

**SIÇAN (*Rattus norvegicus*) BEYNİNDEN
ASETİLKOLİNESTERAZ GENİNİN KLONLANMASI
VE EKSPRESYONU**

Ahmet KARAKUŞ

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı
Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN
2015
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇAN (*Rattus norvegicus*) BEYNİNDEN ASETİLKOLİNESTERAZ
GENİNİN KLONLANMASI VE EKSPRESYONU

Ahmet KARAKUŞ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Genetik Bilim Dalı

ERZURUM
2015

Her hakkı saklıdır



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



TEZ ONAY FORMU

**SIÇAN (*Rattus norvegicus*) BEYNİNDEN ASETİLKOLİNESTERAZ GENİNİN
KLONLANMASI VE EKSPRESYONU**

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında Ahmet KARAKUŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 24/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı - Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 30/07/2015 tarih ve 30/1047 nolu kararı
ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2012/172

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

Yüksek Lisans Tezi

SIÇAN (*Rattus norvegicus*) BEYNİNDEN ASETİLKOLİNESTERAZ GENİNİN KLONLANMASI VE EKSPRESYONU

Ahmet KARAKUŞ

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

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Bu çalışmada sıçan (*Rattus norvegicus*) beyin asetilkolinesteraz enzimini kodlayan gen bölgesi dizayn edilen ileri ve geri primerler ile PCR’da çoğaltıldıktan sonra uygun şartlarda pET SUMO vektörüne ligasyonu yapıldı. Bu rekombinant vektör kompetent *E.coli* hücrelerine transfer edilerek bu hücreler kanamisin içeren LB sıvı besiyerinde büyütüldü. Büyüyen kolonilerden koloni PCR yapıldı ve ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Pozitif koloniler plazmit izolasyonu için sıvı besiyerinde büyütüldü. Plazmit izolasyonundan sonra rekombinant bu vektörlerle çapraz PCR yapılarak genin doğru bir şekilde insört olup olmadığı kontrol edildi. Plazmitlerin doğruluğu tespit edildikten sonra rekombinant vektörler protein üretiminin gerçekleştirildiği *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine transfer edildi. Hücreler 7 saat IPTG içeren sıvı besiyerinde büyütüldü ve 2 saatte bir örnek alındı. Farklı örneklerden hazırlanan homojenatlardan enzim aktivite ve SDS-PAGE analizleri yapıldı.

2015, 54 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Rattus norvegicus*, Beyin, Asetilkolinesteraz, PCR, Klonlama, Enzim Aktivitesi

ABSTRACT

Master Thesis

CLONING AND EXPRESSION OF ACETYLCHOLINESTERASE GENE FROM RAT (*Rattus norvegicus*) BRAIN

Ahmet KARAKUŞ

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Molecular Biology and Genetic
Genetic Science

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

In this study, the gene region of rat (*Rattus norvegicus*) brain acetylcholinesterase enzyme was amplified in PCR with designed forward and reverse primers and it was ligated into a pET SUMO vector under suitable conditions. This recombinant vector was transformed to competent *E.coli* cells and it was grown in liquid LB medium including kanamycin. Colony PCR was performed from growing colony and PCR products were checked with agarose gel electrophoresis. The correct colonies were grown in a liquid medium for plasmid isolation. After plasmid isolation, these recombinant constructs were used for whether the gene inserts properly with cross-PCR. After determining the accuracy of the plasmid, recombinant vectors were transferred into the *E.coli* BL21(DE3) cells to perform protein production. Cells were grown in IPTG induced larger media for hours. Enzyme activity and SDS-PAGE analysis were performed from homogenate for each treatment samples.

2015, 54 Pages

Anahtar Kelimeler: *Rattus norvegicus*, Brain, Acetylcholinesterase, PCR, Cloning, Enzyme Activity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında yapıldı.

Öncelikle tez çalışmamda katkı ve fikirleriyle bana yol gösteren danışmanım Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca hem lisans hem de yüksek lisans eğitimimdeki emeklerinden ve laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarından dolayı Sayın Arş. Gör. Dr. Yağmur ÜNVER'e ve Sayın Arş. Gör. Hamid CEYLAN'a, deneylerim sırasında göstermiş oldukları ilgi için Genetik Araştırma Laboratuvarında çalışan arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ'a, Sayın Arş. Gör. Özkan BALTAÇI'ya, Sayın Burak DAĞDELEN'e ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma, tezin düzenlenmesinde emeği geçen Sayın Onur VURAL'a çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her anında olduğu gibi bu süreç boyunca da maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen başta babam Sayın Arif KARAKUŞ olmak üzere annem Sayın Ayşe KARAKUŞ ve kardeşim Sayın Esra KARAKUŞ'a gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (2012/172 nolu proje ile) tarafından desteklenmiştir.

Ahmet KARAKUŞ

Temmuz, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri.....	1
1.2. Alzheimer Hastalığı.....	2
1.3. Amiloid Plaklar	4
1.4. Nörofibriler Yumaklar	5
1.5. Asetilkolinesteraz Enzimi.....	7
1.6. Asetilkolin Metabolizması	9
1.7. Asetilkolinesteraz Enziminin Yapısı	10
1.7.1. Periferik Bölge	11
1.7.2. Aktif Bölge	11
1.8. Kolinesteraz İnhibitörleri	12
1.9. <i>Rattus norvegicus</i>	13
1.10. SUMO Protein Ekspresyon Sistemi	14
1.11. Araştırmanın Amacı	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	21
3.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler	22
3.1.3. Kullanılan besi yeri ve tamponların hazırlanması	22
3.1.4. Kullanılan mikroorganizmalar	24
3.1.5. DNA kütüphanesi	24
3.1.6. pET SUMO klonlama ve protein ekspresyon sistemi	24

3.1.7. T4 DNA ligaz	25
3.1.8. Büyütme (besi yeri) ortamları	25
3.1.9. Plazmit saflaştırma kiti	25
3.1.10. Primerler	25
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Sıçan beyin dokusundan total RNA izolasyonu	25
3.2.2. İzole edilen RNA'nın agaroz jel elektroforezi ile kalitatif tayini.....	26
3.2.2.a. Jelde yürütülen RNA örneğinin hazırlanması	26
3.2.2.b. Jelin hazırlanması	27
3.2.2.c. Elektroforez	27
3.2.3. Sıçan beyin dokusundan cDNA kütüphanesinin oluşturulması	27
3.2.4. Primerlerin hazırlanması	28
3.2.5. AChE Genine Ait cDNA Sekansının Çoğaltılması.....	28
3.2.6. Elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforezi ile kalitatif tayini	29
3.2.7. Rekombinant vektörün elde edilmesi	30
3.2.8. Rekombinant vektörün kompetent hücrelere transformasyonu.....	30
3.2.9. Koloni PCR	31
3.2.10. Plazmid izolasyonu.....	32
3.2.11. Çapraz kontrol PCR.....	34
3.2.12. Pozitif sonuç veren bakterilerin gliserolde stoklanması.....	35
3.2.13. Rekombinant plazmidin protein üretimi için konağa transformasyonu	35
3.2.14. Pilot (deneme) ekspresyon	36
3.2.15. Toplanan örneklerin analizi.....	36
3.2.15.a. Hücrelerin parçalanması	36
3.2.15.b. Aktivite tayini.....	37
3.2.15.c. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	39
4.1. İzole Edilen RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Kalitatif Tayini.....	39
4.2. Sıçan AChE Genine Ait cDNA Sekansının Çoğaltılması	40
4.2.1. PCR ürününün agaroz jel elektroforezi ile doğrulanması	41
4.3. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi ve Konak Organizmaya Transformasyonu.....	41

4.4. Koloni PCR	42
4.5. Plazmit İzolasyonu ve Çapraz PCR.....	44
4.6. Rekombinant Plazmidin Protein Üretimi İçin Konağa Transformasyonu	45
4.7. Toplanan Örneklerin Analizi.....	45
4.7.1. Aktivite Tayini	45
4.7.2. SDS-PAGE.....	46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	545

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
bç	Baz çifti
dk	Dakika
g (RCF)	Relative Centrifugal Force
g	Gram
g/l	Gram/Litre
l	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mg/l	Miligram/Litre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
OD	Optik Dansite
rpm	Revolutions Per Minute
sa	Saat
T _m	Erime Sıcaklığı
u/μl	Ünite/Mikrolitre
UV	Ultra Viole
μg/l	Mikrogram/Litre
μg/ml	Mikrogram/Mililitre
V	Volt

Kısaltmalar

aa	Aminoasit
AChE	Asetilkolinesteraz
AChEI	Asetilkolinesteraz İnhibitörleri
AChI	Asetilkolintiyoiyodür
AH	Alzheimer Hastalığı
AP	Amiloid Plak
A β PP	A β Prekürsör Protein
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Dietilpirokarbonat
dNTP	Deoksiribonükleik Asit
EtBr	Etidyum Bromür
HCl	Hidroklorik Asit
IPTG	İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit
LB	Luria Bertani
LiCl	Lityum Klorid
MOPS	3-(N-morfolino) Propanesulfonik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFY	Nörofibriler Yumak
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
RNA	Ribonükleik Asit
S.O.C.	Super Optimal Broth with Catabolite
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sulfat - Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris EDTA

ŞEKİLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Normal ve Alzheimer'lı beyin, normal ve bozulmuş nöron arasındaki farkın şematik gösterimi	6
Şekil 1.2. Asetilkolinesterazın, asetilkolini asetat ve koline hidrolizlemesini gösteren reaksiyon	8
Şekil 1.3. Asetilkolin sentez reaksiyonu	9
Şekil 1.4. Asetilkolinesterazın Sinaptik Boşluktaki Mekanizması	10
Şekil 1.5. Asetilkolinesteraz enziminin 3 boyutlu yapısı.....	12
Şekil 1.6. pET SUMO vektör haritası.....	15
Şekil 1.7. pET SUMO vektörüne ait TA klonlama sitesi	16
Şekil 4.1. Sıçan beyin dokusundan elde edilen total RNA'nın jel görüntüsü.....	39
Şekil 4.2. cDNA kütüphanesinden PCR ile elde edilen gen bölgesi	41
Şekil 4.3. Rekombinant vektörün transformasyonu sonrası besi yerinde büyüyen koloniler	42
Şekil 4.4. Hedef gene ait primerle yapılan koloni PCR sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü	43
Şekil 4.5. Vektöre ait primerle yapılan koloni PCR sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü	43
Şekil 4.6. Plazmit izolasyonun yapıldığı koloniler	44
Şekil 4.7. Plazmitten yapılan çapraz PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	44
Şekil 4.8. Plazmit transformasyonu sonrasında elde edilen koloniler	45
Şekil 4.9. Lizis işleminden sonra elde edilen hücre homojenatının SDS-PAGE fotoğrafı	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar	21
Çizelge 3.2. AChE geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon karışımı	29
Çizelge 3.3. AChE geninin amplifikasyonu için PCR işlemi parametreleri.....	29
Çizelge 3.4. Koloni PCR reaksiyon karışımı	32
Çizelge 3.5. Koloni PCR işlemi parametreleri.....	32
Çizelge 3.6. Plazmitten yapılan kontrol PCR reaksiyonları	34
Çizelge 3.7. Aktivite ölçümünde küvet içeriği	37
Çizelge 4.1. AChE genine ait primer bilgileri	40
Çizelge 4.2. SUMO vektörüne ait primer bilgileri	41
Çizelge 4.3. Aktivite ölçümü sonuçları.....	46

1. GİRİŞ

1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş grubunu teşkil eden enzimler, canlı hücrelerdeki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi ile çalışan biyolojik katalizörlerdir.

Katalizleme güçleri ve spesifik oluşları enzimlerin en önemli özelliği olup bütün biyolojik olaylarda hayati bir fonksiyon üstlenmektedirler. Günümüzde yaklaşık 2000 enzim tanımlanmış olup, bazı katalitik RNA moleküllerinin küçük bir kısmı hariç bütün enzimler protein yapısındadır.

Enzimler ile gerçekleşen tepkimeleri diğer tepkimelerden ayıran özellik; aktif bölge olarak adlandırılan kısım içinde meydana gelmesidir. Aktif bölgeye bağlanan enzimin üzerinde aktivite gösterdiği molekül substrat olarak adlandırılır. Aktif bölge yüzeyi, yan grupları substrata bağlanan ve bunun kimyasal transformasyonunu katalizleyen amino asit kalıntılarıyla oluşturulmuştur.

Canlı bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştiğinden dolayı Canlı bir hücrede enzimi olmayan bir kimyasal reaksiyon gerçekleşmez, kendiliğinden reaksiyonlar oluşamaz. Buradan da enzimlerin protein yapısında olduğu ve DNA tarafından kodlandığı için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edildiği sonucu çıkarılmaktadır.

Enzimlerin etki ederek ürüne dönüştürdükleri maddelere substrat denir. Enzimler genelde ya substrat adının sonuna “-az” eki getirilerek ya da ilk keşfeden kişilerin ortaya attıkları isimlerle adlandırılmaktadır. Örnek olarak; fosfataz, üreaz, lipaz, tripsin ve pepsin gibi. Fakat bu isimler çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiğinden Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından sistematik bir sınıflandırma

yapılmıştır. Ayrıca her bir enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası (E.C.) öngör÷lmüştür.

Her enzim katalizlediğı reaksiyon türü ve substratına oldukça spesifiktir. Genellikle bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler. Substratlara karşı spesifiklikleri oldukça yüksektir, hatta bazı enzimlerin substrat özgülükleri mutlakdır. Bununla birlikte, aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimler de vardır. Bu tip enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır.

Enzimlerin hem *in vitro* hem *in vivo* da gösterdiği aktivitenin bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon, bu olaya sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. Enzimatik aktiviteyi kontrol eden bu küçük moleküller, biyolojik sistemler üzerinde büyük ölçüde kontrol sağladıkları için çok önemlidirler. Birçok ilaç ve toksik madde de enzim inhibitörü gibi davranırlar (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimlerin uygulama alanları çok geniş olup gün geçtikçe artmaktadır, günümüzde ekmek, alkol ve süt endüstrisi gibi ekonomik alanlarda ve tıpta hastalıkların teşhisi ve tedavisinde önemli bir rol üstlenmektedirler. Enzimler sadece tıpta değil diğer birçok alanda da önem kazanmıştır. Bugün enzimlerin kimya sanayinde, ilaç sanayinde, gıda prosesinde, ziraatte ve hatta biyolojik savaşta pek çok kullanım alanı bulunmaktadır.

1.2. Alzheimer Hastalığı

Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer Hastalığı (AH) kolinerjik eksiklik ile zihinsel işlev bozukluğu arasında net olarak ilişki kurulabilen bir hastalıktır (Beeri *et al.* 1997). Bugün 20 milyon civarında insanın bu hastalığa yakalandığı tahmin edilmektedir. En sık demans nedeni olan ve tüm vakalarının %50-70'ini oluşturan Alzheimer hastalığı (AH) 65 yaş üzeri kişilerde %3-11, 85 yaş üzerinde ise %20-47 gibi yüksek bir prevalansa sahiptir (Kawas 1997).

Alzheimer hastalığı tanısı klinik olarak aşağıda belirten kriterlerin karşılanması ile konulabilir.

- 1- Klinik olarak hastada demans tanısının konulmuş olması,
- 2- İlerleyici hafıza kaybı ve en az iki farklı bilişsel alanda fonksiyon bozukluğunun olması,
- 3- Hastalığın başlangıcının 40 yaş ve üzerinde olması,
- 4- Demansa neden olabilecek herhangi bir sistemik hastalığın ya da nörolojik hastalığın bulunmaması.

Bellek kaybı hastalığın değişmez bulgusudur ve hastalık genelde yakın bellek bozukluğu ile başlar. Hastalığın ilerlemesi ile birlikte konuşma bozuklukları ortaya çıkar. Ayrıca hastalığın seyri sırasında ajitasyon, agresyon, depresyon, psikotik semptomlar gibi davranış bozuklukları meydana gelebilir (Francis *et al.* 1999).

Alzheimer hastalığının kesin nedeni bilinmemekle birlikte en eski sebeplerinden birinin beyindeki kolinerjik kayıp olduğu gösterilmiştir. Kolinerjik kavşak ve sinapslardan salınan asetilkolin miktarının Alzheimer hastalarında azaldığının saptanması ile asetilkolini hidroliz yoluyla parçalayan bir enzim olan asetilkolinesterazın inhibe edilerek asetilkolin miktarının artırılması şeklinde bir yaklaşım ortaya çıkmıştır (Dickson 1997).

Beyinde nörofibriler dejenerasyon sonucu meydana gelen nörofibril yumak (NFY) ve amiloid plak (AP) olarak adlandırılan oluşumların Alzheimer hastalığına neden olduğu ortaya atılan diğer bir sebep olarak gösterilmiştir.

Temel bileşeni hiperfosforilize olmuş tau proteinleri olan NFY'lar hücre iskeletinin bütünlüğünü ve aksonal transportu bozarak hücre ölümüne neden olurlar. Dejenere nöron ve reaktif glia hücrelerinden oluşan amiloid plaklar, erken yaştaki Down sendromlu hastalarda veya normal yaşlanmada da ortaya çıkabilmektedir. Ancak Alzheimer hastalığında sayıları aşırı derecede artmaktadır (Poirier *et al.* 1993).

Alzheimer hastalığı ile ilişkili olan distrofik nöritler içinde yer alan apolipoprotein E, hastalığın ortaya çıkış mekanizması ile ilişkilidir. Karaciğer tarafından sentezlenen ve plazma proteini olan apolipoprotein E merkezi sinir sisteminde astrositler, Schwann hücreleri ve oligodendrositler tarafından da sentezlenir ve beyinde lipaz aktivitesini bozarak yaşlanmaya maruz kalan beyin bölgelerinde kolesterol ve lipit seviyesini değiştirebilir.

Alzheimer hastalığının bir diğer sebebinde beyinde biriken metal iyonları olduğu düşünülmektedir. Alzheimer hastalığında metallerin rolünü açıklayan metal hipotezi; metal iyonları ve A β peptidi, 4 metal iyonu anormal homeostazi arasındaki etkileşimlerin AH nöropatogenezi ile bağlantılı olduğunu belirtmektedir (Gaeta and Hider 2005; Zatta *et al.* 2009). Bu hipoteze dayanarak, metal-A β peptidi türlerinin nörotoksitesini azaltmak ve beyindeki metal iyonu homeostazisinin yeniden dengelenmesi amacıyla metal şelasyon tedavisi yoluyla metal-A β etkileşimlerinin bozulması önerilmiştir (Perez and Franz 2010).

Alzheimer hastalığının tanısında, son yıllarda araştırmacıların elini güçlendiren çok çeşitli teknolojik araç-gereçler geliştirilmiş olmasına rağmen, Alzheimer'ın kesin tanısını hasta hayattayken ortaya koyabilmek mümkün değildir. Kesin tanı biyopsi/otopsi materyalinde karakteristik lezyonların gösterilmesi ile konulur. Nöron sayısında azalma, sinaptik kayıp, nörotik dentritik uzantılarda küçülme, granülovaküoler dejenerasyon, gliosis, amiloid plaklar ve nörofibriller yumaklar, giruslarda atrofi, sulkuslarda genişleşme yaygın olarak karşılaşılan bulgulardır (Selkoe 1991).

