilen dizi enzime ait tüm bölgeleri göstermektedir. Sarı renk ile belirtilen kısım ürünü kodlayan bölgeyi göstermektedir. Kalın punto ile gösterilen diziler başlama ve bitiş kodonlarını belirtmektedir.

Erişim Numarası: M55040.1

Toplam baz sayısı: 2218 bç

mRNA baz sayısı: 1845 bç

```
CTCTCCCCTCATCTTTGCCAACCTGCCCCACCTCCTCTGCAGCTGAGCGATAACCCCTTGGGCCGACAGTG
CCCTAATCTCCTCCCTCCTGGCTTCTCGACCGACCCCTTACCCCTTCCCTTTCTTTCTCCCAGCAGACGC
CGCCTGCCCTGCAGCCATGAGGCCCCCGCAGTGTCTGCTGCACACGCCTTCCCTGGCTTCCCCACTCCTT
CTCCTCCTCCTCTGGCTCCTGGGTGGAGGAGTGGGGGCTGAGGGCCGGGAGGATGCAGAGCTGCTGGTGA
CGGTGCGTGGGGGCCGGCTGCGGGGCATTGCGCTGAAGACCCCCGGGGGCCCTGTCTCTGCTTTCTGGG
CATCCCCCTTTGCGGAGCCACCCATGGGACCCCGTTCGCTTTCTGCCACCGGAGCCCCAAGCAGCCCTTGGTCA
GGGGTGGTAGACGCTACAACCTTCCAGAGTGTCTGCTACCAATATGTGGACACCCATACCCAGGTTTTG
AGGGCACCGAGATGTGGAACCCCAACCGTGAGCTGAGCGAGGACTGCCTGTACCTCAACGTGTGGACACC
ATACCCCCGGCCTACATCCCCCACCCCTGTCTCGTCTGGATCTATGGGGGTGGCTTCTACAGTGGGGCC
TCCTCCTTGGACGTGTACGATGGCCGCTTCTTGGTACAGGCCGAGAGGACTGTGCTGGTGTCCATGAACT
ACCGGGTGGGAGCCTTTGGCTTCTTGGCCCTGCCGGGGAGCCGAGAGGCCCCGGGCAATGTGGGTCTCCT
GGATCAGAGGCTGGCCCTGCAGTGGGTGCAGGAGAACGTGGCAGCCTTCGGGGGTGACCCGACATCAGTG
ACGCTGTTTTGGGGAGAGCGCGGGAGCCGCCTCGGTGGGCATGCACCTGCTGTCCCCGCCAGCCGGGGCC
TGTTCCACAGGGCCGTGCTGCAGAGCGGTGCCCCCAATGGACCCCTGGGCCACGGTGGGCATGGGAGAGGC
CCGTGCGAGGGCCACGCAGCTGGCCACCTTGTGGGCTGTCTCCAGGCGGCACTGGTGGGAATGACACA
GAGCTGGTAGCCTGCCTTCGGACACGACCAGCGCAGGTCCTGGTGAACCACGAATGGCACGTGCTGCCTC
AAGAAAGCGTCTTCCGGTTCTCCTTCGTGCCTGTGGTAGATGGAGACTTCTCAGTGACACCCAGAGGC
CCTCATCAACGCGGGAGACTTCCACGGCCTGCAGGTGCTGGTGGGTGTGGTGAAGGATGAGGGCTCGTAT
TTTCTGGTTTACGGGGCCCCAGGCTTCAGCAAAGACAACGAGTCTCTCATCAGCCGGGCCGAGTTCCTGG
CCGGGTGCGGGTTCGGGTTCCTCAGGTAAGTGACCTGGCAGCCGAGGCTGTGGTCTGCTTACACAGA
CTGGCTGCATCCCCAGGACCCGGCACGCCTGAGGGAGGCCCTGAGCGATGTGGTGGGCGACCACAATGTC
GTGTGCCCCGTGGCCAGCTGGCTGGGCGACTGGCTGCCAGGGTGCCCGGGTCTACGCCTACGTCTTTG
AACACCGTGCTTCCACGCTCTCCTGGCCCCCTGTGGATGGGGGTGCCCCACGGCTACGAGATCGAGTTCAT
CTTTGGGATCCCCCTGGACCCCTCTCGAACTACACGGCAGAGGAGAAAATCTTCGCCAGCGACTGATG
CGATACTGGGCCAACTTTGCCCGCACAGGGGATCCCAATGAGCCCCGAGACCCCAAGGCCCCACAATGGC
CCCCGTACACGGCGGGGGCTCAGCAGTACGTTAGTCTGGACCTGCGGCCGCTGGAGGTGCGGCGGGGGCT
GCGCGCCCAGGCCTGCGCCTTCTGGAACCGCTTCTCCCCAAATTGCTCAGCGCCACCGACACGCTCGAC
GAGGCGGAGCGCCAGTGGAAGGCCGAGTTCCACCGCTGGAGCTCTACATGGTGCACGTGGAAGAACCAGT
```

TCGACCACTACAGCAAGCAGGATCGCTGCTCAGACCTGTGA CCCCCGCGGGACCCCCATGTCCTCCGCTC
CGCCCCGGCCCCCTAGCTGTATATACTATTTATTTTCAGGGCTGGGCTATAACACAGACGAGCCCCAGACTC
TGCCCATCCCCACCCACCCCGACGTCCCCCGGGGCTCCCGGTCTCTGGCATGTCTTCAGGCTGAGCTC
CTCCCCGCGTGCCTTCGCCCTCTGGCTGCAAATAAACTGTTACAGGCC

4.2. AChE Enzimine Ait Aminoasit Sekansı

Aşağıda bilgileri verilen asetilkolinesteraz enzimine ait protein sekansı NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanından elde edildi.

MRPPQCLLHTPSLASPLLLLLLLWLLGGGVGAEGREDAELLVTVRGRLRGIRLKTTPGGP
VSAFLGIPFAEPPMGPRRFLPPEPKQPWSGVVDATTFQSVCYQYVDTLYPGFEGTEMWN
PNRELSIEDCLYLNWVTPYPRPTSPTPVLVWIYGGGFYSGASSLDVYDGRFLVQAERTVL
VSMNYRVGAFGFLALPGSREAPGNVGLLDQRLALQWVQENVAAFGDPTSVTLFGESAG
AASVGMHLLSPPSRGLFHRAVLQSGAPNGPWATVGMGEARRRATQLAHLVGCPPGGTGG
NDELVAACLRTPAQVLNHEWHVLPQESVFRFSFVPVVDGDFLSDTPEALINAGDFHG
LQVLVGVMKDEGSYFLVYGAPGFSKDNEGLISRAEFLAGVRVGVPQVSDLAEEAVVLHY
TDWLHPEDPARLREALSDVVGDNVVCVPAQLAGRLAAQGARVYAYVFEHRASTLSWPL
WMGVPHGYEIEFIFGIPLDPSRNYTAEKIFAQRLMRYWANFARTGDPNEPRDPKAPQW
PPYTAGAQQYVSLDLRPLEVRRGLRAQACAFWNRFLLPKLLSATDTLDEAERQWKAEFHR
WSSYMVHWKNQFDHYSKQDRCSDL

4.3. AChE Genine Ait Primerlerin Belirlenmesi

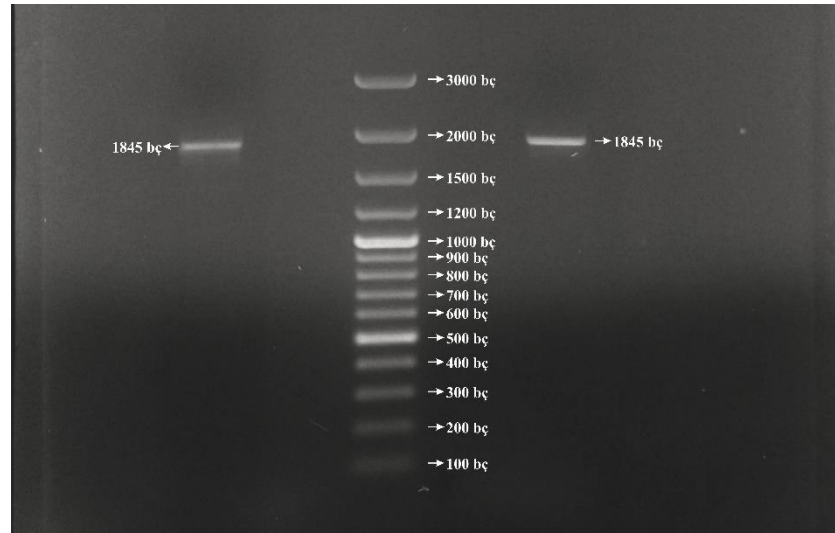
Kodlama bölgesinin başından ve sonundan tüm geni kapsayacak biçimde seçilen primerler (Çizelge 4.1) yine online veri tabanları aracılığı ile kontrol edilerek sadece hedef gene özel oldukları doğrulandı.

Çizelge 4.1. AChE genine ait primerlerin özellikleri

Primer	Sekans (5' → 3')	T _m (°C)	Uzunluk (bp)
İleri	ATGAGGCCCCCGCAGTGTCT	66	20
Geri	TCACAGGTCTGAGCAGCGATCC	66	22

4.4. cDNA Kütüphanesinden AChE Kodlama Bölgesinin PCR İle Çoğaltılması ve Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi

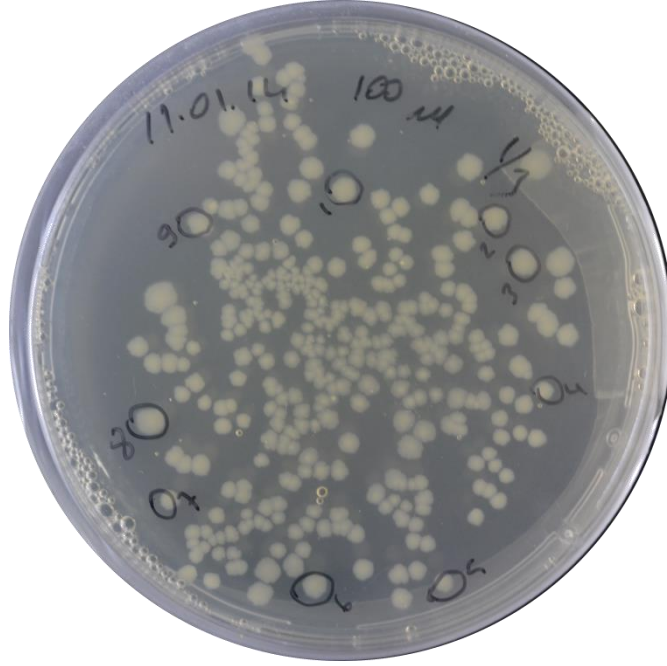
Kademeli PCR ile uygun yapışma sıcaklığı belirlendikten sonra Çizelge 4.1’de belirtilen primerler ile Çizelge 3.3. ve 3.4’te belirtilen PCR bileşenleri/şartları kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi aracılığıyla kontrolü sonucunda 1845 bp büyüklüğünde bir ürün elde edildi. Jelden alınarak miktarı ve saflığı artırılan ürün yeniden agaroz jel elektroforezi yapılarak (Şekil 4.1) saf ürün olduğu teyit edilmiş oldu.



Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR ürünleri (M: Marker)

4.6. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi ve Konak Organizmaya Transformasyonu

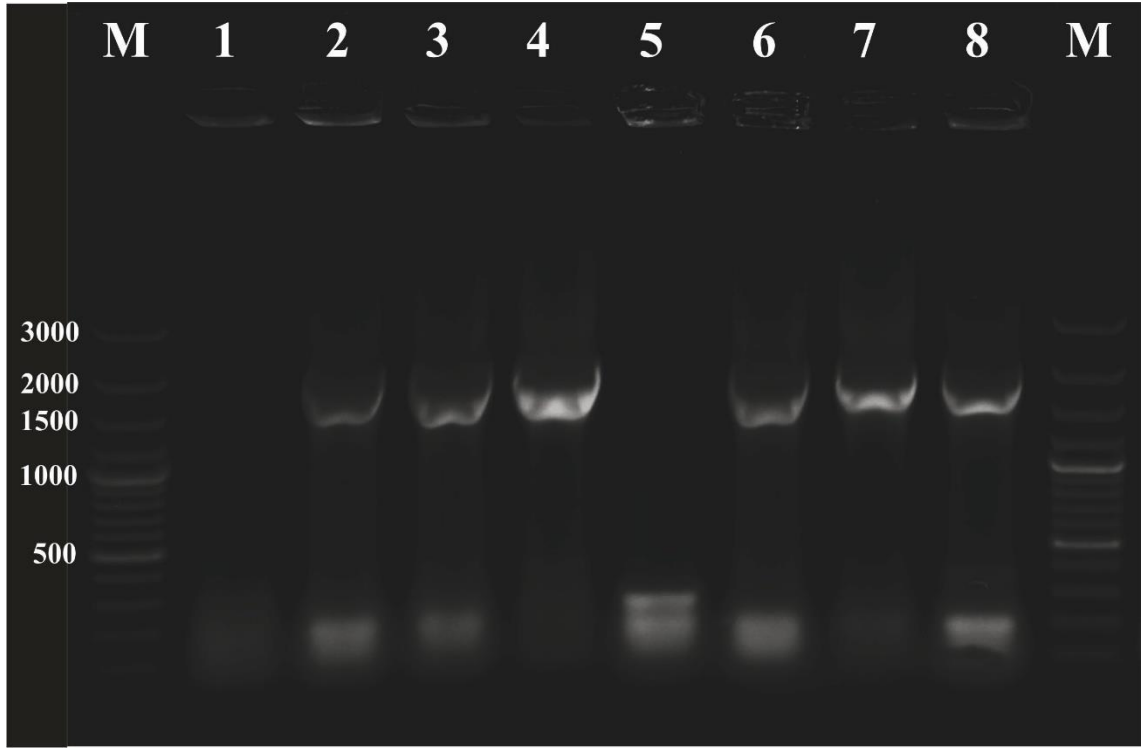
Vektörün ligasyonu ve klonlama konağına transferi sonrasında elde edilen hücrelerin antibiyotik içeren ortama farklı miktarlardaki ekimini takiben 37°C’de gece boyu süren inkübasyon sonucunda petrilerin tümünde koloni oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Transformasyon sonrası antibiyotikli besiyeri ortamında gelişen koloniler

4.7. Koloni PCR

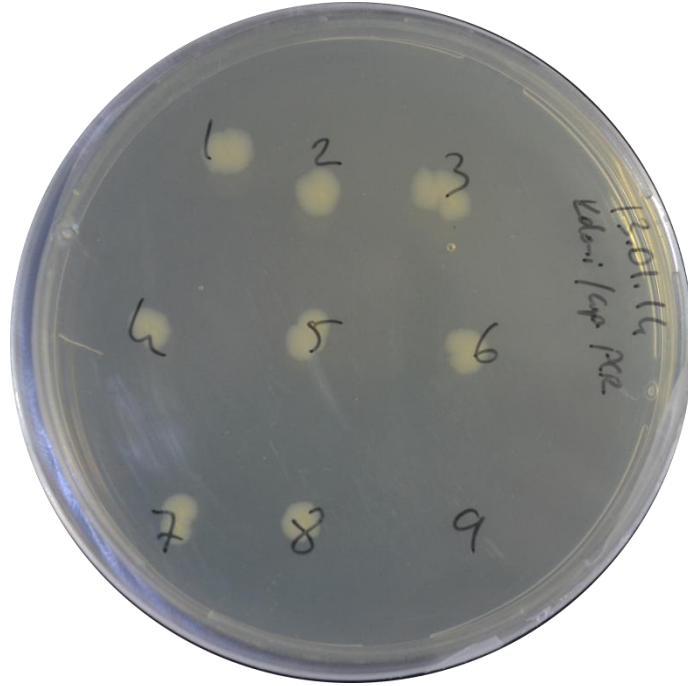
Pozitif olarak algılanan kolonilerin kalıp olarak kullanıldığı ve gene ait primerlerle yapılan PCR reaksiyonu sonucunda ligasyon işlemi esnasında gen parçasını doğru şekilde alan plazmitlerin 2., 3., 4., 6., 7. ve 8. kolonilerde olduğunu sonucuna varıldı (Şekil 4.3). Elde edilen bu sonuç morfolojik yönden birbirine benzeyen ve pozitif olarak algılanan hücrelerin aslında rekombinant vektörü kabul etme açısından kusurlu olabileceğini göstermiştir. Bu durum daha önce de belirtildiği gibi protein kodlayan gen parçasının lineer halde bulunan vektöre bazen ters bir şekilde insert olabileceği gerçeğini de doğrulamaktadır.



Şekil 4.3. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen koloni PCR ürünleri (1-8; seçilen koloniler, M; Markır)

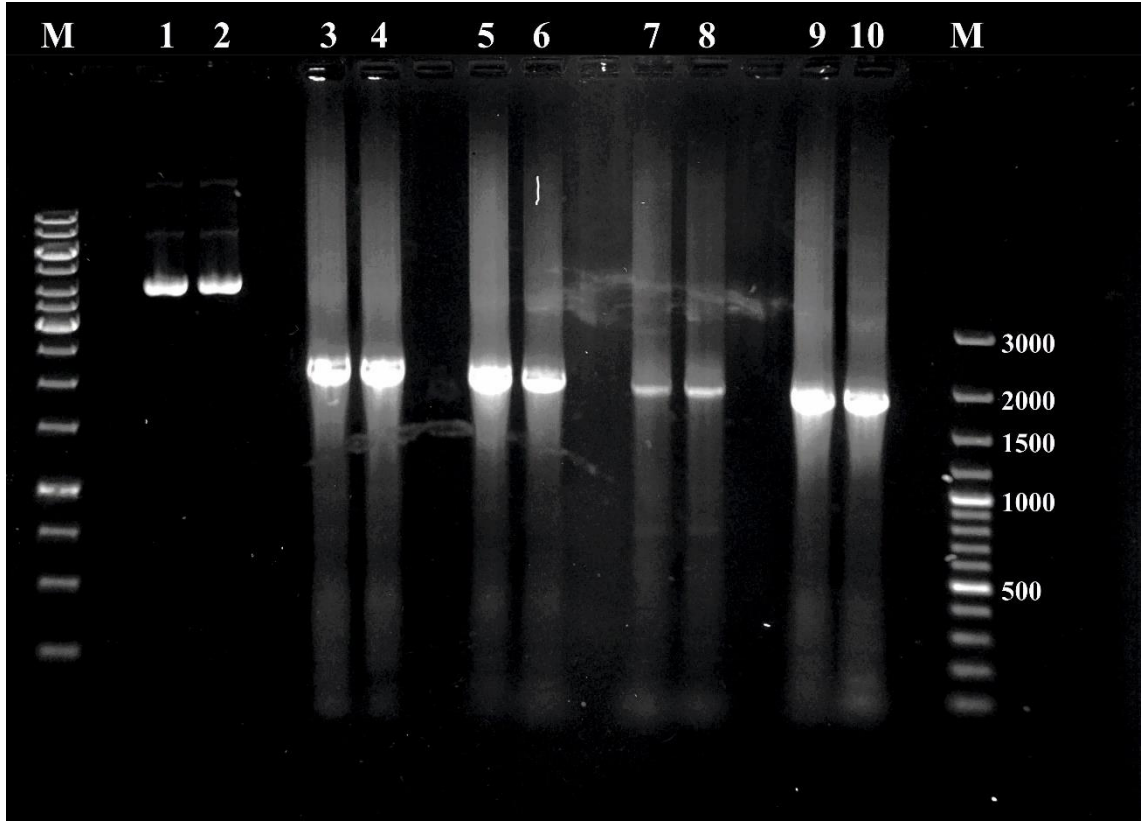
4.8. Plazmit İzolasyonu ve Çapraz PCR

Koloni PCR esnasında kalıp olarak kullanıldıktan sonra plazmit izolasyonu ve gliserol stoğu hazırlama basamaklarında kullanılmak için yeni bir besiyerine ekimi yapılan kolonilerin bu ortamda da büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Rekombinant vektörü aldığı doğrulanmış kolonilerin stoklama için ekiminin yapıldığı katı besiyeri

Koloni PCR neticesinde pozitif sonuç veren kolonilerden (2. ve 4. koloni) izole edilen plazmitlerin kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonuna ait ürünlerin agaroz jel elektroforez sonuçları Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Vektöre ait primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda 2103 bp'lik ürün (3 ve 4 numaralı kuyucuk) elde edilmiştir. Gene ait ileri ve vektöre ait geri primer kullanılarak yapılan PCR sonucunda 1998 bp'lik ürün (5 ve 6 numaralı kuyucuk) elde edilmiştir. Vektöre ait ileri ve gene ait geri primer kullanılarak yapılan PCR sonucunda 1950 bp'lik ürün (7 ve 8 numaralı kuyucuk) elde edilmiştir. Son olarak gene ait ileri ve geri primerler kullanılarak yapılan reaksiyonda da yine protein kodlama bölgesine ait 1845 bp'lik bir ürün (9 ve 10 numaralı kuyucuk) elde edilmiştir. Tüm bu sonuçlara bakılarak koloni PCR sonuçlarına paralel olarak seçilen kolonilerden izole edilen plazmitlerin gen bölgesini doğru bir şekilde aldığı teyit edilmiştir.



Şekil 4.5. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen çapraz PCR ürünleri

4.9. Rekombinant Plazmitin Protein Üretimi İçin Konağa Transformasyonu

Koloni ve çapraz PCR sonuçlarına uygun olarak seçilen kolonilerden elde edilen vektörlerin aktarıldığı ekspresyon konağının antibiyotikli ortamda başarılı bir şekilde büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.6). Bu sonuç transformasyon işlemi esnasında hücre canlılığına zarar verilmediğini ve izole edilen plazmitlerin antibiyotik direnç genini dolayısıyla hedef gen bölgesini transkribe edecek promoter bölgesinin çalıştığı sonucunu da göstermiştir.

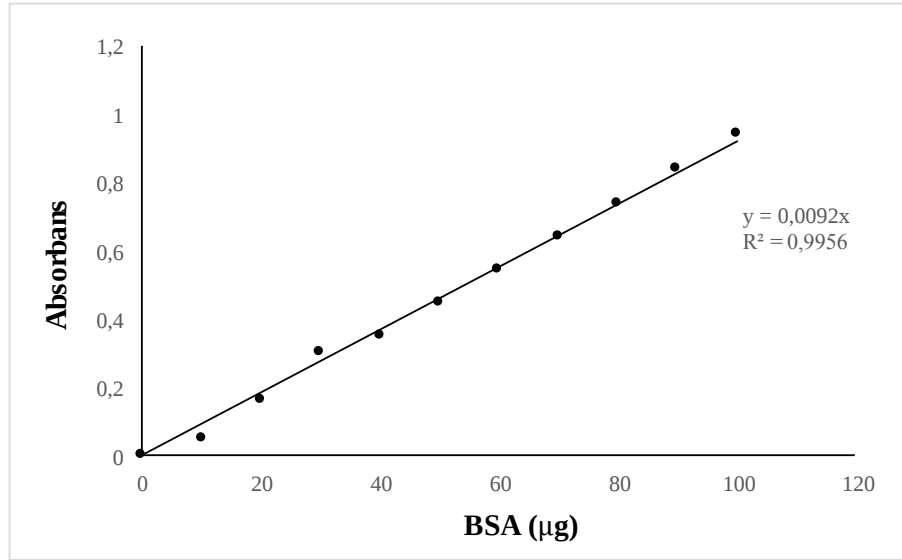


Şekil 4.6. Plazmitlerin ekspresyon konağına aktarılmasından sonra meydana gelen koloniler

4.10. Toplanan Örneklerin Analizi

4.10.1. Bradford metodu ile protein miktarının belirlenmesi

Elde edilen absorbans değerleri ile çizilen standart grafikten (Şekil 4.7) elde edilen denklem ile toplam protein miktarları hesaplaması sonucu konstantre etme, saflaştırma ve indükleyici kimyasalın protein üretimi üzerine etkisinin olduğu (Çizelge 4.2) sonucuna varıldı.