1.3. Amiloid Plaklar

AP'lerin temel yapısını A β peptidi oluşturur. A β peptidi, bir ucu hücre içinde diğeri hücre dışında olmak üzere hücre zarını enlemesine geçen A β prokürsör proteinin (A β PP), çözünür olmayan parçalarıdır. A β PP'nin işlevi yeterince bilinmemektedir. A β PP metabolizması α , β , γ sekretaz olmak üzere üç enzim tarafından gerçekleştirilir. α -sekretazlar A β peptidini orta noktalarından keserler ve böylece hücre dışında

çözünebilir olan APP parçası ortaya çıkarılır. β ve γ sekretazlar tarafından ortaya çıkan ürünler ise çözünürlüğü olmayan, amiloid plakların oluşumunda rol oynayan hücre dışı parçalardır.

Amiloid plakların, içerdikleri A β peptidinin yapısı ve toksisite potansiyeline göre bazı türleri vardır:

- **Diffüz Plak:** Toksik etkisi çok sınırlı olan ya da olmayan plaklardır. Pre-amiloid plaklar olarak kabul edilirler ve demansı olmayan yaşlı bireyler de sıklıkla bulunurlar. Çeşitli nedenlerle (İnflamasyon, serbest radikallerin etkisi, oksidatif stres) kompakt plaklara dönüşebilirler.
- **Kompakt Plak:** Toksik etkiye sahip olup nöron dejenerasyonuna yol açarlar.
- **Nöritik Plak:** Dejenere olmuş A β peptid içeren dentrit ve akson parçalarından oluşan ve çoğu nörofibriller yumak da içeren oluşumlardır.

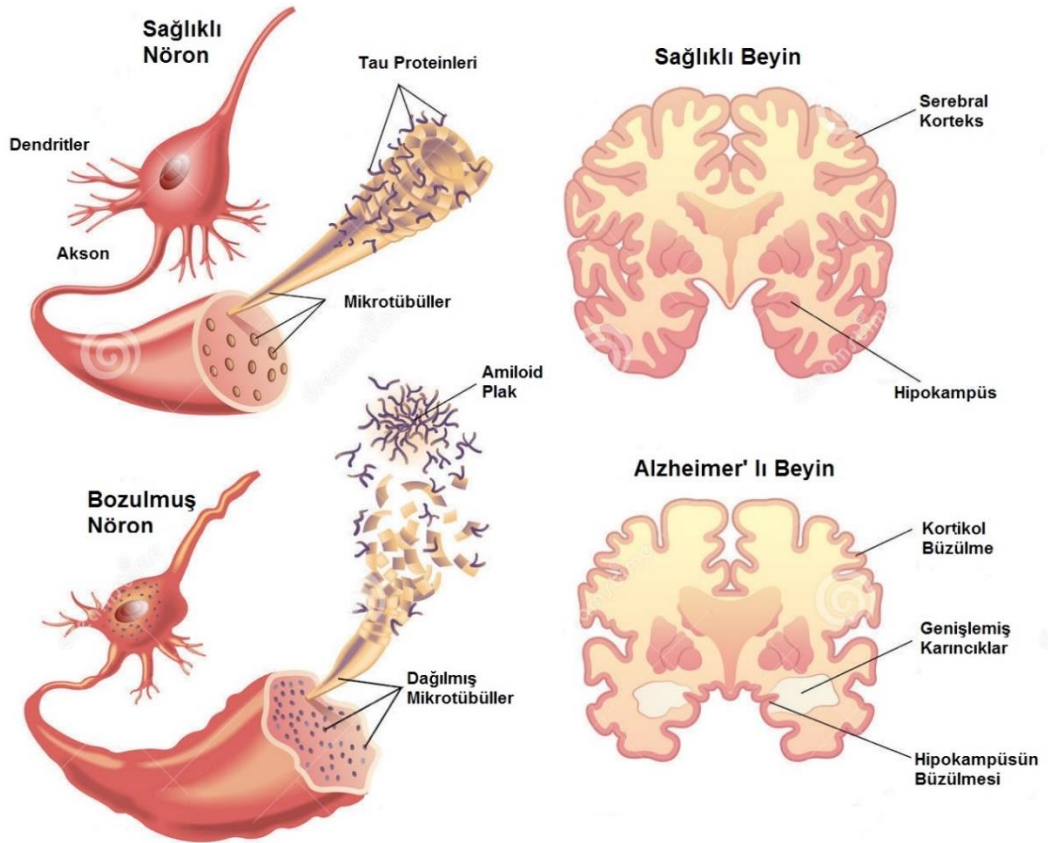
Hem kompakt hem de nöritik plaklar AH'li hastalarda yaygın olarak bulunur. Toksik olup olmama potansiyeline bakılmaksızın, plaklar, serebral korteksin limbik yapılarından ziyade neokortikal bölgelerinde yerleşme eğilimindedirler. Bir diğer ilgi çekici bulgu da, AH ile ilgili genetik mutasyonların tümünün, amiloid plak oluşum mekanizmaları ile bağlantılı olmasıdır (Selkoe 1991).

1.4. Nörofibriler Yumaklar

Nörofibriler yumakların (NFY) esas yapısını fosforilize tau proteinleri oluşturur. Tau, mikrotübüllere bağlıdır ve mikrotübüllerin stabilizasyonunda, hücre iskeletinin bütünlüğünün korunmasında, aksonal transportta görevlidir. AH sürecinde tau, gereğinden fazla fosforilize olur ve mikrotübüllere bağlanma kapasitesi azalır. Bağlanmayan tau proteini, çift sarmallı lifler halinde hücre içine çökerek NFY'ları oluştururlar. Akson ve dentrit çıkıntılarında bulunan NFY'lar nöropil iplikler olarak adlandırılırlar. Bu lezyonlarda amiloid plaklar da yer aldığından nöritik plak ortaya çıkmış olur. Hücre içi oluşumlar olan NFY'lar hücre içine artık sığmayacak derecede

biriktiğinde hücreyi parçalarlar ve hücre dışına yayılırlar. Bunlara hayalet yumak adı verilir (Selkoe 1991).

Aynı yaşta olan demanslı ve normal kişiler kıyaslandığında demanslı olanda NFY sayısı daha fazladır. NFY'ların ilk görüldükleri yer hafızayla bağlantılı bölgeleri etkileyen entorinaltransentorinal korteks bölgesidir. Zamanla beyin diğer korteks bölgelerini ve en sonunda primer motor-duysal alanlar ekseninde yayılırlar (Braak and Braak 1991).



Şekil 1.1. Normal ve Alzheimer'lı beyin, normal ve bozulmuş nöron arasındaki farkın şematik gösterimi (Anonymous 2013)

1.5. Asetilkolinesteraz Enzimi

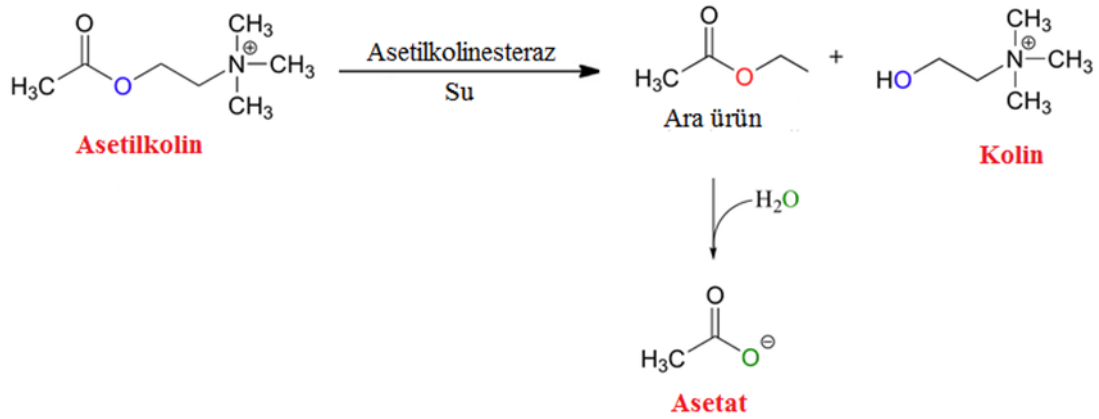
Asetilkolin önemli biyolojik etkiye sahip bir esterdir. 1906 yılında asetilkolinin güçlü farmakolojik etkisi saptanmıştır (Nachmansohn 1952). İlk başlarda bazı fizyolog ve farmakolog bilim adamları, asetilkolinin sadece sinir uçlarından etkilediği organa veya sinir ucundan ikinci sinir hücresine, sinir impulsu taşıma görevi olduğuna inanıyorlardı fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarla bu esterlin sadece sinir impulsu taşıma görevi yapmadığı ayrıca sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da görevli olduğu anlaşılmıştır (Wilson and Nachmansohn 1954).

İlk kez 1914 yılında Henry Hallett Dale tarafından kalp dokusu üzerindeki etkileri ortaya çıkarılan Asetilkolin, merkezi ve çevresel sinir sisteminde rol alan bir nöromodülatördür. Kolin, asetiltransferaz enzimi tarafından asetil CoA ve kolinden sentezlenir. Sinaptik boşlukta bol miktarda bulunan asetilkolinesteraz (AChE) enzimi serbest haldeki asetilkolini, kolin ve asetat metabolitlerine ayırır. Bu mekanizma çok hassas bir şekilde kontrol edilir. Asetilkolin miktarının düşük seviyede olması durumunda AChE'nin inhibisyonu aşırı miktarda asetilkolin birikimine neden olmaktadır. Bunun sonucunda da fazla asetilkolinden dolayı nörotransmisyon engellenir.

Asetilkolinesteraz enzimi ilk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo marmoreta*) elektrik organından ekstraksiyon yoluyla saflaştırılmıştır. Bu enzim diğer esterazlardan asetilkolini hidrolize etmesi özelliğinden dolayı kolaylıkla ayırt edilmektedir. Bu nedenle asetilkolinesteraz olarak adlandırılmıştır. Birçok dokuda farklı tipleri bulunmaktadır (Nachmansohn and Lededer 1939). Asetilkolinesteraz (Asetilkolin hidrolase EC 3.1.1.7) enzimi kolinerjik sinapslarda bir nörotransmitter olan asetilkolini hidrolizler.