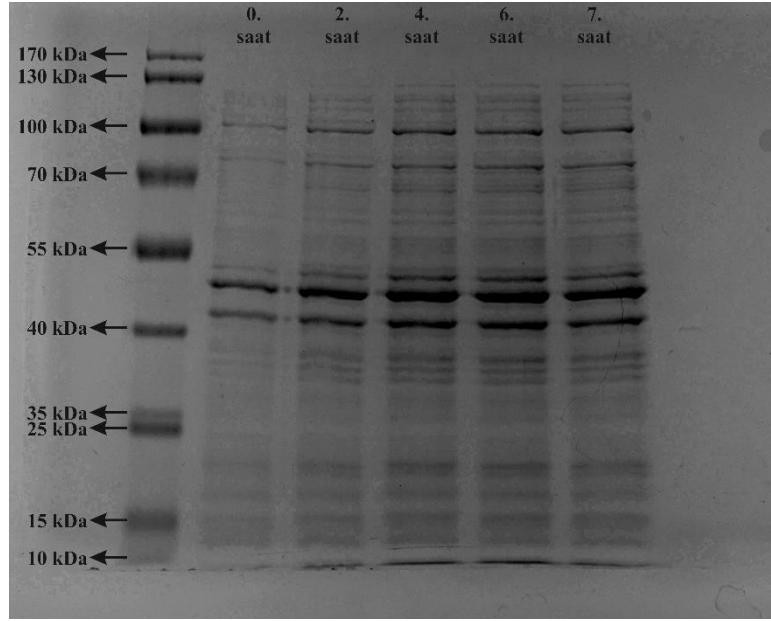
Şekil 4.7. Bradford analizi ile proteinlerin kantitatif tayinini için kullanılan standart grafik

Çizelge 4.2. Bradford yöntemi ile belirlenen protein miktarları

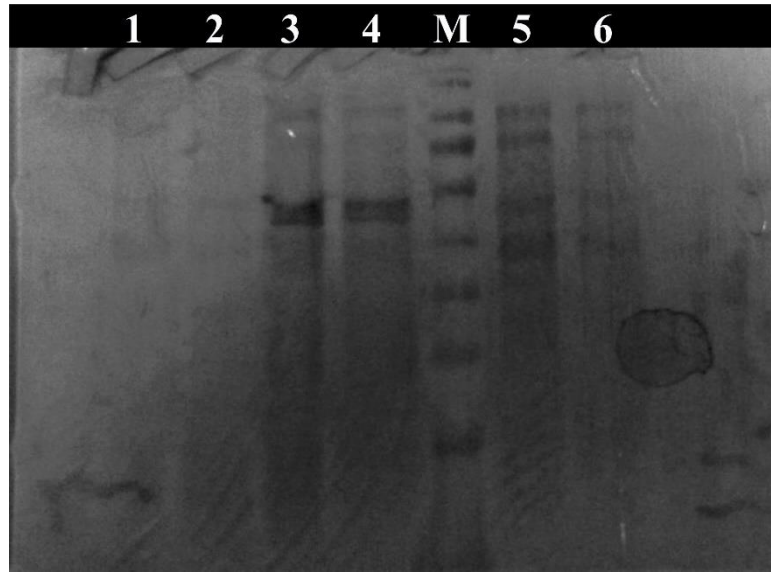
Numune	A ₅₉₅	Miktar (mg/mL)
İndüklenmeyen ortam	0,171	18,6
İndüklenmiş ortam lizat	0,547	59,4
İndüklenmiş ortam konsantre ürün	1,755	190,8
İndüklenmiş ortam konsantre ürün diyaliz elüsyonu	0,426	46,3

4.10.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi SDS-PAGE

Total hücre lizatı kullanılarak yapılan SDS-PAGE sonucunda canlıya ait proteinlerin yanı sıra rekombinant proteinin de üretildiği gözlemlendi (Şekil 4.8). Pilot ekspresyondan sonra yeniden yapılan SDS-PAGE işleminde ise indükleyici ajanın, saflaştırma yönteminin ve konsantrasyon artırma işlemlerinin protein miktarına etkisi doğrulandı (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Pilot ekspresyon sonucu elde edilen hücre lizatına ait SDS-PAGE fotoğrafı



Şekil 4.9. Kısmi saflaştırma yapılan enzime ait SDS-PAGE fotoğrafı

1-2; indüklenmemiş ortam, 3-4; indüklenmiş ortam lizat, 5; indüklenmiş ortam konsantre ürün, 6; indüklenmiş ortam diyaliz elüsyonu

4.10.3. Optimum pH'nın belirlenmesi

Çizelge 3.10'da belirtilen tamponlar kullanılarak 412 nm dalga boyunda ölçülen 5 dk'lık aktivite ölçüm sonuçları aşağıda verilen tablodaki gibidir.

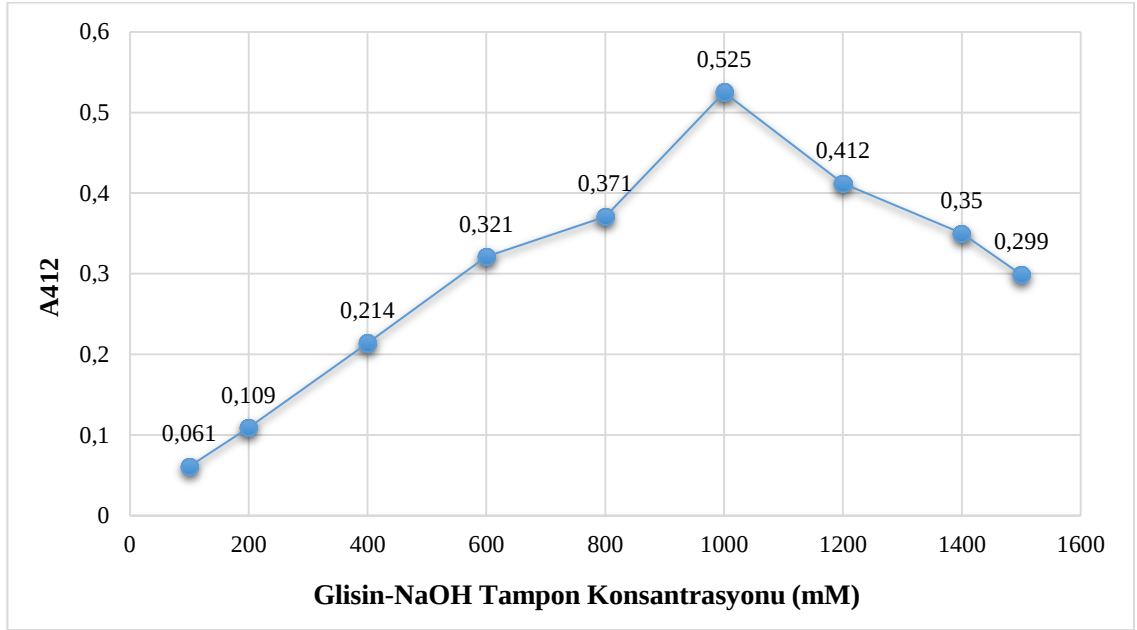
Çizelge 4.3. Farklı pH aralığındaki tamponlar kullanılarak elde edilen değerler

Na ₃ PO ₄ Tamponu		Tris-HCl Tamponu		Glisin-NaOH Tamponu	
pH Aralığı	EÜ/ml	pH Aralığı	EÜ/ml	pH Aralığı	EÜ/ml
5,5	0.003	7,5	0,012	9,0	0.26
6,5	0,006	8,0	0,023	9,5	0,16
7,5	0,015	8,5	0,032	10,0	0,17
8	0,015	9	0,081	10,5	0,14

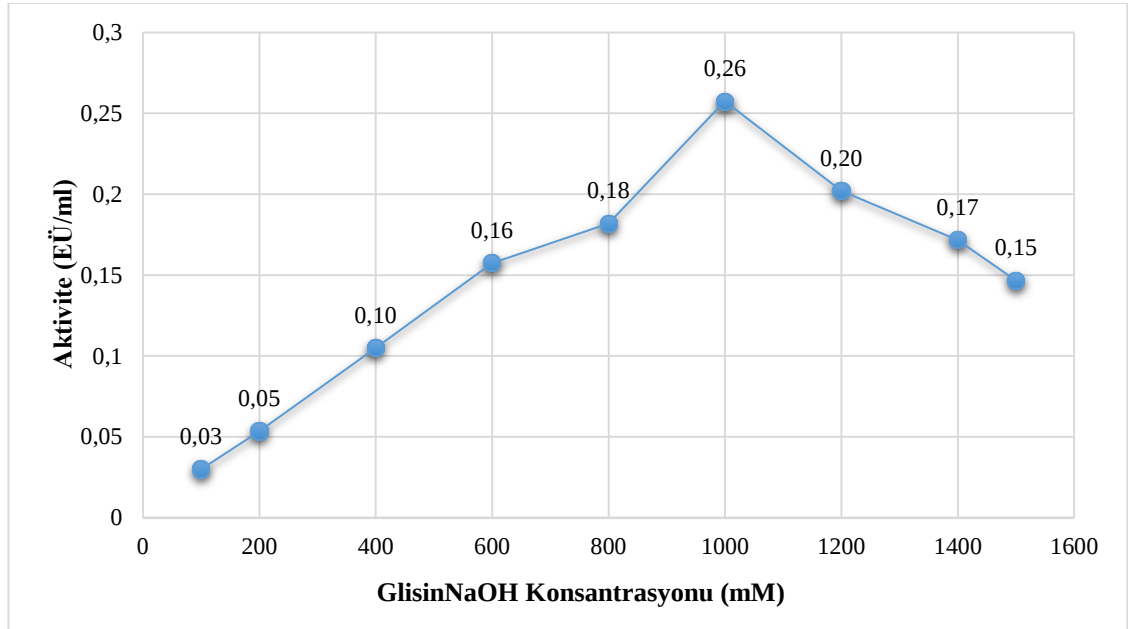
Yapılan ölçümler sonucunda insan beyninden elde edilen AChE enziminin *in vitro* ortamda optimum aktiviteyi glisin-NaOH tamponunda pH 9 bandında gösterdiği sonucu elde edildi.

4.10.4. Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi

Farklı Glisin-NaOH konsantrasyonlarında AChE aktivite ölçümleri yapılarak iyon miktarının enzimin aktivitesi üzerinde meydana getirdiği değişikliği gösteren grafik (Şekil 4.10 ve 4.11) çizildi.



Şekil 4.10. hAChE enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda Glisin-NaOH tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen absorbans değerleri

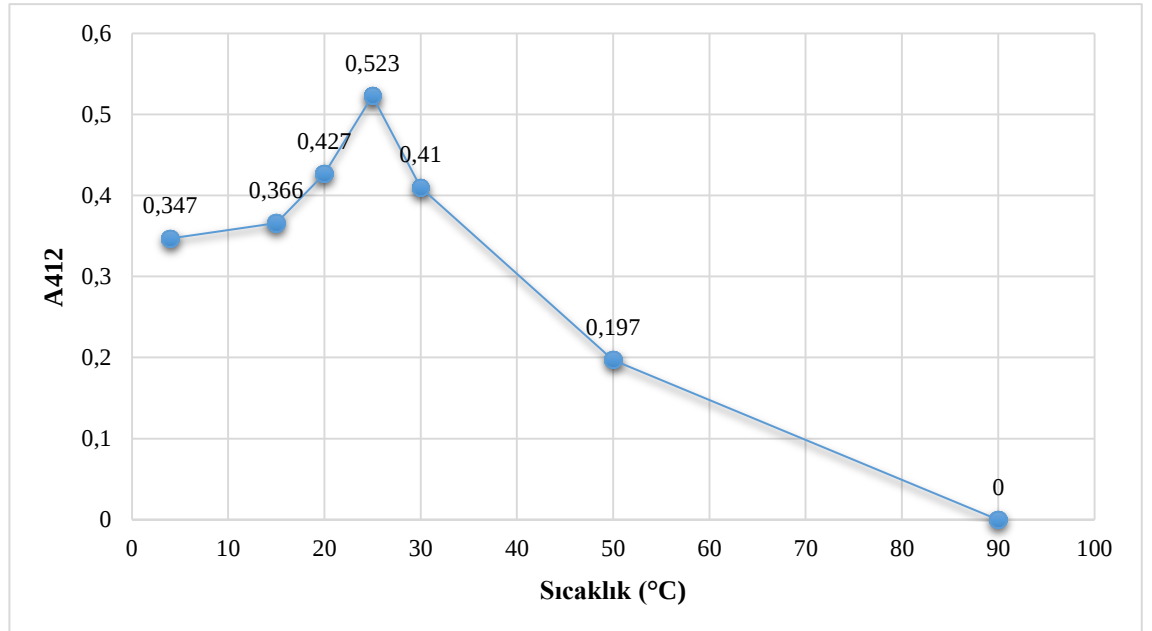


Şekil 4.11. hAChE enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda Glisin-NaOH tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen aktivite ölçüm sonuçları

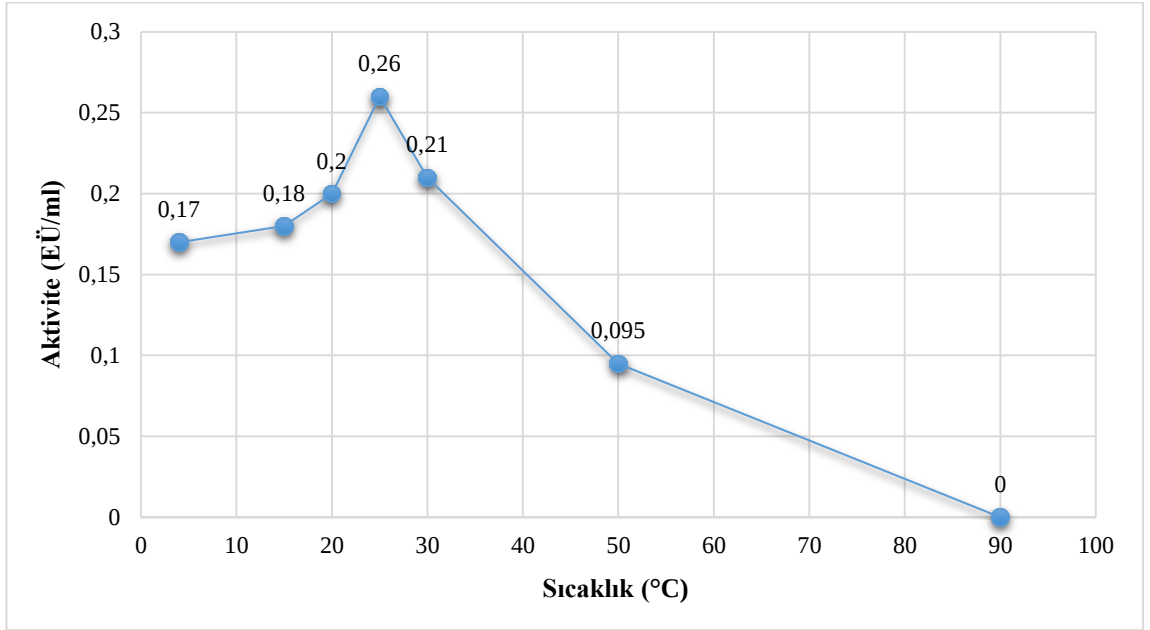
Yapılan ölçümler sonucunda AChE enziminin *in vitro* ortamda glisin NaOH tamponunda en iyi aktivite verdiği konsantrasyon 1M olarak belirlendi. Bu konsantrasyonun üzerindeki değerlerde ise aktivite kaybının yaşandığı gözlenmiştir.