Sinaptik boşluğa salınan asetilkolin postsinaptik membrandaki reseptörlerine bağlanır. Aynı bölgede yer alan AChE, asetilkolini hidrolizleyerek sinyal transmisyonunu sonlandırır (Whittaker 1990). Çok yüksek katalitik aktiviteye sahip olan AChE saniyede 25000 asetilkolin molekülünü parçalar (Quinn 1987). Serbest kalan kolin tekrar

presinaptik sinir tarafından alınır. Kolin, kolinasetiltransferaz katalizörlüğünde asetil CoA ile birleşerek tekrar asetilkolini oluşturur.



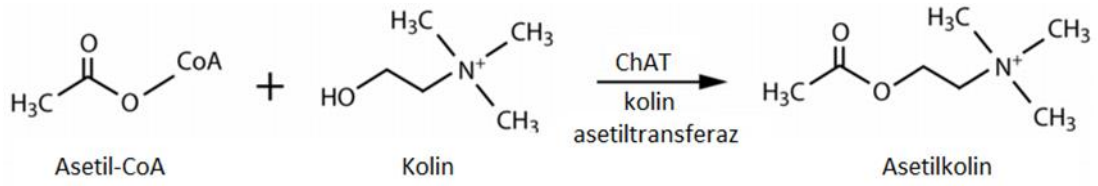
Şekil 1.2. Asetilkolinesterazın, asetilkolini asetat ve koline hidrolizlemesini gösteren reaksiyon

Vertebralarda asetilkolinesteraz (AChE; E.C. 3.1.1.7) yada gerçek kolinesteraz /spesifik kolinesteraz ve bütirilkolinesteraz (BChE; E.C. 3.1.1.8) yada yalancı kolinesteraz/nonspesifik kolinesteraz olmak üzere iki tip kolinesteraz vardır. Bu kolinesterazlar temel substrat spesifikliğı ile ayrılırlar. Aynı zamanda çeşitli dokular ve inhibitörlere karşı verdikleri hassasiyetleri de farklıdır. Tek başına ne AChE ne de BuChE, asetilkolin metabolizmasının ve kolinerjik iletimin sağlıklı işlemesi için yeterli değildir. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre varılan nokta hem AChE'nin hem de BuChE'nin nöral gelişim ve kolinerjik iletimde birlikte aktif rol oynadıkları şeklindedir (Xie *et al.* 2000; Mesulam *et al.* 2002).

Ayrıca asetilkolinesteraz vertebral dokularda birkaç tane moleküler formda bulunur. Bu formlar arasında önemli bir ayrım vardır (Massoulié and Bon 1982). Asimetrik formlar kollojen bir kuyruk üzerinden bazal laminadaki nöromüsküler sinaptik aralıktaki hücre dışı yapılarla bütünleşmiştir (Taylor *et al.* 1987). Globuler formlar ise membranın lipid tabakasının içine yerleşmiştir (Ott 1985).

1.6. Asetilkolin Metabolizması

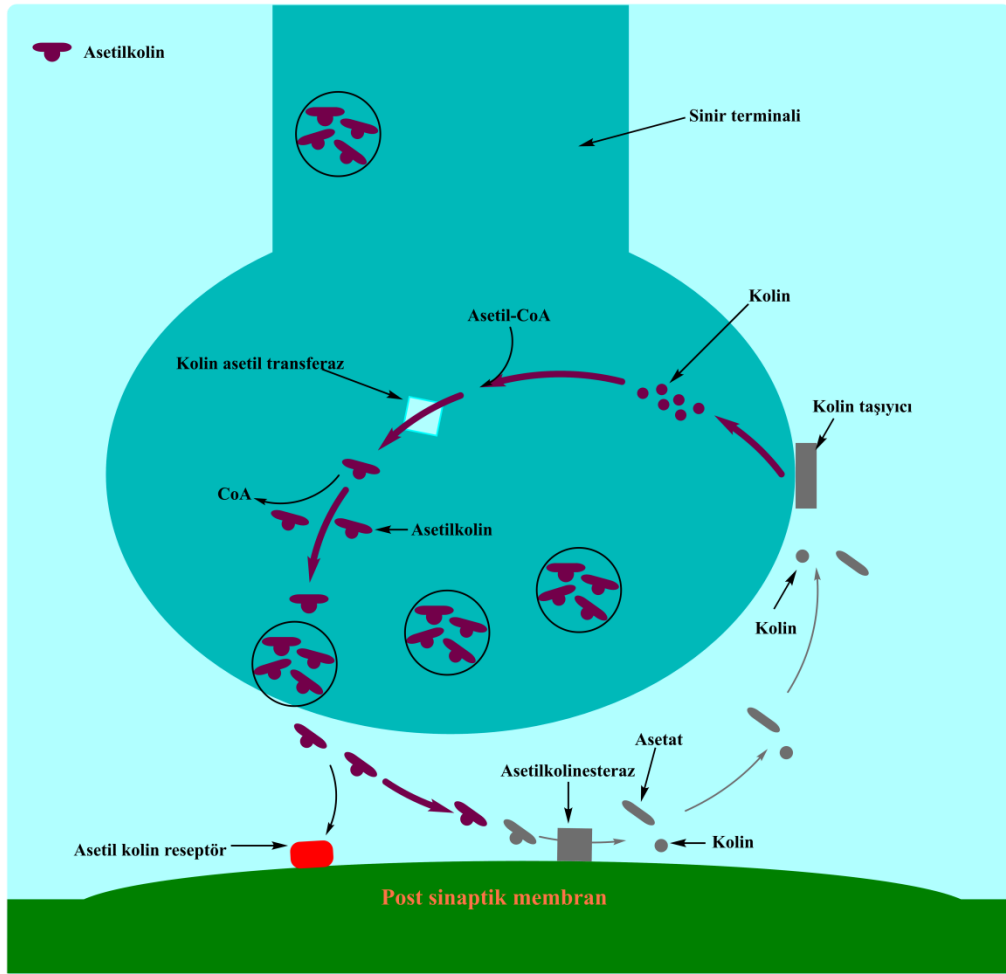
Kolinasetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından kolinerjik nöronların gövdesinde bulunan kolin ile asetilkoenzim A'dan gelen asetilin birleştirilmesi yoluyla oluşan asetilkolin, aksonal transport yoluyla sinir uçlarına taşınır ve sinaptik boşluğa salınır.



Şekil 1.3. Asetilkolin sentez reaksiyonu

ChAT pozitif nöronlara kolinerjik (asetilkolin üreten) nöron, kolinesteraz pozitif nörona ise kalnöseptif (kolinerjik lif alan) nöron denir. Normal kolinerjik ileti sinaptik aralıktaki asetilkolinin, kolinesteraz enzimleri tarafından hızlı katalitik hidrolizi yolu ile sonlandırılmasına bağlıdır. Bu hidroliz sonucu sinaptik aralıkta oluşan kolin tekrar presinaptik nörona alınır ve asetilkolin sentezinde kullanılır. Asetilkolin molekülündeki kolinin besinler ve hücre membranındaki fosfolipidler dışında en önemli kaynağı geri alınan bu kolindir. Hem asetilkolin sentezi için gereken hücre içi kolinin azalması hem de sinaptik aralıktaki asetilkolin etkisinin uzaması ortamda kolinesterazların bulunmaması ile ilişkilidir.

Kolinesteraz inhibisyonu, asetilkolin yetmezliği ile ilerleyen Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda tedavi amaçlı olarak sinaptik aralıktaki asetilkolin miktarını arttırmak üzere kullanıldığı gibi kimyasal gaz üretiminde öldürücü asetilkolinerjik uyarım yaratmak üzere de kullanılmaktadır (Tosun 2014).



Şekil 1.4. Asetilkolinesterazın Sinaptik Boşluktaki Mekanizması (Tosun 2014'den modifiye edilmiştir)

1.7. Asetilkolinesteraz Enziminin Yapısı

Asetilkolinesteraz enziminin alternatif bağımlı üç çeşit izoformu gösterilmiştir. Asetilkolinesterazın tetrametrik çözünebilir formu sinaps boşluğunda lokalizedir. Glikofosfatidilinositol-bağlı AChE-E izoformu bir dimerdir. Diğer alternatif izoformu ise monomerik AChE-R'dir. Bu formun nöroprotektif etki sağladığı düşünülmektedir (Sternfeld *et al.* 2000). Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin Alzheimer hastalarına uygulanması, AChE-R izoformunun salınmasına yol açar. Bu durum zihinsel fonksiyonların artmasında rol oynamaktadır. AChE'nin iki bağlanma bölgesi vardır.

Bunlar, periferik ve aktif bölgedir (Nordberg 2006). AChE, aktif bölge ve katalitik mekanizma açısından başka bir enzimde bulunmayan özelliklere sahiptir.

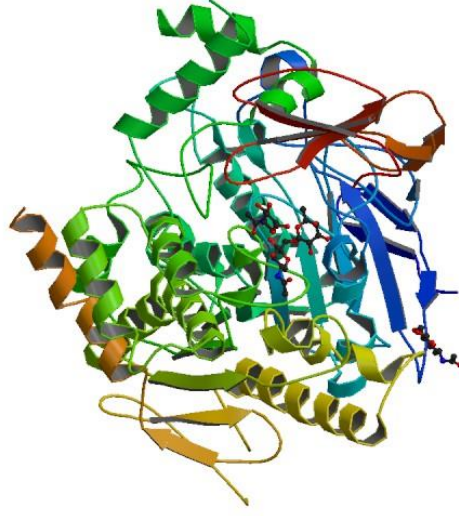
1.7.1. Periferik Bölge

Bu bağlanma bölgesi aktif çukurun giriş tarafında bulunur. Temel olarak Tyr70, Trp279 aromatik aminoasit artığı taşımaktadır (Sussman *et al.* 1991).

1.7.2. Aktif Bölge

Aktif bölge dar olup 20 Å uzunluğundadır, hidrofobik bir çukurdan oluşur. Enzimin orta kısmında bulunan en dar kısmın 4.4 Å çapında olduğu gösterilmiştir. Bu bölgede 5 büyük bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Nordberg 2006).

1. **Oksanyonik çukur:** Gly118, Gly119, Ala201 aminoasit kalıntısı içermektedir.
2. **Esteratik bölge:** Çukurun dip kısmında katalitik üçlü denilen Ser200-His440-Glu327 aminoasit kalıntısı.
3. **Anyonik substrat bağlanma bölgesi:** Çok sayıda aromatik aminoasit kalıntısına ek olarak az sayıda (-) yükler içermektedir.
4. **Selektif aromatik bağlanma bölgesi:** Aril substratların bağlanma yeridir. Esteratik ve anyonik yöreye yakın bölgede bulunmaktadır.
5. **Açıl bağlanma bölgesi:** Asetilkolinin formülünde bulunan asetil grubunun bağlandığı bölgedir.



Şekil 1.5. Asetilkolinesteraz enziminin 3 boyutlu yapısı (Anonymous 2009)

1.8. Kolinesteraz İnhibitörleri

Bir nörotransmitter olan asetilkolinin hidrolizini, kolinesteraz inhibitörleri düzenlemektedir. İki tip kolinesteraz enzimi vardır. Bunlar, asetilkolinesteraz ve butirikolinesterazdır. Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden maddeler kolinesteraz inhibitörleri ya da antikolinesterazlar olarak tanımlanır. Asetilkolinesteraz enziminin hidrolizini inhibe eden kolinesteraz inhibitörleri santral ve periferer kolinerjik fonksiyona katkı yaparak bu fonksiyonu güçlendirmektedir. II. Dünya Savaşından önce sadece geri dönüşümlü kolinesteraz inhibitörleri bilinirken savaş sırasında uzun süre etkili ve oldukça toksik bileşikler olan geri dönüşümsüz bileşikler geliştirilmiştir (Alaşehirli 2005).

Tıbbi olarak kolinesteraz inhibitörleri Alzheimer, glokom ve myastenia gravis gibi hastalıklarda uygulanmaktadır. Nöromuskuler iletim düzensizliğinden kaynaklanan bir kas hastalığı olan myastenia gravis, ACh reseptör proteinine karşı antikor oluşması bunun akabinde kas motor sinir aksonunun, çizgili kas içinde sonlanan uç kısmında reseptör sayısında azalma oluşması ile karakterize olup hastalık bitkinlik ve halsizlikle seyretmektedir (Mehndiratta *et al.* 2009). Glokom hastalığında ise göz içi basınç

artmakta ve artan göz içi basıncını düşürmek için dolaylı parasempatomimetik etkili oküler antikolinesterazlar kullanılmaktadır (Estermann *et al.* 2006).

Alzheimer hastalığında patogenezi ve fizyopatoloji tam olarak aydınlatılamadığından dolayı bugün için yeterli ve tam önleyici tedavi bulunmamaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEI) kanıtlanmış en etkili tedavi ajanlarıdır. AChEI'leri kolinesteraz ile asetilkolin yıkılmasını önler ve nöronal sinapta asetilkolin miktarını arttırarak asetilkolinin beyin içerisindeki biyokimyasal ve fonksiyonel etkisini uzatırlar (Işık 2010). Asetilkolinesteraz inhibitörleri olarak;

- Donepezil,
- Rivastigmine,
- Galantamine
- Tacrin

kullanılır (Ercan 2002).

Tacrin ve rivastigmin asetilkolinesteraz ve butirikolinesterazın her ikisini de inhibe ederken, donepezil ve galantamin spesifik olarak asetilkolinesterazı inhibe etmektedir.

1.9. *Rattus norvegicus*

Hastalık, tanı ve tedavi çalışmalarında model organizma seçiminde baz alınan temel kriter; seçilen organizmanın fizyolojik ve genetik yönden insana olan benzerliğidir. Bu bağlamda en çok tercih edilen omurgalı model organizmalar fare ve sıçanlardır. Bilimsel araştırmalarda kullanım oranı ve bu doğrultudaki literatür miktarı sıçanları farelere göre daha ön plana çıkarmaktadır.

Araştırmalarda kullanılan ilk rat soyu 1906'da Philadelphia'da Wistar Enstitüsü'nde Wistar albino rat adında geliştirilmiştir. Wistar Enstitüsü'nden satılan rat kolonilerinin

melezlenmeleriyle sonraları çok sayıda değişik koloniler elde edilmiştir. Laboratuvar ortamında kullanılan sıçanların ortalama ömür uzunluğu 2 yıl olmakla birlikte bu süre nadiren de olsa 3-5 yıla çıkabilirken yabani bireylerin ömür uzunluğu maksimum 10-11 ay civarındadır (Clark 2004).

Genetik potansiyelin belirlenmesi, hastalıklar için tedavi stratejileri ve ilaç geliştirmesi başta tıp olmak üzere birçok doğa biliminin esas gayesidir. Fakat bu amaçla elde edilen yeni bir etken maddenin veya bir tedavi hipotezinin ilk olarak insanlar üzerinde uygulanması kesinlikle söz konusu değildir. Bu nedenle sıçanlar günümüzde birçok deneysel çalışmada kullanılmaktadır. Bu canlılar laboratuvar ortamında en çok farmakoloji, kanser, ve nöral hastalık çalışmalarında tercih edilmektedir. Kullanılan soylar genellikle transgenik veya genetik olarak modifiye organizmalar değildir. Bunun temel nedeni daha önce de belirtildiği gibi insanla olan anatomik, fizyolojik ve genetik benzerliktir. Sıçanlarla insanlar arasındaki benzerlik oranı yaklaşık %98'dir. Fakat bu rakam her iki canlı grubunun DNA'larının %98 oranında benzediğini belirtmemektedir. Bu sayı aynı genlerin her iki canlıda da bulunduğunu ifade etmektedir. Sekans benzerliği ise genden gene değişiklik göstermektedir.

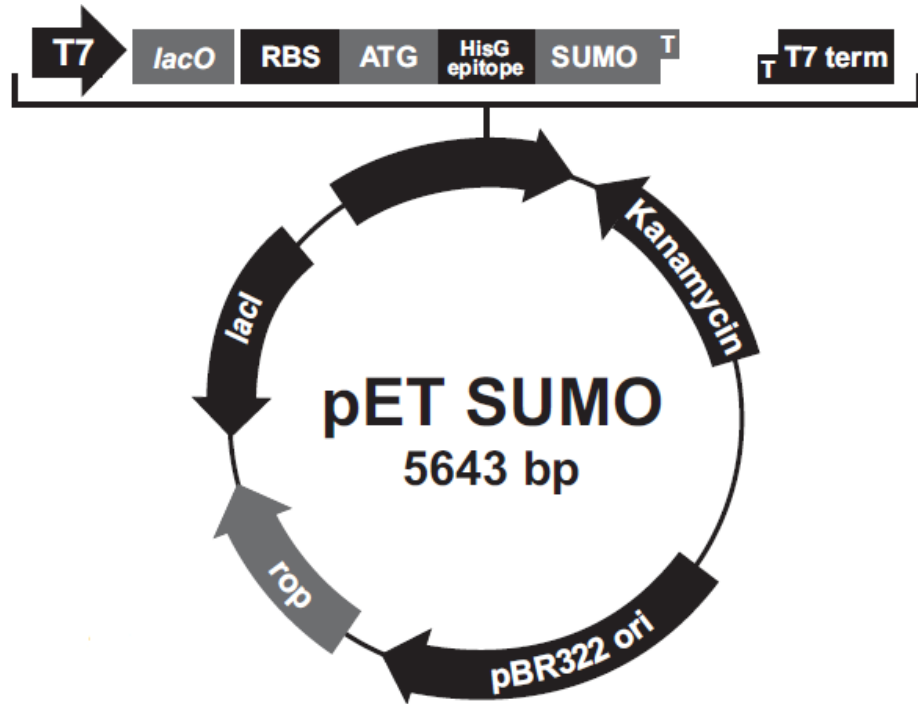
1.10. SUMO Protein Ekspresyon Sistemi

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

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

Sistem vektörü olan pET SUMO önemli özelliklere sahip bir vektördür;

- a. T7lac promotoru:** pET SUMO vektörü IPTG ile indüklendiği zaman sahip olduğu bu bölge sayesinde yüksek miktarda ekspresyon kapasitesine ulaşmaktadır.
- b. N-Terminal Polihistidin (6xHis) Kuyruğu:** Bu bölge aracılığı ile elde edilen protein kolay bir şekilde saflaştırılabilmektedir.
- c. TA Klonlama Sitesi:** Bu bölge sayesinde amplifiye edilen ve adenin kuyruğu içeren PCR ürünü etkili bir şekilde klonlanabilir.
- d. Kanamisin Direnç Bölgesi:** Antibiyotik direncinden sorumlu olan bu bölge tüm vektörlerde olduğu gibi hedef geni alan konak hücrenin selektif ortamdan seçilebilirliğine imkan sağlamaktadır.
- e. pBR322 Replikasyon Orijini:** Bu replikasyon orijini *E.coli* içerisinde kopyalama ve onarım faaliyetlerinden sorumludur.



Şekil 1.6. pET SUMO vektör haritası



Şekil 1.7. pET SUMO vektörüne ait TA klonlama sitesi

1.11. Araştırmanın Amacı

Sıçan (*Rattus norvegicus*) beyin dokusundan, sinir uyarılarının transportunda görevli, kolinerjik kavşakta merkezi bir konuma sahip enzim olan asetilkolinesteraz enziminin (EC 3.1.1.7) üretiminden sorumlu olan AChE geninin klonlanarak bir konak organizmada indükleyici ile gen ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklik incelendi. Meydana gelen ekspresyonel değişim Ellman metodu kullanılarak spektrofotometrik olarak tespit edildi. Homojenattan SDS-PAGE ile proteinin molekül ağırlığı belirlendi. İlerleyen aşamalarda AChE enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonun yapılması ile bu enzimin inhibisyonuna yönelik ilaç çalışmalarının yapılabileceği düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Asetilkolinesteraz enzimi ilk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo marmoneta*) elektrik organından saflaştırılmıştır. Spesifik olmayan bir esteraz olan kolinesteraz, asetilkolini hidroliz etme yeteneğine sahiptir (Nachmanson and Lededer 1939).