4.10.5. Optimum sıcaklık belirlenmesi

Bu aşamada sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi araştırıldı. Çalışılan sıcaklıklar sonucu elde edilen absorbans ve aktivite değerleri aşağıda (Şekil 4.12 ve 4.13) belirtildiği gibidir;



Şekil 4.12. hAChE enzimine ait optimum sıcaklık şiddetini belirlemek için farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen absorbans değerleri

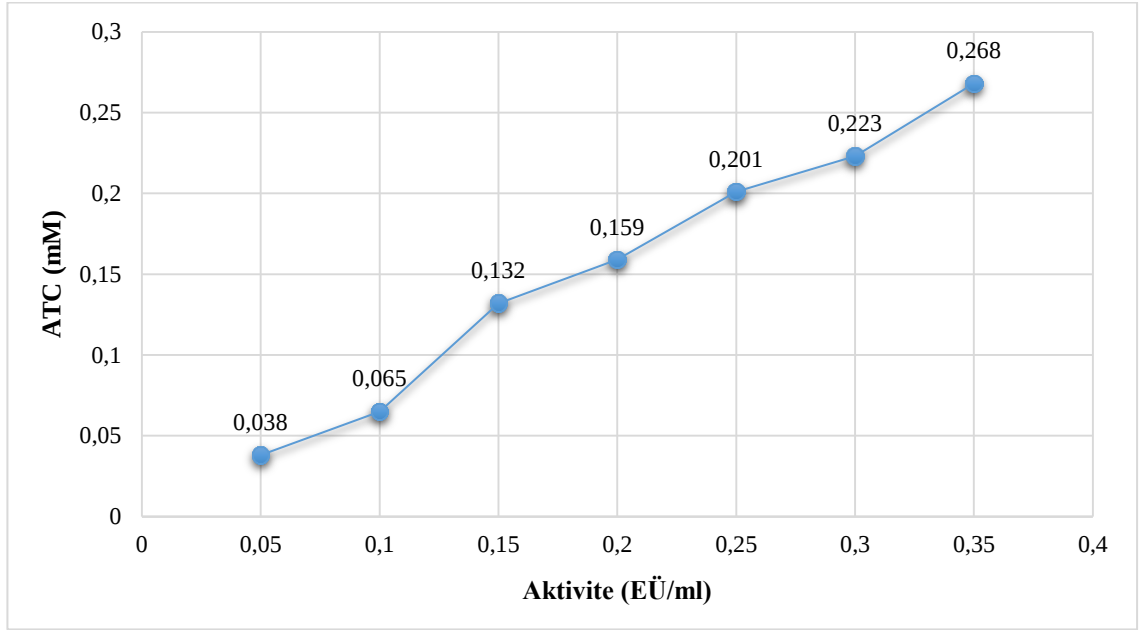


Şekil 4.13. hAChE enziminin optimum sıcaklık ölçümü için farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

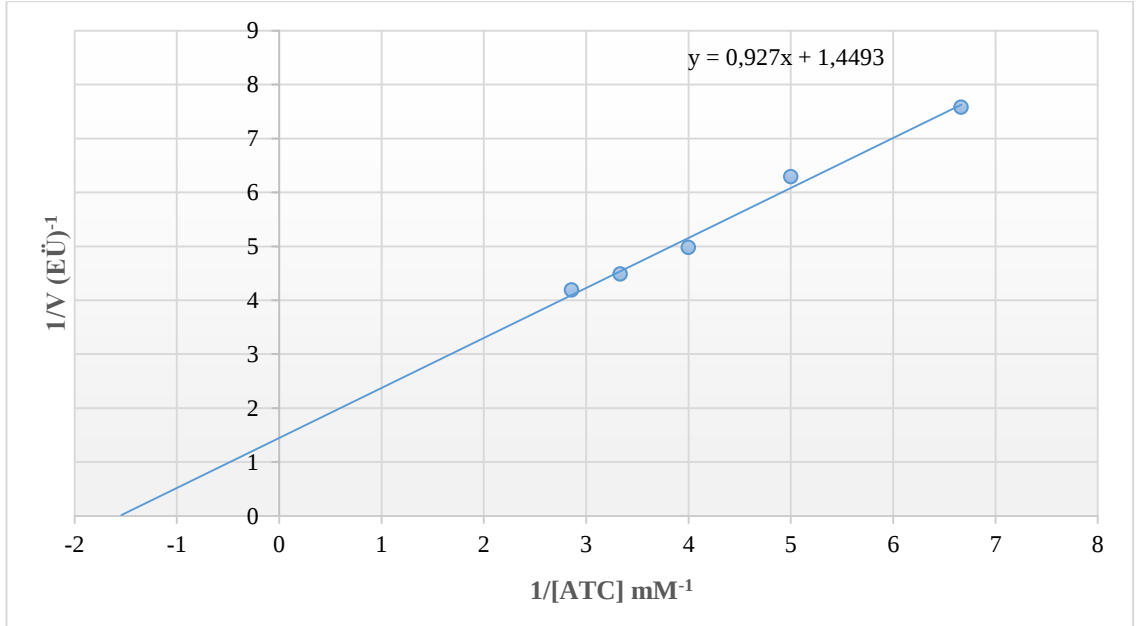
Yapılan ölçümler sonucunda AChE enziminin *in vitro* ortamda glisin NaOH tamponunda en iyi aktiviteyi oda sıcaklığı dolaylarında verdiği gözlemlendi.

4.10.6. ATC substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

ATC substratı için AChE enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla 7 farklı substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçümler sonucu elde edilen değerler Şekil 4.14'te verilmiştir. Bulunan bu değerlerle $1/[ATC]-1/V$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.15). Bu grafikten yararlanarak ATC için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Sonuçta $K_M=0,63$ mM ve $V_{max}=0,69$ EÜ/ml olarak bulundu.



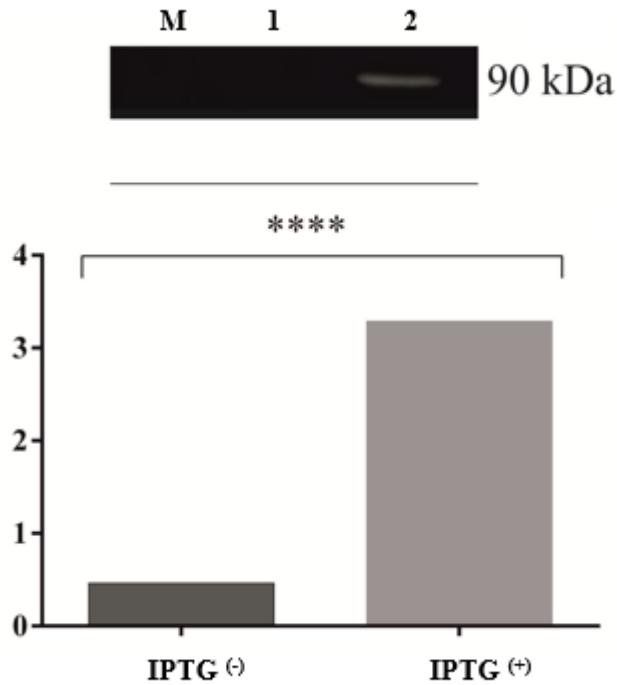
Şekil 4.14. AChE enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik ATC derişimi-aktivite çizelgesi



Şekil 4.15. hAChE enzimi için 5 farklı ATC konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiğı

4.10.7. Western blot analizi

Western blot analizi ile hem hedef proteinin olup olmadığı hem de IPTG'nin proteinin üretimine olan etkisi tespit edildi. IPTG ile indüklenen *E. coli* hücrelerinden elde edilen homojenatlarda rekombinant proteinin daha fazla miktardaki varlığı tespit edildi. Kontrol amaçlı olarak yapılan ve IPTG ile indüklenmeyen ortamdaki bakterilerin ise ilgili proteini bazal ifade dışında üretmediği tespit edildi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Western blot ile elde edilen bantlar ve bu bantlara ait ImageJ nispi yoğunluk sonuçları

M: Marker, 1: IPTG ile indüklenmeyen ortamdan elde edilen homojenat, 2: IPTG ile indüklenen ortamdan elde edilen homojenat

Elde edilen görüntü yorumlandığı zaman yaklaşık 90 kDa büyüklüğünde bir bant gözlenmiştir. İnsan AChE'na ait moleküler ağırlığı yaklaşık 70 kDa olarak hesaplanmaktadır (645 aa x 110 Da). Kullanılan vektörde bulunan SUMO proteininin ve 6xHis kuyruğunun Sumo Proteaz ile muamele edilip kesilmediği de hesaba katılırsa elde edilen bantın bizim ürünüme ait olduğu sonucu çıkarılabilmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada asetilkolinesteraz (AChE) enziminin insan beyin dokusundan klonlanması ve prokaryotik bir konak kullanılarak ekspresyonu amaçlanmıştır. Bu bağlamda spesifik primerler kullanılarak ilgili dokuya ait cDNA kütüphanesi içerisinde enzim kodlayan bölge izole edilmiştir. Elde edilen gen bölgesi klonlama amacıyla bir vektöre transfer edilmiştir. Daha sonra bu rekombinant vektör uygun bir ekspresyon konağına transfer edilerek enzimin üretimi sağlanmıştır. Üretilen protein uygun yöntemlerle hücreden alınıp kısmen saflaştırıldıktan sonra karakterizasyon için çeşitli uygulamalara tabi tutulmuştur.

Asetilkolinesteraz, kolinerjik nörotransmitterlerin katalitik hidrolizi ile transmisyonu sonlandıran alfa/beta hidrolaz süper ailesine dahil bir serin hidrolazdır (Silman and Sussman 2005). Yapılan araştırmalar enzimin hücre adezyonu (Deng *et al.* 2006; Paraoanu and Layer 2008), farklılaşması (Paul G Layer and Sporns 1987; Small *et al.* 1996; Xiang *et al.* 2008), sinaptogenez, dopamin nöronlarının aktivasyonu (Inestrosa *et al.* 1996) ve hücre proliferasyonu (Jin *et al.* 2004; C. Perry *et al.* 2004) gibi fonksiyonlarının da olduğunu kanıtlamıştır.

Bazı yeni çalışmalar ise asetilkolinesterazın apoptozis için marker ve regülatör olabileceğini göstermiştir (Park *et al.* 2004; Ye *et al.* 2015). Bu yüzden AChE'nin umut verici bir tümör süpresör olabileceği yönünde sonuçlar çıkarılabilmektedir (Lu *et al.* 2013).

Enzimi kodlayan gen insan genomunda 7. kromozomda yer almaktadır (Getman *et al.* 1992). Alternatif sıplays nedeniyle (Şekil 1.7) enzimin üç farklı izoformu meydana gelmektedir (Ruiz-Espejo *et al.* 2003). Tetramerik yapıda olan sinaptik form (AChE-S) beyin ve kas dokularında ifade edilir. Dimerik eritrositik form (AChE-E) insan eritrositlerinde yaygındır. Üçüncü form olan AChE-R ise kolinerjik sinapslarda stres cevabı oluşturulmasında rol alır (Massoulie *et al.* 2005; Montenegro *et al.* 2006).

Yapılan çalışmalar asetilkolinesterazın sahip olduğu yapısal dinamik ve ekspresyonel seviyede maruz kaldığı düzenlemeler nedeniyle farklı dokularda/hücrelerde farklı görevler üstlenebildiğinden dolayı enzimin çok yönlü (versatil) bir karakterde olduğunu göstermiştir (Tripathi and Srivastava 2010). Bu sebeple farklı canlılara ait veya aynı canlıdaki farklı dokulardan elde edilen enzimin substrata olan ilişkisinin farklılık göstermesi (Çizelge 5.2) olağan bir durum olarak kabul edilmektedir.

AChE öncelikli olarak merkezi ve periferel sinir sisteminde eksprese edilmesine rağmen farklı izoformları çeşitli hücre tiplerinin öncüsü olan insan fibroblast hücrelerinde, osteoblastlarda, sıçan böbrek ve lökosit hücrelerinde de ifade edilmektedir. Aynı zamanda sinir sonlanmaları, akciğer ve dalak gibi dokularda da eksprese edilen bir enzimdir (Patocka *et al.* 2004). Enzim, bu gibi dokularda bilinen rolünün haricinde mikrotübül oluşumu, apoptotik duyarlılık, hücresele proliferasyon ve farklılaşma gibi tümöröenezle ilişkili işlevlere sahiptir (Layer and Willbold 1995; Small *et al.* 1996; Soreq and Seidman 2001). AChE'nin inflamasyonla alakalı stres cevabıyla da ilişkili olduğu bildirilmiştir (Pick *et al.* 2006; Shaked *et al.* 2009).

AChE'nin Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların patöenezinde merkezi rol oynadığı inancı birçok çalışmayı bu enzimin inhibe edilmesine yönelik stratejiler geliştirme üzerine yoğunlaştırmıştır (Toiber *et al.* 2008). Bunun tam aksine, AChE aktivitesinin artışının terapötik strateji olarak benimsenmesi üzerine yönelik görüşler bildirilmiştir. Bugüne kadar birçok çalışmada AChE'nin insan kolon kanseri (Park *et al.* 2004) ve insan beyin tümörü gibi çeşitli apoptotik sistemlerde arttırıldığı ve indüklenen AChE miktarı ile antikarsinojen apoptozisin arttığı gözlenmiştir (Birikh *et al.* 2003; Park *et al.* 2004; Xu *et al.* 2014).

Nörodejeneratif hastalıklar, nörolojik hastalıkların bir türü olup genelde nöronların zamanla işlevlerini kaybedip nihayetinde hücrenin ölmesi ile kendilerini gösterirler. Günümüzde bu hastalıkların oluşmasının nedenleri ve patolojik mekanizmaları henüz tam olarak açıklanmış değildir (Lu *et al.* 2013). Birçok nörodejeneratif hastalık kolinerjik sistemde meydana gelen bozukluklarla karakterize edilmektedir. Bu sebeple

ilgili hastalıkların tedavisi için kolinerjik sistem bileşenlerinin inhibisyonu veya bu bileşenlerin hedef aldığı moleküllerin miktarının hep optimum düzeyde tutulması en yaygın ve başarı olasılığı en yüksek yaklaşım olarak görülmektedir (Holzgrabe *et al.* 2007). Fakat bu tip hastalıklar genelde ilerleyici özellik gösterdikleri için mevcut tedavi stratejileri de sadece hastalığın patogenezinde görülen ilerlemeyi yavaşlatabilmektedir (Dorronsoro *et al.* 2003).

Proteinler oldukça dinamik ve farklı rolleri olan, metabolizmada biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen, hücre membranında reseptör ve kanal oluşumunda görev alan, hücre içinde ve dışında farklı molekülleri taşıyabilen makro moleküllerdir. İnsan genomunda tahminen 20-05 bin civarında farklı protein olduğu düşünülmektedir. Ancak proteinlerin oluşumunda meydana gelen alternatif sıplays, translasyon sonrası modifikasyonlar ve protein etkileşimleri de göz önünde bulundurulduğunda bu sayının daha fazla olabileceği varsayılmaktadır (Crollius *et al.* 2000; Peri *et al.* 2003).

Proteinler bilimsel araştırmalarda, tıpta ve endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılan biyomoleküllerdir. Ancak bu molekülleri doğal ortamlarından almak oldukça zor ve pahalı bir işlemdir. Benzer şekilde farmasötik özellikli bir proteini doğal ortamından alınan haliyle kullanmak büyük bir risktir. Bunun en büyük örneği olarak günümüzde birçok insanın kontamine kan ürünleri veya hormonlarda hastalık etkeni kapmaları gösterilebilir. Diğer bir grup ise tek zincir FV fragmentleri (scFvs) gibi doğal olarak bulunamayan proteinlerdir ki bunların elde edilmesi ancak rekombinant protein teknolojisi ile mümkün olabilmektedir (Ma *et al.* 2003). Geleneksel üretim sistemlerinde çoğunlukla kullanılan konaklar ve bu konaklardan elde edilecek ürün kalitesi ve miktarı gibi parametreler (Çizelge 5.1) değişiklik gösterebilmektedir (Houdebine 2000; Swartz 2001).

Proteinler farmakoloji alanında ilk olarak 1920'lerin başlarında domuz pankreasından ekstrakte edilen insülinle kullanılmaya başlanmıştır. 1980'lerin başlarında günümüzde diyabet hastalarının tedavisinde kullanılmakta olan insan insülini bakterilerde üretilmeye başlanmıştır. Bu şekilde elde edilen proteinlerin miktarı gün geçtikçe

artmaktadır. Ancak buradaki tek engelleme bakteriler gibi düşük kapasiteli konaklar kullanıldığında katlanma, alt birim birleşimi, karboksilasyon ve glikolizasyon gibi bazı modifikasyonların gerçekleştirilememesi nedeniyle elde edilen ürünlerin biyolojik olarak istenen olgunlukta olmamasıdır (Houdebine 2009). Bakterilerde glikolizasyon kabiliyeti yoktur ancak söz konusu işlem sadece bazı proteinlerin katlanması için gerekli olduğundan dolayı bu eksiklik görmezden gelinebilmektedir.

Çizelge 5.1. Rekombinant insan farmasötik proteinler için kullanılan üretim sistemlerinin karşılaştırılması (Ma *et al.* 2003)

Sistem	Maliyet	Üretim Süresi	Üretim Kapasitesi	Ürün Kalitesi	Glikolizasyon	Kontaminasyon Riski	Depolama Maliyeti
Bakteri	Düşük	Kısa	Yüksek	Düşük	Yok	Endotoksinler	Orta
Maya	Orta	Orta	Yüksek	Orta	Yanlış	Düşük Risk	Orta
Memeli Hücre Kültürü	Yüksek	Uzun	Çok Düşük	Çok Yüksek	Tam	Virüs, Prion ve Onkogenik DNA	Pahalı
Transjenik Hayvanlar	Yüksek	Çok Uzun	Düşük	Çok Yüksek	Tam	Virüs, Prion ve Onkogenik DNA	Pahalı
Bitki Hücre Kültürü	Orta	Orta	Orta	Yüksek	Küçük farklılıklar	Düşük	Orta
Tranjenik Bitkiler	Çok Düşük	Uzun	Çok Yüksek	Yüksek	Küçük farklılıklar	Düşük	Ucuz

Rekombinant proteinleri kullanmanın en büyük avantajı tartışmasız yüksek saflıkta ve güvenilirlikte olmalarıdır. 1980’lerde hemofili hastalarının yaklaşık %60’ı plazmadan saflaştırılıp hastaya transfer edilen Faktör VIII nedeniyle HIV virüsüne maruz kalmıştır. Günümüzde ise böyle bir durum asla söz konusu olmamaktadır (Palomares *et al.* 2004). Belki de rekombinant proteinlerin kullanımına sıcak bakılmasının en önemli nedeni de böylesi bir kontaminasyon riski taşımasıdır.

Rekombinant proteinler, tedavi edici özelliklerinin yanı sıra direk besin kaynağı, besin maddesi işleme süreci ve biyolojik mücadele gibi birçok farklı amaçla da insanoğlunun kullanımına sunulmaktadır (Olempska-Beer *et al.* 2006; Chung and Kim 2007). Rekombinant proteinlerin tıp alanında kullanılmasının önemli gerekçeleri vardır;

1. Proteinler tarafından sunulan spesifik ve kompleks fonksiyonlar başka doğal olmayan moleküller tarafından taklit edilemez.
2. Sahip oldukları hedef spesifik etkiden dolayı diğer biyolojik işlemleri engelleyerek olumsuz bir etki oluşturmazlar.
3. Vücutta doğal olarak üretildikleri için tehdit olarak algılanıp immün cevap oluşumunu tetiklemezler.
4. Proteinler, bir gende meydana gelen mutasyon veya delesyon sonucu oluşan hastalıklarda gen terapisine ihtiyaç kalmadan tedavi imkanı sunabilmektedir.
5. Terapötik özellikli rekombinant proteinlerin klinik süreçlerden geçmesi ve Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA; Food and Drug Administration) tarafından onay alması kimyasal moleküllere göre daha hızlıdır (Leader *et al.* 2008).

Rekombinant proteinler rekombinant olmayanlara göre birçok avantaja sahiptirler;

1. Doğal hallerine çok yakın oldukları için immünolojik yönden reddedilme sorunları olmaz.
2. Genellikle etkin bir şekilde, ucuz ve sınırsız miktarda üretimleri yapılabilir.
3. İzole konaklar kullanılarak elde edildikleri için insan veya hayvan hastalık etkenleri ile kontamine olma riskleri yoktur.

4. Rekombinant proteinler moleküler teknikler kullanılarak elde edildikleri için ilgili protein üzerinde aktivite veya spesifite arttırıcı manipölasyonlar yapılabilmektedir.
5. Elde edilen doğal tip veya manipüle edilmiş bir protein, o proteine karşı yeni ilaç, inhibitör, aktivatör veya düzenleyici, taşıyıcı gibi özellikleri olan bir kimyasal geliştirilmesinde uygun bir model olabilmektedir.
6. Protein üzerinde yapılabilen değişiklikler sonucu ilgili proteine yeni fonksiyon kazandırılabilir (Barton *et al.* 1991; Whittington and Goa 1992).

Terapötik özelliği olan proteinlerin kararlılığını sağlamak veya onlar için uygun bir tamponlama aralığı temin etmek oldukça önemlidir. Söz konusu proteinler için en uygun pH aralığının neden çok dar olduğu henüz tam olarak açıklanamamıştır. pH aralığının yanı sıra tampon konsantrasyonu da proteine ait fiziksel kararlılığın sağlandığı tamponlama kapasitesi üzerinde etkili olduğu için oldukça önemlidir (Kim *et al.* 2014). İyon konsantrasyonunun artışı ortamı alkali yaptığı için özellikle asidik kalıntılar nötralize olabilmektedir (Hurrell and Cameron 2003). Bu bilgiler baz alınarak düşünüldüğünde katalitik aktivitesi ile ön plana çıkan AChE enziminin aktivite gösterebilmesi için pH değerinin ne denli kritik olduğu sonucu çıkarılabilmektedir. Enzimin aktif sitenin bulunduğu geçitte konumlanan birkaç asidik kalıntı bulunmaktadır (Dvir *et al.* 2010). Optimizasyon çalışmalarında denenen iyon konsantrasyonlarındaki artışın bu kalıntılara etki ederek substrata olan ilgiyi azaltabileceği ve aktivitenin bu yüzden düşüş gösterdiği (Şekil 4.11) düşünülmektedir.

Daha önce yapılan benzer çalışmalarda da (Fischer 1995; Carvalho *et al.* 2005) görüldüğü gibi rekombinant olarak elde edilmiş farklı dokulara ait insan AChE enzimi optimum aktivite için 22 – 37°C sıcaklık ve pH 8-10 aralığında bir tamponlama gereksinimi duymaktadır. Çalışmada bu yönde elde edilen sonuçlar (Şekil 4.11 ve 13) literatürle kıyaslandığında yine aykırılık göstermemektedir.

Enzim temelli işlemlerde, enzimin kinetik özellikleri ile ilgili bilgiler akla gelen en önemli sorulardır. Reaksiyon hızı (V), K_M ve V_{max} gibi parametreler üzerinden enzimin substratla ve çevresiyle gösterdiği ilişkiye/uyuma bakılarak elde edilen ürünün kalitesi

hakkında fikir öne sürülebilmektedir (Beg *et al.* 2002). Bu açıdan değerlendirildiğinde yapılan çalışmada elde edilen K_M ve V_{max} değerlerinin enzimin reaksiyon hızı ve substrat spesifikliği açısından bu yöndeki literatürlerle karşılaştırıldığında (Çizelge 5.2) iyi bir konumda olduğu sonucu çıkarılmaktadır.