Asetilkolinin önceleri sinir uçlarından etkilendiği organa ya da sinir ucundan bir diğer sinir hücrelerine impuls taşıma görevi olduğu fakat ilerleyen çalışmalarda sinir ve kas liflerinde biyoelektiriksel akımı oluşmasında rolünün olduğu anlaşılmıştır (Wilson and Nachmansohn 1954).

Asetilkolin asilhidrolaz tip benzoil kolinesteraz veya psödo-kolinesteraz ya da kolinesterazII olarak adlandırılır ve sistematik ismi EC 3.1.1.8'dir. Bu enzimin biyolojik fonksiyonu net olarak aydınlatılamamış olup, karaciğer, pankreas, kalp, serum ve beynin bazı beyaz cevherlerinde, az miktarda da serobrospinal sıvıda bulunduğu gösterilmiştir (Govindappa *et al.* 1987).

AChE ve asetilkolin asilhidrolaz olmak üzere asetilkolini etkileyen yapıcı birbirine benzer 2 önemli enzim vardır. Gerçek kolinesteraz olarak bilinen sistematik ismi EC 3.1.1.7 olan asetilkolinesteraz eritrositlerde, karaciğerde, dalakta ve sinir uçlarında bulunur (Aras ve Erşen 1988).

Rossenberry and Scoggin (1984) tarafından insan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin yapısı belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin aktivitesinin 5000-5800 ünit/mg olduğu bulunmuştur. Enzimin alt birimleri ditiotreitol tarafından indirgenerek subunit monomerlerinin molekül ağırlığının 75 kDa olduğu gösterilmiştir.

Gnagey *et al.* (1987) meyve sineğinden (*Drosophila melanogaster*) asetilkolinesteraz enzimini izole etmişler ve karakterizasyonunu belirlemişlerdir.

Guhathakurta and Bhattacharya (1987) keçi beyni asetilkolinesteraz enzimi üzerine saf ve ticari bazı pestisidlerin *in vitro* inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Araştırma kapsamında pestisid olarak karbofuran, pentoat, diizopropilflorofosfat (DFP) ve fisostimin kullanmışlardır.

Alvarez *et al.* (1998) tarafından yapılan çalışmada amiloid beta birikimi ile asetilkolinesteraz (AChE) arasında ters orantı bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar AchE olmadığı durumda %26 oranında olan beta amiloid miktarının AchE eklendikten sonra %80'e ulaştığı sonucunu elde etmişlerdir.

Asetilkolin merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi için önemli bir nörotransmitterdir. İnsan beyninin multiple alanlarında mevcut olan kolinerjik sinirlerin birleşimidir (Perry *et al.* 1999). Nörodejeratif hastalıklar bağlamında ön beyindeki kolinerjik çekirdeğin tüm kortikal alanlarına yayıldığı tahmin edilmektedir.

Alzheimer tedavisinde öne çıkan tedavi yöntemlerinden birisi de AChE inhibisyonu odaklı tedavidir. Kolinerjik tedavi adı verilen bu strateji Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan en eski yöntemdir (Francis *et al.* 1999). Marijuana'dan elde edilen bir bileşiğin (THC) piyasada yaygın olarak bulunan ilaçlardan daha etkili olduğu gösterilmiştir (Eubanks 2006; Campbell and Gowran 2007).

Alırız ve Türkoğlu (2000) yılında Van Gölü balığında asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmışlar ve kinetik özelliklerini araştırmışlardır. İnci kefalı plazma ve eritrositlerinden asetilkolinesteraz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması incelenmiştir. SDS-Page elektroforezi ile enzim saflığı kontrol edilmiştir. Saflaştırma oranları plazma AChE için 3251.6, eritrosit AChE için ise 8500 olarak bulunmuştur.

Bir grup araştırmacı bir balık çeşidinin değişik dokularındaki asetilkolinesteraz enzimi üzerine organofosforlu pestisitlerin etkilerini araştırmışlardır (Rahman *et al.* 2004).

Dong *et al.* (2005) Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların asetilkolin eksikliği ile bağlantısı olduğunu bundan dolayı asetilkolin miktarının artırılması veya asetilkolini parçalayan asetilkolinesteraz enziminin aktivitesinin düşürülmesi durumlarında Alzheimer belirtilerinin azaldığı gözlemlemiştir.

Asetilkolinesteraz inhibitörleri, nörotransmitterlerin sinapta yüksek konsantrasyonda kalmasını temin etmek için asetilkolini yıkan enzimin inhibisyonuna neden olurlar. Sinaptik boşlukta AChE aktivitesinin kısıtlanması kolinerjik sinaptik transmisyonu artırır. Dong *et al.* (2005) tarafından yapılan çalışmada APP gen ifadesi olan ve olmayan transgenik fareler üzerinde AChE inhibitörlerinin etkisini araştırmışlardır. Physostigmine ve donepezil gibi AChE inhibitörleri kullanan araştırmacılar farelerde hastalık semptomlarının azaldığını gözlemlemiştir.

Demir and Türkoğlu (2005) ratların serum, plazma, kas ve karaciğer asetilkolinesterazı üzerine neostigminmetilsülfatın etkisini *in vivo* olarak araştırmıştır.

Güloğlu *et al.* (2006) koyun karaciğerinden asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmış ve karakterizasyonu yaparak ayrıca bazı antibiyotik ve ilaçların enzim üzerine etkilerini incelemiştir.

Eggers *et al.* (2006) AChE aktivitesi ile ApoE4 geninin alleli arasındaki bağlantıyı araştırmışlardır. Bu çalışmaları neticesinde düşünüldüğü gibi asetilkolinesteraz aktivitesi ile ApoE4 gen alleli arasında korelasyon tespit etmişlerdir. ApoE4 gen alleli taşıyan bireylerde AChE aktivitesinin önemli derecede yüksek olduğu sonucunu elde etmişlerdir.

Zhou and Xia (2008) yaptıkları bir çalışmada göçmen şark çekirgesi (*Locusta migratoria manilensis*) asetilkolinesteraz cDNA'sını klonlamış ve karakterize etmişlerdir. Biyoinformatik analizleri klonlanmış genin ace1'in bir ailesi olduğunu göstermiştir. Klonlanan AChE 1 geninin *L. migratoria manilensis*' te organofosfat böcek dirençliliğinde ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Ovadia *et al.* (2008) tarafından yetişkin *Dictyocaulus viviparus*'dan salgılanan asetilkolinesterazın iki farklı formunun (Dv-ACE-1 ve Dv-ACE-2) moleküler klonlaması, ekspresyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Southern Blot ve PCR ile bu genlerin farklı enzimleri kodladığını göstermişler. Klonlanan genler *Pichia pastoris*'te eksprese ettirilmiş ve enzimlerin aktif olduğunu fakat biyokimyasal özelliklerinin farklı olduğunu belirlemişlerdir. Her iki enzimin asetilkolini substrat olarak kullandığını fakat aşırı substrat inhibisyon kapasitesinin ve aktivite için optimum pH'larının farklı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Shuang *et al.* (2010) *L. paeta*'nın farklı popülasyonlarından asetilkolinesteraz 1 genini klonlamışlar ve dizilemişlerdir. Hem nükleotid hem de aminoasit sekanslarının kıyaslanması ile farklı popülasyonlardan *L. Paeta* ace 1 genleri arasında nükleotid polimorfizimleri gözlemlemişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar

NO	ALET ve CİHAZ	MARKA
1	Derin Dondurucular	Vestel FT 280, Bosch
2	Destile Su Cihazı	Mp MINI Pure
3	Elektroforez Cihazı	Sigma Aldrich
4	Otoklav	HMC HIRAYAMA
5	Güç Kaynağı	Thermo EC EC 135-90
6	Hassas Terazî	DenverInstrument, SHIMADZU ATX224
7	Kar Üretme Makinesi	Scotsman
8	Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A
9	pH Metre	Mettler Toledo
10	Mini Santrifüj	AOSHENG
11	Soğutmalı Santrifüj	Hettich Mikro 220R
12	UV Görüntüleme Cihazı	Vilber Lourmat
13	Mikrodalga Fırın	Beko MD 1500
14	Falkon/Ependorf Tüpler	Ependorf
15	Ependorf Tüpler	Ependorf
16	Vortex	Wisd WiseMix VM-10
17	PCR	BIO RAD C100 Thermal Cycler
18	Spektrofotometre	Becman Coulter
20	Mikropipet Takımı	Ependorf
21	Isıtıcı Blok	Lab Line
22	Derin Dondurucu (-86)	New Brunswick Premium U410

3.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler

ACHl (Asetilkolintiyoiyodür), Agaroz, Akrilamid, Amonyum persülfat, Bisakrilamid, β -merkaptotanol, DEPC, dNTP, DTT, DTNB, DMSO, Etidyum Bromür, Etilen Diamin Tetra Asetik asit (EDTA), Formamid, Formaldehit, First-Strand cDNA Synthesis Kit, Glisin, Gliserol, IPTG, İzopropanol, Kloroform, N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin (TEMED), İzopropanol, LB, Metanol, Rekombinant RNaz inhibitörü, SDS (Sodyum Dodesil Sülfat), Sodyum asetat, Sodyum fosfat, Tris, TCA, Tween-20, Trizol, TAE, TritonX-100, Tween-80,

3.1.3. Kullanılan besi yeri ve tamponların hazırlanması

LB (Luria-Bertani) Sıvı Besi Yeri

Boş bir otoklav şişesine %1 tyryptone, %0,5 yeast extract ve %1 NaCl tartılır. Bu karışım 950 ml saf suda çözündürülür. pH 7'ye ayarlandıktan sonra son hacim 1l'ye ayarlanıp otoklavlanır. Eğer antibiyotik katılması gerekiyorsa otoklav sonrası 55°C'ye soğuyunca kadar beklenip antibiyotik eklendikten sonra +4°C'de karanlıkta saklanır. Eğer katı besi yeri isteniyorsa aynı besi yerine 15 g/L olacak şekilde agar katılır.