Çizelge 5.2. Farklı çalışmalarda elde edilen AChE'a ait kinetik değerler

K_M (mM)	V_{max}	Enzimin elde edildiği canlı	Referanslar
2.06	4.97	Yılan balığı	Pohonka <i>et al.</i> 2011
2.63	4.36	Sıçan (serebrum)	Pal and Chaudhuri 2006
4.54	6.69	Sıçan (hipotalamus)	
1.8	-	Karasinek	Walsh <i>et al.</i> 2001
0.98	-	İnsan	Dave <i>et al.</i> 2000
0.1	-	İnsan (beyin)	Herkert <i>et al.</i> 2012
0.25	-	Balık (beyin)	Moss and Fahrney 1978
0.769	0.189	Kelebek balığı	Silva <i>et al.</i> 2013
1.38	-	Buzağı (kaudat nükleus)	Jackson and Aprison 1966
1.47	-	Kobay (beyin)	
4.9	-	İnsan (beyin)	Zech and Domagk 1975

SUMO proteinleri, ubikuitinler gibi hedef proteine konjuge olmadan önce öncü bir formda sentez edilirler. Bu iki gruplar arasındaki temel fark ise ubikuitinlerin bir proteine hedeflenmesi onun degradasyonu amacıyla yapılırken SUMO hedeflemesi yapılan protein üzerinde nükleer transport, transkripsiyonel regülasyon ve protein kararlılığı gibi hücresel işlemler gerçekleşmektedir (Boggio *et al.* 2004). Özellikle *E. coli* gibi düşük seviyeli konaklarda verimli ve çözünebilir formda rekombinant protein üretimi yapmak karşılaşılan en önemli sorunların başında gelmektedir (Wang *et al.* 2010). Bu problemi aşmak için füzyon proteinlerinin kullanımı, promotör alterasyonu ve şaperon ko-ekspresyonu gibi yaklaşımlar tercih edilmektedir (Thomas and Baneyx 1997; Zhang *et al.* 1998).

Füzyon proteinleri hedef proteinin ekspresyonunu ve düzgün katlanmasını sağlamasının yanı sıra ilgili proteini degerdasyondan korur, saflaştırma ve tespit işlemlerinde kolaylık sağlar. Bu nedenle rekombinant üretim tekniklerinde oldukça sık bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır. Yaygın olarak kullanılan füzyon proteinlerinin başında maltosebinding protein (MBP) (Pryor and Leiting 1997) , NUS A (De Marco *et al.* 2004), glutathione S-transferase (GST), ubikuitin (Ub), thioredoxin (TRX) (LaVallie *et al.* 1993) ve SUMO'dur (Catanzariti *et al.* 2004).

Yaklaşık 100 aa'ten oluşan SUMO'nun moleküler ağırlığı 11 ila 20 kDa civarlarındadır (Marblestone *et al.* 2006; Dorval and Fraser 2006; Herrmann *et al.* 2007). Western blot görüntüsü (Şekil 4.16) incelendiğinde hedef protein üzerinde füzyon ekinin ve His kuyruğunun olduğu da hesap edilirse His antikoru ile elde edilen yaklaşık 90 kDa'luk bantın doğru olduğu sonucu çıkarılabilmektedir.

Tıp, genetik ve proteinler üzerinde sahip olunan bilgi düzeyindeki artışa bağlı olarak hastalıkların mekanizmalarını anlama ve tedavi yaklaşımları açısından yeni bir çağa yaklaşmaktadır. Günümüzde bu konuda otorite olarak kabul edilen birimler tarafından kabul görmüş, tedavi ve/veya *in vitro* model olarak kullanılabilirliğine onay verilmiş antikor, aşı, doğal interferon ve enzimler gibi birçok rekombinant insan proteini mevcuttur (Leader *et al.* 2008).

Gelecekte de bu amaçla kullanılacak binlerce insan veya başka organizmalara ait proteinlerin elde edilmesi olası bir durumdur. Ayrıca bu rekombinant ürünler sinerjistik etki gösterebilecek diğer küçük moleküllerle kombine edilerek de kullanılabilir (Cunningham *et al.* 2004). Gelişen teknolojik imkanlar, yeni üretim metotları ve bugüne kadar elde edilmiş veriler kullanılarak daha ucuz ve fazla miktarda ürün elde edilmesi öngörülmektedir. Birçok biyoteknoloji ve farmakoloji firmasına ait protein üretim birimleri ilaç keşfi konusunda oldukça ciddi bir öneme sahiptir. Bu birimler rekombinant proteinleri kullanarak ilaç keşfinde anahtar role sahip yolların anlaşılması, hedef doğruluğu ve yapısal biyoloji gibi adımların anlaşılmasına katkıda

bulunmaktadırlar. Dolayısıyla hızlı ve yüksek verimlilikle rekombinant ürün elde etmek böylesi firmalar için en önemli amaç konumundadır.

Tez kapsamında;

1. İnsan beyin dokusundan elde edilmiş cDNA kütüphanesi içerisinde AChE enzimine ait gen bölgesi tasarlanan primerlerin kullanıldığı PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı.
2. PCR ürünü A-T klonlama yöntemi ile pET-SUMO vektörüne klonlandı ve klonlama konağına transfer edildi.
3. Doğru rekombinant plazmit tespit edilip ekspresyon konağına transfer edildi.
4. Vektörü taşıyan hücreler indükleyici bir ajanın olduğu besiyerinde uygun koşullarda büyütüldükten sonra parçalanıp hücre içeriği açığa çıkarıldı.
5. Hücre lizatın yoğunlaştırıldıktan sonra Afinite kromatografisi yardımıyla hedef protein ayrı olarak elde edildi.
6. Kısmen saflaştırılan ürün spesifik aktivite tayin yöntemi ve western blot analizi ile doğrulandı.
7. Ürüne ait optimum iyonik şiddet, optimum pH, optimum sıcaklık gibi biyokimyasal parametreler test edildiğinde en iyi aktivitenin 1M pH 9 Glisin-NaOH tamponunda oda sıcaklığında elde edildiği görüldü
8. Enzime ait kinetik parametreler $K_M=0,63$ mM ve $V_{max}=0,69$ EÜ/ml olarak tespit edildi.

Bu şekilde bilgilerin elde edildiği bilimsel çalışmalar ve güncel magazinler göz önünde bulundurulduğunda terapötik amaçlı kullanıma uygun, elde edilmesi zahmetli proteinlerin kolay bir şekilde üretilmesinin etkin değeri tartışmasız önemli bir yere sahiptir. Bu sebeple mevcut çalışmada elde edilen verilerin gerek literatüre sağlayacağı katkı gerekse de rekombinant üretiminin temel hedefi olan kısa sürede verimli ürün elde etme amacına uygun bir yaklaşım sunabileceği düşünülmektedir.

Öneriler;

1. Asetilkolinesteraz enzimi oldukça hassas, aktivitesini hızlı kaybedebilen bir enzimdir. Yönlendirilmiş mutasyon oluşturma yöntemleri gibi manipülatif teknikler yardımıyla enzimin aktif bölgesi üzerinde yapılan değişikliklerle kararlılığını arttırarak ilk andaki aktivitesini daha uzun süre koruyabilen, gerek endüstriyel gerekse de terapötik alanda daha kullanışlı ürünler edilebilmesi imkan dahilindedir.

2. Bakteriyal üretim sistemleri rekombinant ürün üretimi için oldukça elverişli modeller olduğu literatürce sabittir. Ancak bu sistemlerin en büyük dezavantajı büyüme ortamının belli seviyeden sonra yeterli olamayışı nedeniyle bir noktadan sonra üretim yapamamalarıdır. Günümüzde biyoreaktör/fermentör adı verilen özellikle mikrobiyal modeller için özelleştirilmiş sistemler kullanılmaktadır. Bahsedilen sistemlerle mikrobiyal biyokütle, enzim, metabolit ve rekombinant ürünlerin üretimi daha büyük ölçeklerde yapılabilmektedir. Çalışmamızda ürün miktarının ve verimliliğin çok küçük bir hacimden elde edildiği göz önünde bulundurulursa üretimin bu tip araçlar kullanılarak yapıldığı zaman daha iyi neticeler alınabileceği düşünülmektedir.

3. Protein üretiminde kullanılan ekspresyon konaklarının neredeyse hepsinde görülebilen bir diğer olumsuz durum ise inklüzyon cisimcikleri olarak adlandırılan hücre içi yapıların oluşumudur. Bu veziküller, üretilen proteini tehdit olarak algılayıp kendi içlerine paketler. Protein kısmi bir muhafaza içinde olacağı için spesifik enzim aktivitesi ölçümlerinde bile çalışmacıyı yanlış yönlendirip, proteinin hiç üretilmediği düşüncesine sevk etmektedir. Söz konusu yapıları parçalayıp ilgili proteini serbest hale getirebilmek için günümüzde ticari amaçlı üretilen kitler ve/veya ayıraçlar bulunmaktadır. Ancak izolasyon süreci diyaliz gibi uzun ve zahmetli basamakları içerdiği için özellikle enzim olarak işlev gösteren proteinlerde aktivite kayıplarına neden olmaktadır.

Bu istenmeyen durumu ortadan kaldırmak üretilen proteine yüksek afinitesi olan nanopartiküller kullanılarak proteinlerin vezikül oluşumundan önce bu yapılara

bağlanması veya vezikül bütünlüğünü bozucu partiküllerle hücreye ek bir kimyasal uygulaması söz konusu olmadan enzimin serbest hale getirilebilmesi söz konusu olabilir. Böylelikle enzim bütünlüğünü bozabilecek vezikül parçalama, tekrar katlanma (refolding) ve saflaştırma gibi zaman ve maliyet gerektiren işlemler yapılmadan hedefe ulaşılabilceğı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- Anonymus. 2015. <http://www.pearsonhighered.com/educator/product/Alzheimers-Disease-Booklet/9780131838345.page>.
- Atanasova, E., Chiappa, S., Wieben, E., and Brimijoin, S., 1999. Novel messenger RNA and alternative promoter for murine acetylcholinesterase. *J Biol Chem*, 274(30), 21078-21084.
- Azevedo, F.A., Carvalho, L.R., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E., Leite, R. E., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, 513(5), 532-541.
- Bano, D., Zanetti, F., Mende, Y., Nicotera, P., 2011. Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell death & disease*, 2(11), e228.
- Barton, N. W., Brady, R. O., Dambrosia, J. M., Di Bisceglie, A. M., Doppelt, S. H., Hill, S. C., Mankin, H.J., Murray, G.J., Parker, R.I., Argoff, C.E., 1991. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med*, 324(21), 1464-1470. doi: 10.1056/NEJM199105233242104
- Barzilai, A., 2010. DNA damage, neuronal and glial cell death and neurodegeneration. *Apoptosis*, 15(11), 1371-1381. doi: 10.1007/s10495-010-0501-0
- Beg, Q. K., Saxena, R. K., and Gupta, R., 2002. Kinetic constants determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology. *Biotechnology and bioengineering*, 78(3), 289-295.
- Bertram, L., and Tanzi, R.E., 2005. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115(6), 1449.
- Birikh, K. R., Sklan, E. H., Shoham, S., and Soreq, H., 2003. Interaction of "readthrough" acetylcholinesterase with RACK1 and PKC β II correlates with intensified fear-induced conflict behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(1), 283-288. doi: 10.1073/pnas.0135647100
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., Schäfer, F., 2009. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol*, 463, 439-473. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63027-5
- Blokland, A., 1995. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Brain Res Rev*, 21(3), 285-300.
- Boggio, R., Colombo, R., Hay, R. T., Draetta, G. F., & Chiocca, S., 2004. A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Molecular cell*, 16(4), 549-561.
- Branzei, D., and Foiani, M., 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(4), 297-308. doi: 10.1038/nrm2351
- Brown, S. S., Kalow, W., Pilz, W., Whittaker, M., and Woronick, C. L., 1981. The plasma cholinesterases: a new perspective. *Adv Clin Chem*, 22, 1-123.
- Callahan, B. P., and Miller, B. G., 2007. OMP decarboxylase-an enigma persists. *Bioorganic chemistry*, 35(6), 465-469.
- Carvalho, F.A., Graça, L.M., Martins-Silva, J., and Saldanha, C., 2005. Biochemical characterization of human umbilical vein endothelial cell membrane bound acetylcholinesterase. *FEBS Journal*, 272(21), 5584-5594.

- Catanzariti, A. M., Soboleva, T. A., Jans, D. A., Board, P. G., & Baker, R. T., 2004. An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins. *Protein Science*, 13(5), 1331-1339.
- Chan, R. Y., Boudreau-Larivière, C., Angus, L. M., Mankal, F. A., Jasmin, B. J., 1999. An intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse-and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4627-4632.
- Chiti, F., and Dobson, C. M., 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*, 75, 333-366. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901
- Chung, S., and Kim, S.D., 2007. *Escherichia coli* can produce recombinant chitinase in the soil to control the pathogenesis by *Fusarium oxysporum* without colonization. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(3), 474-480.
- Čolović, M. B., Krstić, D. Z., Lazarević-Pašti, T. D., Bondžić, A. M., and Vasić, V. M., 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315.
- Coussen, F., Bonnerot, C., and Massoulie, J., 1995. Stable expression of acetylcholinesterase and associated collagenic subunits in transfected RBL cell lines: production of GPI-anchored dimers and collagen-tailed forms. *Eur J Cell Biol*, 67(3), 254-260.
- Crollius, H. R., Jaillon, O., Bernot, A., Dasilva, C., Bouneau, L., Fischer, C., Fizames, Wincker, P., Brottier, P., Quétier, F., Saurin, W., Weissenbach, J., 2000. Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using *Tetraodon nigroviridis* DNA sequence. *Nature genetics*, 25(2), 235-238.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., and Anfinsen, C. B., 1968. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61(2), 636-643.
- Cummings, J. L., 2004. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 351(1), 56-67. doi: 10.1056/NEJMr040223
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Muesser, M., Harstrick, A., Versluis, C., Chau, I., Cutsem, E.V., 2004. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 351(4), 337-345. doi: 10.1056/NEJMoa033025
- Dave, K. R., Syal, A. R., and Katyare, S. S. 2000. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(1-2), 100-108.
- De Marco, V., Stier, G., Blandin, S., & De Marco, A., 2004 The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochemical and biophysical research communications*, 322(3), 766-771.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., Van Leuven, F., 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391(6665), 387-390. doi: 10.1038/34910
- DeMattos, R. B., Brendza, R. P., Heuser, J. E., Kierson, M., Cirrito, J. R., Fryer, J., Sullivan, P.M., Fagan, A.M., Han X., Holtzman, D. M., 2001. Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing

- lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochem Int*, 39(5-6), 415-425.
- Deng, R., Li, W., Guan, Z., Zhou, J. M., Wang, Y., Mei, Y. P., Li, M.T., Feng, G.K., Huang, W., Liu, Z.C., Han, Y., Zeng, Y.X., Zhu, X. F., 2006. Acetylcholinesterase expression mediated by c-Jun-NH2-terminal kinase pathway during anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene*, 25(53), 7070-7077. doi: 10.1038/sj.onc.1209686
- Descarries, L., Gisiger, V., and Steriade, M., 1997. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol*, 53(5), 603-625.
- Di Carlo, M., Giacomazza, D., San Biagio, P., Picone, P., and Carrotta, R., 2011. Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes: Different Pathologies and Same Features. INTECH Open Access Publisher.
- DiFiglia, M., 1990. Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci*, 13(7), 286-289.
- Dobson, C.M., 2003. Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968), 884-890.
- Doraiswamy, P.M., 2002. Non-cholinergic strategies for treating and preventing Alzheimer's disease. *CNS drugs*, 16(12), 811-824.
- Dorronsoro, I., Castro, A., and Martinez, A., 2003. Peripheral and dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase as neurodegenerative disease modifying agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 13(11), 1725-1732.
- Dorval, V., & Fraser, P.E., 2006. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 9919-9924.
- Drouet, B., Pincon-Raymond, M., Chambaz, J., and Pillot, T., 2000. Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*, 57(5), 705-715.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., and Sussman, J. L., 2010. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-biological interactions*, 187(1), 10-22.
- El Mestikawy, S., Wallen-Mackenzie, A., Fortin, G. M., Descarries, L., and Trudeau, L. E., 2011. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci*, 12(4), 204-216. doi: 10.1038/nrn2969
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., and Feather-Stone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.
- Erdoğan, O., Adıgüzel, A., Aşkın, H., Şişecioğlu, M., Taşkın, M., Budak, H., Anar, M., Unver, Y., Ceylan, H., Yıldız, M., Baltacı, M.Ö., 2014. *Erzurum*, 195, Türkiye.
- Erickson, J.D., & Varoqui, H., 2000. Molecular analysis of vesicular amine transporter function and targeting to secretory organelles. *The FASEB Journal*, 14(15), 2450-2458.
- Fischer, M., Ittah, A., Gorecki, M., and Werber, M.M., 1995. Recombinant human acetylcholinesterase expressed in *Escherichia coli*: refolding, purification and characterization. *Biotechnology and applied biochemistry*, 21(3), 295-311.
- Fitzpatrick-McElligott, S., and Stent, G. S., 1981. Appearance and localization of acetylcholinesterase in embryos of the leech *Helobdella triserialis*. *J Neurosci*, 1(8), 901-907.

- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K., 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66(2), 137-147.
- Freeman, J.J., & Jenden, D. J., 1976. The source of choline for acetylcholine synthesis in brain. *Life sciences*, 19(7), 949-961.
- Galyam, N., Grisaru, D., Grifman, M., Melamed-Book, N., Eckstein, F., Seidman, S., Eldor, A., Soreq, H., 2001. Complex host cell responses to antisense suppression of ACHE gene expression. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 11(1), 51-57. doi: 10.1089/108729001750072128
- Getman, D., Eubanks, J., Camp, S., Evans, G., and Taylor, P., 1992. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *American journal of human genetics*, 51(1), 170.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., and Soreq, H., 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem*, 264(3), 672-686.
- Handley, O. J., Morrison, C. M., Miles, C., and Bayer, A. J., 2006. ApoE gene and familial risk of Alzheimer's disease as predictors of odour identification in older adults. *Neurobiol Aging*, 27(10), 1425-1430. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.08.001
- Hardy, J., and Selkoe, D. J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356. doi: 10.1126/science.1072994
- Hefti, M. H., Van Vugt-Van der Toorn, C. J., Dixon, R., and Vervoort, J., 2001. A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal Biochem*, 295(2), 180-185. doi: 10.1006/abio.2001.5214
- Herkert, N. M., Freude, G., Kunz, U., Thiermann, H., & Worek, F. 2012. Comparative kinetics of organophosphates and oximes with erythrocyte, muscle and brain acetylcholinesterase. *Toxicology letters*, 209(2), 173-178.
- Herrmann, J., Lerman, L. O., & Lerman, A., 2007. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circulation research*, 100(9), 1276-1291.
- Hochuli, E., Dobeli, H., and Schacher, A., 1987. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr*, 411, 177-184.
- Holcomb, L., Gordon, M. N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'campo, K., Hardy, J., Prada, C.M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K., Duff, K., 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med*, 4(1), 97-100.
- Holzgrave, U., Kapkova, P., Alptuzun, V., Scheiber, J., and Kugelmann, E., 2007. Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opin Ther Targets*, 11(2), 161-179. doi: 10.1517/14728222.11.2.161
- Houdebine, L. M., 2000. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res*, 9(4-5), 305-320.
- Houdebine, L. M., 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 32(2), 107-121. doi: 10.1016/j.cimid.2007.11.005

- Hurrell, S., and Cameron, R.E., 2003. The effect of buffer concentration, pH and buffer ions on the degradation and drug release from polyglycolide. *Polymer international* 52.3: 358-366.
- Ichikawa, T., Ajiki, K., Matsuura, J., Misawa, H., 1997. Localization of two cholinergic markers, choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in the central nervous system of the rat: in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry. *Journal of chemical neuroanatomy*, 13(1), 23-39.
- Inestrosa, N. C., Alvarez, A., Perez, C. A., Moreno, R. D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C., Garrido, J., 1996. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, 16(4), 881-891.
- Jackson, R. L., and Aprison, M. H., 1966a. Mammalian brain acetylcholinesterase. Purification and properties *J Neurochem.* 13, 1351-1365.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R. A., Nordheim, A., and Stunnenberg, H. G., 1991. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(20), 8972-8976.
- Jin, Q. H., He, H. Y., Shi, Y. F., Lu, H., and Zhang, X. J., 2004. Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells. *Acta Pharmacol Sin*, 25(8), 1013-1021.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., and Soreq, H., 1998. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, 393(6683), 373-377. doi: 10.1038/30741
- Keha, E., and Küfrevioğlu, Ö. F., 2012. *Biyokimya. Aktif Yayınları*, Erzurum, 97-125.
- Kim, N. A., An, I. B., Lim, D. G., Lim, J. Y., Lee, S. Y., Shim, W. S., Kang, N.G., Jeong, S.H., 2014. Effects of pH and buffer concentration on the thermal stability of etanercept using DSC and DLS. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(5), 808-816.
- Kim, S. J., Sung, J. Y., Um, J. W., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., Paik, S.R., Kim, J., Chung, K. C., 2003. Parkin cleaves intracellular alpha-synuclein inclusions via the activation of calpain. *J Biol Chem*, 278(43), 41890-41899. doi: 10.1074/jbc.M306017200
- Knowles, R., 2003. *Alzheimer's Disease (Booklet)*. Benjamin Cummings, 48 pp.
- Koedam, E.L., Lauffer, V., Van der Vlies, A.E., Van der Flier, W.M., Scheltens, P., Pijnenburg, Y.A., 2009. Early-versus late-onset Alzheimer's disease: more than age alone. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 19(4), 1401-1408.
- Kronman, C., Velan, B., Gozes, Y., Leitner, M., Flashner, Y., Lazar, A., Marcus, D., Sery, T., Papier, Y., Grosfeld, H., 1992. Production and secretion of high levels of recombinant human acetylcholinesterase in cultured cell lines: microheterogeneity of the catalytic subunit. *Gene*, 121(2), 295-304.
- Ksiezak-Reding, H., Morgan, K., Mattiace, L. A., Davies, P., Liu, W. K., Yen, S. H., Weidenheim, K., Dickson, D. W., 1994. Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration. *Am J Pathol*, 145(6), 1496-1508.
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., & McCoy, J. M., 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Biotechnology*, 11, 187-193.

- Lawler, H. C., 1961. Turnover time of acetylcholinesterase. *J Biol Chem*, 236, 2296-2301.
- Layer, P. G., and Sporns, O., 1987. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(1), 284-288.
- Layer, P. G., and Willbold, E., 1995. Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Prog Histochem Cytochem*, 29(3), 1-94.
- Lazar, A., Reuveny, S., Kronman, C., Velan, B., and Shafferman, A., 1993. Evaluation of anchorage-dependent cell propagation systems for production of human acetylcholinesterase by recombinant 293 cells. *Cytotechnology*, 13(2), 115-123.
- Leader, B., Baca, Q. J., and Golan, D. E., 2008. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov*, 7(1), 21-39. doi: 10.1038/nrd2399
- Legay, C., Bon, S., Vernier, P., Coussen, F., and Massoulie, J., 1993. Cloning and expression of a rat acetylcholinesterase subunit: generation of multiple molecular forms and complementarity with a Torpedo collagenic subunit. *J Neurochem*, 60(1), 337-346.
- Li, M., Su, Z. G., and Janson, J. C., 2004. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr Purif*, 33(1), 1-10. doi: 10.1016/j.pep.2003.08.023
- Li, Y., Camp, S., Rachinsky, T. L., Bongiorno, C., and Taylor, P., 1993. Promoter elements and transcriptional control of the mouse acetylcholinesterase gene. *J Biol Chem*, 268(5), 3563-3572.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- Long, J. Z., and Cravatt, B. F., 2011. The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chemical reviews*, 111(10), 6022-6063.
- Lu, H., Liu, X., Deng, Y., and Qing, H., 2013. DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci*, 5, 85. doi: 10.3389/fnagi.2013.00085
- Lu, L., Zhang, X., Zhang, B., Wu, J., and Zhang, X., 2013. Synaptic acetylcholinesterase targeted by microRNA-212 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(11), 2530-2540.
- Luheshi, L. M., Crowther, D. C., and Dobson, C. M., 2008. Protein misfolding and disease: from the test tube to the organism. *Curr Opin Chem Biol*, 12(1), 25-31. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.02.011
- Ma, J. K., Drake, P. M., and Christou, P., 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet*, 4(10), 794-805. doi: 10.1038/nrg1177
- Marblestone, J.G., Edavettal, S.C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X., & Butt, T.R., 2006. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Science*, 15(1), 182-189.
- Massoulie, J., Bon, S., Perrier, N., and Falasca, C., 2005. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact*, 157-158, 3-14. doi: 10.1016/j.cbi.2005.10.002