Lizis Tamponu (pH:7.8, 100 ml)

Taze olarak kullanılması daha sağlıklı olacağı için küçük hacimlerde hazırlanır. 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 çözündürülür. pH ayarlanıp son hacim 100 ml'ye tamamlanır. +4°C'de muhafaza edilir.

Aktivite Çözeltilerini Hazırlanışı

Asetilkolintiyoiyodür (ACHl): 0.145 g ACHl tartılır ve 50 ml saf suda çözülür.

DTNB: 0.01 g DTNB (5,5' ditiyobis(2 nitro benzoik asit)) tartılır ve 50 ml saf suda çözülür.

1M 100ml Tris-HCL Tamponu (pH:8): 12.1 g Tris ve 0.186 g EDTA tartılır ve 100 ml suda çözülürerek sırasıyla pH 8'e ayarlanır.

SDS PAGE Çözeltilerinin Hazırlanışı

1M Tris-HCL (pH:8.8): 12.1 g Tris 90 ml saf suda çözülür. pH 8.8'e ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

1M Tris-HCL (pH:6.8): 12.1 g Tris 90 ml saf suda çözülür. pH 6.8'e ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

%30 Akrilamid - %8 Akrilamid: 6 g akrilamid, 0.16 g bisakrilamid tartılır ve 13.84 ml saf suda çözülür.

%10'luk SDS: 0.5 g SDS alınıp 4.5 ml suda çözülür ve son hacim saf su ile 5 ml'ye tamamlanır.

%10'luk PER: 0.5 g amonyumpersülfat tartılır ve 4.5 ml saf suda çözülür. Son hacim 5 ml'ye tamamlanır.

2X SDS-PAGE Numune Tamponu

0.5 M Tris-HCl (pH:6.8), gliserol, β -merkaptotanol, 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.

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 [(NH₄)₂S₂O₈] 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 hazırlanır, %1,5'lik PER'den 0,2 ml ilave edilir.

3.1.4. Kullanılan mikroorganizmalar

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

3.1.5. DNA kütüphanesi

Çalışmada elde edilen olan protein ürününe ait cDNA kütüphanesi *Rattus norvegicus* (Sprague Dawley) ırkı sıçanın beyin korteks dokusundan elde edildi. cDNA kütüphanesinden dizayn edilen ileri ve geri primerler ile AChE genine ait cDNA sekansı PCR ile çoğaltıldı.

3.1.6. pET SUMO klonlama ve protein ekspresyon sistemi

Protein ürününe ait dizi PCR reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra bu sisteme klonlandı, klonlanan vektör izole edildikten sonra ekspresyon için *E.coli* BL21(DE3)'e transforme edildi.

3.1.7. T4 DNA ligaz

PCR ile çoğaltılan PCR ürününün ligasyon için; T4 DNA ligaz enzimi kullanıldı.

3.1.8. Büyütme (besi yeri) ortamları

Rekombinant vektör, *E.coli* hücrelerine transforme edildikten sonra hücrelerin gelişmesini sağlamak için kullanıldı.

3.1.9. Plazmit saflaştırma kiti

Rekombinant vektörü içeren doğru koloniden plazmit saflaştırma için kullanıldı.

3.1.10. Primerler

Klonlanacak gen bölgesinin çoğaltılması ve transformasyon sonrası rekombinant vektörün kontrolleri için kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sıçan beyin dokusundan total RNA izolasyonu

Temin edilen organizma sıçan (*Rattus norvegicus*) uygun şekilde kurban edilip yine uygun şartlarda beyin dokusu alınarak total RNA izolasyonu için -20°C’de saklandı.

Hayvansal dokudan total RNA izolasyonunda (Méndez 2011)’den modifiye edilen yöntem takip edildi. Bu yöntemde önceden alınıp RNAlater içerisinde -20°C’de saklanan dokular kullanıldı. Deney ortamı ve kullanılacak araç gereçler steril hale getirildikten sonra RNA izolasyonu yapıldı.

- a. 0.3 g doku tartılıp küçük parçalara ayrıldıktan sonra sıvı azotla parçalandı.
- b. Toz haline getirilen dokudan 100 mg tartılıp, temiz ve soğuk bir ependorfa alınıp üzerine 1 ml Trizol eklenip karıştırıldı.
- c. 12000 g'de 10 dk +4°C'de santrifüj işlemi yapıldı.
- d. Santrifüj sonrası sulu faz (900 µl) yeni tüpe alınıp 5 dk buz üzerinde bekletilip üzerine 200 µl kloroform eklenerek kuvvetlice karıştırıldı, 2 dk buzda inkübe edildi.
- e. 12000 g'de 15 dk +4°C'de santrifüj edilip sulu faz yeni tüpe alındı.
- f. Alınan sulu faz üzerine 500 µl soğuk izopropanol eklenip ters yüz edildikten sonra 10 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- g. 12000 g'de 10 dk +4°C'de santrifüj edilip sulu faz uzaklaştırıldı.
- h. Dipte kalan pellet üzerine 1 ml soğuk saf etanol ilave edilerek kısa süreli vortekslendi.
- i. 9000 g'de 5 dk +4°C'de santrifüj edilip sulu faz tamamen uzaklaştırıldı.
- j. Pellet 10-15 dk süresince oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldı.
- k. Pellet tam kurumadan 50 µl DEPC su içinde çözündürüldü.

3.2.2. İzole edilen RNA'nın agaroz jel elektroforezi ile kalitatif tayini

Elektroforez yöntemi hem agaroz hem de poliakrilamid jeller için uygulanan kromotografik bir metottur. Bu yöntem negatif yüklü DNA ve RNA'nın kullanılan tampon yardımıyla elektrik alanda negatif kutuptan pozitif kutuba yürütülmesi esasına dayanır. Böylece DNA veya RNA'nın molekül büyüklüğüne göre ayrımı yapılmış olur.

3.2.2.a. Jelde yürütülen RNA örneğinin hazırlanması

İzole edilen RNA'dan 1 µl alınıp üzerine 3.5 µl ddH₂O, 0.5 µl 20xMOPS solüsyonu ve 5 µl formamid ilave edildi ve 65°C'de 15 dk inkübe edildi.

3.2.2.b. Jelin hazırlanması

1.88 ml 20xMOPS solüsyonuna son konsantrasyon %1 olacak şekilde agaroz eklendikten sonra üzerine 28.5 ml ddH₂O eklenip kaynatıldı. Agaroz iyice çözündükten sonra 35-40°C'ye kadar soğutulup üzerine 6.68 µl formamid ve son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr eklenip jel donmaya bırakıldı.

3.2.2.c. Elektroforez

Yüklemeye hazır hale getirilen RNA örnekleri 6X yükleme boyasıyla karıştırılıp, jel üstünde bulunan kuyucuklara yüklendi, yükleme bittikten sonra 60 V'ta 40 dk elektrik akımı uygulandı. Daha sonra jel UV ışık altında gözlemlenerek kalitatif analiz yapıldı.

3.2.3. Sıçan beyin dokusundan cDNA kütüphanesinin oluşturulması

cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında Revers Transkriptaz yöntemi kullanıldı. Bu işlemde First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA) ile oligodT primerleri kullanıldı.

- a. İlk olarak steril bir mikrosantrifüj tüpüne sırasıyla;
 - 1 µL 50 µM Oligo dT20,
 - 10 pg-5 µg total RNA,
 - 1 µl 10 mM dNTP Mix (pH=7.0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin her birinden 10 mM)

eklendikten sonra son hacim ddH₂O ile 13 µl'ye tamamlandı.

- b. Bu karışım 65°C'de 5 dk ısıtıldıktan sonra buz üzerinde 1 dk inkübe edildi.

- c. Karışım kısa süreli santrifüjlenip ve üzerine sırasıyla;

- 4 µl 5xFirst-Strand Buffer,
- 1 µl 0.1 M DTT,
- 1 µl RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (40 u/µl)
- 1 µl SuperScript™ III RT (200 u/µl)

eklendikten sonra tüm karışım hafif bir pipetleme ile karıştırıldı.

d. Son olarak bu karışım 50°C’de 30-60 dk bekletildikten sonra 70°C’de 15 dk. ısıtılarak reaksiyon durduruldu.

3.2.4. Primerlerin hazırlanması

AChE genine ait ileri ve geri primerler NCBI (National Center for Biotechnology Information)’da tespit edilen *Rattus norvegicus* asetilkolinesteraz (Ache), mRNA (Nucleotide- NM_172009.1) transkriptine ait cDNA sekansına göre yapıldı. Bunun için internet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) *Rattus norvegicus* asetilkolinesteraz genine ait gen bölgesi bulundu. Elde edilen gene ait protein kodlama bölgesi tespit edilerek, primerler gen kodlama bölgesinin başından ve sonundan tüm geni amplifiye edecek şekilde seçildi. Belirlenen primerler daha sonra <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> web sayfasında blastlanarak başka bir gene ait diziye de amplifiye edip edemeyeceği belirlendi. Son olarak primerlerin Tm sıcaklıkları <http://eu.idtdna.com> adresinden teyit edildi.

3.2.5. AChE Genine Ait cDNA Sekansının Çoğaltılması

Dizayn edilen ileri ve geri primerler ile uygun PCR protokolü uygulanarak AChE genine ait sekans çoğaltıldı.