- Massoulie, J., Perrier, N., Noureddine, H., Liang, D., and Bon, S., 2008. Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact*, 175(1-3), 30-44. doi: 10.1016/j.cbi.2008.04.039
- Matasci, M., Hacker, D. L., Baldi, L., and Wurm, F. M., 2008. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discov Today Technol*, 5(2-3), e37-42. doi: 10.1016/j.ddtec.2008.12.003
- Montenegro, M., Ruiz-Espejo, F., Campoy, F., Muñoz-Delgado, E., de la Cadena, M. P., Rodríguez-Berrocal, F., Vidal, C., 2006. Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(18), 2175-2182.
- Moss, D. E., and Fahrney, D. 1978. Kinetic analysis of differences in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources. *Biochemical pharmacology*, 27(23), 2693-2698.
- Nachmansohn, D., 1939. Choline esterase in voluntary muscle. *J Physiol*, 95(1), 29-35.
- Nihei, K., McKee, A. C., and Kowall, N. W., 1993. Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol*, 86(1), 55-64.
- Nordberg, A., Hellstrom-Lindahl, E., Almkvist, O., and Meurling, L., 1999. Activity of acetylcholinesterase in CSF increases in Alzheimer's patients after treatment with tacrine. *Alzheimers Reports*, 2(6), 347-352.
- Ohno, K., Engel, A. G., Brengman, J. M., Shen, X. M., Heidenreich, F., Vincent, A., Milone, M., Tan, E., Demirci, M., Walsh, P., Nakano, S., Akiguchi, I., 2000. The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Ann Neurol*, 47(2), 162-170.
- Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D., and DiNovi, M. J., 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45(2), 144-158.
- Pal, R. R., and Chaudhuri, A. N. 2006. Differential acetylcholinesterase activity in rat cerebrum, cerebellum and hypothalamus. *Indian journal of experimental biology*, 44, 381-386.
- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S., and Ramirez, O. T., 2004. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol*, 267, 15-52. doi: 10.1385/1-59259-774-2:015
- Paraoanu, L. E., and Layer, P. G., 2008. Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation. *FEBS J*, 275(4), 618-624. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06237.x
- Park, S. E., Kim, N. D., and Yoo, Y. H., 2004. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res*, 64(8), 2652-2655.
- Patocka, J., Kuca, K., and Jun, D., 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase--important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 47(4), 215-228.
- Peri, S., Navarro, J. D., Amanchy, R., Kristiansen, T. Z., Jonnalagadda, C. K., Surendranath, V., Muthusamy, B., Gandhi, T.K.B., Gronborg1, M., Ibarrola, N., Nandan, D., Shanker, K., Shivashankar, H.N., Rashmi, B.P., Ramya, M.A., Anand, A.S., Madavan, A., Ansamma, J., Wong, G., Schiemann, W.P., Constantinescu, S.N., Huang, L., Steen, H., Jensen, O.L., Chinnaiyan, A.M.,

- Chakravarti, A., 2003. Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans. *Genome research*, 13(10), 2363-2371.
- Perry, C., Sklan, E. H., and Soreq, H., 2004. CREB regulates AChE-R-induced proliferation of human glioblastoma cells. *Neoplasia*, 6(3), 279-286.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., and Perry, R., 1999. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci*, 22(6), 273-280.
- Picanco-Castro, V., Biaggio, R. T., Cova, D. T., and Swiech, K., 2013. Production of recombinant therapeutic proteins in human cells: current achievements and future perspectives. *Protein Pept Lett*, 20(12), 1373-1381.
- Pick, M., Perry, C., Lapidot, T., Guimaraes-Sternberg, C., Naparstek, E., Deutsch, V., and Soreq, H., 2006. Stress-induced cholinergic signaling promotes inflammation-associated thrombopoiesis. *Blood*, 107(8), 3397-3406. doi: 10.1182/blood-2005-08-3240
- Pievani, M., Filippini, N., van den Heuvel, M. P., Cappa, S. F., and Frisoni, G. B., 2014. Brain connectivity in neurodegenerative diseases [mdash] from phenotype to proteinopathy. *Nature Reviews Neurology*, 10(11), 620-633.
- Pohanka, M., Hrabínova, M., Kuca, K., and Simonato, J. P. 2011. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *International journal of molecular sciences*, 12(4), 2631-2640.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L., 1997. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *science*, 276(5321), 2045-2047.
- Pryor, K. D., & Leiting, B., 1997. High-Level Expression of Soluble Protein in *Escherichia coli* Using a His 6-Tag and Maltose-Binding-Protein Double-Affinity Fusion System. *Protein expression and purification*, 10(3), 309-319.
- Radzicka, A., and Wolfenden, R., 1995. A proficient enzyme. *Science*, 267(5194), 90-93.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H., and Lobrich, M., 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol*, 23(16), 5706-5715.
- Rotundo, R. L., 1990. Nucleus-specific translation and assembly of acetylcholinesterase in multinucleated muscle cells. *J Cell Biol*, 110(3), 715-719.
- Rubinsztein, D. C., 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 443(7113), 780-786. doi: 10.1038/nature05291
- Ruiz-Espejo, F., Cabezas-Herrera, J., Illana, J., Campoy, F. J., Munoz-Delgado, E., Vidal, C. J., 2003. Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. *Breast Cancer Res Treat*, 80(1), 105-114. doi: 10.1023/A:1024461108704
- Scheff, S. W., and Price, D. A., 2006. Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. *J Alzheimers Dis*, 9(3 Suppl), 101-115.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-lahad, L., Viitanen, M.,

- Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wsco, W., Lennfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S., 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2(8), 864-870.
- Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhnngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto, C., Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A., 2013. BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic acids research*, 41(D1), D764-D772.
- Shaked, I., Meerson, A., Wolf, Y., Avni, R., Greenberg, D., Gilboa-Geffen, A., Soreq, H., 2009. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity*, 31(6), 965-973. doi: 10.1016/j.immuni.2009.09.019
- Silman, I., and Sussman, J. L., 2005. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current opinion in pharmacology*, 5(3), 293-302.
- Silva, K. C. C., Assis, C. R. D., Oliveira, V. M., Carvalho, L. B., & Bezerra, R. S. 2013. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. *Aquatic toxicology*, 126, 191-197.
- Simon, G. M., and Cravatt, B. F., 2010. Activity-based proteomics of enzyme superfamilies: serine hydrolases as a case study. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11051-11055.
- Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., Silakari, O., and Singh, D., 2013. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *Eur J Med Chem*, 70, 165-188. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.050
- Small, D. H., Michaelson, S., and Sberna, G., 1996. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 28(5-6), 453-483.
- Soderberg, T., 2012. *Organic Chemistry With a Biological Emphasis USA*: University of Minnesota.
- Soreq, H., and Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*, 2(4), 294-302. doi: 10.1038/35067589
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., and Silman, I., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022), 872-879.
- Swartz, J. R., 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 12(2), 195-201.
- Talesa, V. N., 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*, 122(16), 1961-1969.
- Tanzi, R.E., 1999. A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders. *Journal of Clinical Investigation*, 104(9), 1175.
- Taylor, P., and Radic, Z., 1994. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 34, 281-320. doi: 10.1146/annurev.pa.34.040194.001433

- Thomas, J. G., and Baneyx, F., 1997. Divergent Effects of Chaperone Overexpression and Ethanol Supplementation on Inclusion Body Formation in Recombinant *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 11(3), 289-296.
- Thompson, L. M., 2008. Neurodegeneration: a question of balance. *Nature*, 452(7188), 707-708. doi: 10.1038/452707a
- Tian, Y., Bassit, B., Chau, D., and Li, Y. M., 2010. An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates gamma-secretase activity for Aβ production. *Nat Struct Mol Biol*, 17(2), 151-158. doi: 10.1038/nsmb.1743
- Toiber, D., Berson, A., Greenberg, D., Melamed-Book, N., Diamant, S., and Soreq, H., 2008. N-acetylcholinesterase-induced apoptosis in Alzheimer's disease. *PLoS One*, 3(9), e3108. doi: 10.1371/journal.pone.0003108
- Tripathi, A., and Srivastava, U., 2010. Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system. *Annals of Neurosciences*, 15(4), 106-111.
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., and Abraham, W. C., 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*, 70(1), 1-32.
- Velan, B., Grosfeld, H., Kronman, C., Leitner, M., Gozes, Y., Lazar, A., Flashner, Y., Marcus, D., Cohen, S., Shafferman, A., 1991. The effect of elimination of intersubunit disulfide bonds on the activity, assembly, and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. Expression of acetylcholinesterase Cys-580-Ala mutant. *J Biol Chem*, 266(35), 23977-23984.
- Velan, B., Kronman, C., Ordentlich, A., Flashner, Y., Leitner, M., Cohen, S., and Shafferman, A., 1993. N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis. *Biochem J*, 296 (Pt 3), 649-656.
- Vellom, D. C., Radic, Z., Li, Y., Pickering, N. A., Camp, S., and Taylor, P., 1993. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, 32(1), 12-17.
- Wakabayashi, T., and De Strooper, B., 2008. Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology (Bethesda)*, 23, 194-204. doi: 10.1152/physiol.00009.2008
- Walker, L. C., and LeVine, H., 3rd. 2000. The cerebral proteopathies. *Neurobiol Aging*, 21(4), 559-561.
- Walsh, S., Dolden, T., Moores, G., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A. L., & Williamson, M. 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem. J*, 359, 175-181.
- Wang, Z., Li, H., Guan, W., Ling, H., Wang, Z., Mu, T., Shuler, F.D., Fang, X., 2010. Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility. *Protein expression and purification*, 73(2), 203-208.
- Waugh, D. S., 2005. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol*, 23(6), 316-320. doi: 10.1016/j.tibtech.2005.03.012
- Weihe, E., Tao-Cheng, J.H., Schäfer, M.K., Erickson, J.D., Eiden, L.E., 1996. Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3547-3552.

- Whittington, R., and Goa, K. L., 1992. Alglucerase. A review of its therapeutic use in Gaucher's disease. *Drugs*, 44(1), 72-93.
- Wolfe, M. S., 2007. When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. *Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease*. *EMBO Rep*, 8(2), 136-140. doi: 10.1038/sj.embor.7400896
- Wright, C. I., Geula, C., and Mesulam, M. M., 1993. Neurological cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann Neurol*, 34(3), 373-384. doi: 10.1002/ana.410340312
- Xiang, A. C., Xie, J., and Zhang, X. J., 2008. Acetylcholinesterase in intestinal cell differentiation involves G2/M cell cycle arrest. *Cell Mol Life Sci*, 65(11), 1768-1779. doi: 10.1007/s00018-008-8016-3
- Xu, H., Shen, Z., Xiao, J., Yang, Y., Huang, W., Zhou, Z., Shen, J., Zhu, Y., Liu, X.Y., Chu, L., 2014. Acetylcholinesterase overexpression mediated by oncolytic adenovirus exhibited potent anti-tumor effect. *BMC Cancer*, 14, 668. doi: 10.1186/1471-2407-14-668
- Yamamoto, K., Oguri, S., Chiba, S., and Momonoki, Y. S., 2009. Molecular cloning of acetylcholinesterase gene from *Salicornia europaea* L. *Plant Signal Behav*, 4(5), 361-366.
- Ye, X., Zhang, C., Chen, Y., and Zhou, T., 2015. Upregulation of Acetylcholinesterase Mediated by p53 Contributes to Cisplatin-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cell. *J Cancer*, 6(1), 48-53. doi: 10.7150/jca.10521
- Young, C. L., Britton, Z. T., and Robinson, A. S., 2012. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J*, 7(5), 620-634. doi: 10.1002/biot.201100155
- Zech, R., and Domagk, G.F., 1975. Puromycin and cycloheximide as inhibitors of human brain acetylcholinesterase. *Bruzn Res* 86, 339-342.
- Zhang, Y., Olsen, D. R., Nguyen, K. B., Olson, P. S., Rhodes, E. T., & Mascarenhas, D., 1998. Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 12(2), 159-165.
- Zimmerman, G., and Soreq, H., 2006. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell and tissue research*, 326(2), 655-669.
- Zlokovic, B. V., Deane, R., Sallstrom, J., Chow, N., and Miano, J. M., 2005. Neurovascular pathways and Alzheimer amyloid beta-peptide. *Brain Pathol*, 15(1), 78-83.

ÖZGEÇMİŞ

Hamid CEYLAN 13 Ağustos 1985 tarihinde Kahramanmaraş'ın Elbistan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Elbistan'da tamamladı. Lisans hayatına 2004 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladı. 2005 yılında Kayseri Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne yatay geçişle yerleşti. 2008 yılında lisans eğitimimi tamamladı ve aynı yıl içerisinde ara vermeden Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2010 yılından itibaren Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi ve doktora öğrencisi olup halen öğrenimine devam etmektedir.

Adres : Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlık Binası

Tel : 0554 777 19 07

e-mail : hmdcyn@hotmail.com