Çizelge 3.2. AChE geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon karışımı

PCR Bileşenleri	Kullanılan Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	7,3 µl	-
Primer R (10 pmol)	0.5 µl	0.33 pmol
Primer F (10 pmol)	0.5 µl	0.33 pmol
Tampon (10X)	1.5 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1,3 µl	2,16 mM
dNTP (10 mM)	0.6 µl	0.46 mM
Taq Polimeraz (5 u/µl)	0.3 µl	1.5 Ünite
cDNA (1/10)	3 µl	
Toplam Reak. Hacmi	15 µl	

Çizelge 3.3. AChE geninin amplifikasyonu için PCR işlemi parametreleri

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94°C / 4 dk / 1 döngü
Denatürasyon	94°C / 90 sn / 30 döngü
Yapışma (Annealing)	60°C / 40 sn / 30 döngü
Uzama (Extension)	72°C / 100 sn / 30 döngü
Son Uzama	72°C / 10 dk / 1 döngü
Bekleme	+4°C / -

3.2.6. Elde edilen PCR ürününün agaroz jel elektroforezi ile kalitatif tayini

Elde edilen total RNA'dan oligo-dT yöntemi ile cDNA kütüphanesi oluşturuldu. cDNA kütüphanesi kullanılarak PCR ile tüm gen bölgeleri arasından sadece klonlanmak istenilen gen bölgesi çoğaltıldı. PCR işlemi ile elde edilen ürünlerin kalitatif tayini agaroz jel elektroforezi yapılarak doğruluğu tespit edildi.

Bu aşamada %1'lik agaroz jeli hazırlandı. Bunun için hazırlanan miktara göre %1 oranında tartılan agaroz gereken miktarda TAE içerisine alındı. Mikrodalga fırında eritilen bu karışım 35-40°C'ye soğuduğunda son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr eklenip jel donmaya bırakıldı. Jelin donmasını takiben kuyucuklara

yükleme boyası ile karıştırılıp 5-8 µl civarında PCR ürünü yüklenip 60-70 V'ta markırla birlikte yaklaşık 1 saat yürütüldü.

3.2.7. Rekombinant vektörün elde edilmesi

AChE enziminin üretiminden sorumlu olan gen bölgesi (cDNA) dizayn edilen ileri ve geri primerler ile PCR'da çoğaltıldıktan sonra uygun şartlarda pET SUMO (Invitrogen, USA) vektörüne ligasyonu yapıldı.

Burada dikkat edilmesi gereken husus kullanılan PCR ürününün taze (maksimum 1 günlük) olmasıdır. Bu işlem sonucunda rekombinant vektör elde edildi.

Bu işlem için sırasıyla;

- 1 µl PCR ürünü,
- 1 µl 10X ligasyon tamponu,
- 2 µl pET SUMO vektör,
- 5 µl dH₂O,
- 1 µl T4 DNA ligaz eklendi.

Karışım hazırlandıktan sonra bir gece 15°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.8. Rekombinant vektörün kompetent hücrelere transformasyonu

Bu aşamada önceki adımda elde edilen ligasyon ürünü kullanıldı. Bu işlem için pET SUMO sisteminde belirtilen yol izlenildi.

a. -80°C'de korunan kompetent hücreler (*E.coli* One Shot® Mach1™-T1^R) buz üzerinde yavaş bir şekilde çözündükten sonra 2 µl ligasyon ürünü eklendi.

b. Buz üzerinde 5-30 dk inkübe edildi.

- c. Hızlı bir şekilde 42°C’de 30 sn inkübe edildi.
- d. Tüpler hızlı bir şekilde tekrar buz üzerine alındı.
- e. Her bir tüpe 250 µl S.O.C. besi yeri eklendi.
- f. Ağzı sıkıca kapatılan tüpler 1 saat 37°C’de 200 rpm de inkübe edildi. İnkübasyon ürünü antibiyotik içeren petrilere 100-200 µl şeklinde yayıldı.
- g. Petriler büyüme için gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

3.2.9. Koloni PCR

Büyütme işleminden sonra petri kabında büyüyen koloniler numaralandırıldıktan sonra koloni PCR yapıldı. Koloni PCR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Bu işlem rekombinant vektör taşıyan kolonilerin belirlenmesi için yapıldı. Transformasyon sonrası oluşan kolonilerden rastgele 8 koloni belirlenip numaralandırıldı. Kalıp DNA olarak mikro pipet ucuyla alınan koloniler kullanıldı. Bu işlemde sonra PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile markıra karşı yürütüldü. Pozitif çıkan kolonilerden daha sonra vektöre ait ileri ve geri primerler kullanılarak kontrol PCR yapıldı.

Çizelge 3.4. Koloni PCR reaksiyon karışımı

PCR Bileşenleri	Kullanılan Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	7,3 µl	-
Primer R (10 pmol)	0.5 µl	0.33 pmol
Primer F (10 pmol)	0.5 µl	0.33 pmol
Tampon (10X)	1.5 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1,3 µl	2,16 mM
dNTP (10 mM)	0.6 µl	0.46 mM
Taq Polimeraz (5 u/µl)	0.3 µl	1.5 Ünite
cDNA (1/10)	3 µl	
Toplam Reak. Hacmi	15 µl	

Çizelge 3.5. Koloni PCR işlemi parametreleri

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94°C / 4 dk / 1 döngü
Denatürasyon	94°C / 90 sn / 30 döngü
Yapışma (Annealing)	60°C / 40 sn / 30 döngü
Uzama (Extension)	72°C / 100 sn / 30 döngü
Son Uzama	72°C / 10 dk / 1 döngü
Bekleme	+4°C / -

Doğru büyüklükte bantların görüldüğü koloniler tespit edilerek bu koloniler çoğaltıldı. Bu işlem için seçilen koloniler sıvı besi yerinde çoğaltılıp sonraki basamaklarda kullanılmak için gliserol eklenerek -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.10. Plazmid izolasyonu

Koloni PCR'ın ardından rekombinant vektörü aldığı doğrulanan koloniler seçilerek bir gece LB sıvı besi yerinde büyütüldü.

Bu işlem için Invitrogen-PureLink-HiPure (California, USA) plazmid DNA saflaştırma kiti kullanıldı. Transforme edilen *E.coli* hücreleri uygun miktarda kanamisin içeren sıvı LB besi yerinde 1 gece geliştirildi ve bakteri hücrelerinin 600 nm’de ki optik dansitesi 2.0 (OD₆₀₀) olduğunda;

- a.** Mikrosantrifüj tüpüne 1 gecelik kültürden 1-3 ml alındı.
- b.** Kültür, 4000 g’de 5-10 dk santrifüj edilip sulu faz uzaklaştırıldı.
- c.** Pellete 0.4 ml RNase içeren resüspansiyon tamponu (R3) eklenerek hücreler homojen oluncaya kadar süspanse edildi.
- d.** 0.4 ml Lizis tamponu (L7) eklenip yavaşça ters çevrilerek lizat karışımı tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
- e.** 0.4 ml presipitasyon tamponu (N3) eklenip tüpler hemen ters çevrilerek karışım tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldı.
- f.** Lizat 12000 g’de oda sıcaklığında 10 dk santrifüj yapıldı.
- g.** f basamağında elde edilen sulu faz dengelenen kolona yüklenip kolondaki solüsyonun yerçekimi ile akıp kuruması beklendi.
- h.** Kolon iki kez 2,5 ml Yıkama Tamponu (W8) ile yıkanıp her yıkamadan sonra kolondaki solüsyonun yerçekimi ile akıp kuruması beklendikten sonra alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
- i.** Kolonun altına steril bir mikrosantrifüj tüpü (elüsyon tüpü) yerleştirildi.
- j.** DNA’yı elüe etmek için kolona 0.9 ml elüsyon tamponu eklenerek solüsyonun yerçekimi ile akıp kuruması beklendikten sonra kolon atıldı.
- k.** Elüsyon tüpüne 0.63 ml izopropanol ilave edilerek iyice karıştırıldı.
- l.** Elüsyon tüpü 12000 g’de 4°C’de 30 dk santrifüj edilip sulu faz dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- m.** DNA pelleti 1 ml %70’lik etanol ile süspanse edildi.
- n.** Tüp 12000 g’de 4°C’de 5 dk santrifüj edilerek sulu faz dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- o.** Pellet 10 dk süreyle havada kurutuldu.
- p.** DNA pelleti 50 µl TE tamponunda süspanse edildi.

r. Saflaştırılan DNA hemen kullanmak için +4°C’de veya uzun süreli saklamak için alikuatlar halinde -20°C’de stoklandı.

3.2.11. Çapraz kontrol PCR

Plazmid izolasyonu yapıldıktan sonra gen ürününün vektöre doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediğini belirlemek için hem gene hem de vektöre ait primerler ile çapraz kontrol PCR yapıldı.

Çizelge 3.6. Plazmitten yapılan kontrol PCR reaksiyonları

Reaksiyon	Template	İleri Primer	Geri Primer	Büyüklik (bp)
1	3. koloni plazmit	-	-	7438
2	6. koloni plazmit	-	-	7438
3	3. koloni plazmit	Vektör	Vektör	2103
4	6. koloni plazmit	Vektör	Vektör	2103
5	3. koloni plazmit	Gen	Vektör	1998
6	6. koloni plazmit	Gen	Vektör	1998
7	3. koloni plazmit	Vektör	Gen	1950
8	6. koloni plazmit	Vektör	Gen	1950
9	3. koloni plazmit	Gen	Gen	1845
10	6. koloni plazmit	Gen	Gen	1845

Bu besiyerlerinden daha sonra rekombinant vektör izole edildi. SUMO sisteminde A-T klonlama yapıldığı için gen ürünü bazen ters bir şekilde insört olabilmektedir. Bunun için koloni PCR’da pozitif sonuç veren kolonilerden izole edilen plazmitler 4 farklı PCR yapılarak doğru olanı tespit edildi.

3.2.12. Pozitif sonuç veren bakterilerin gliserolde stoklanması

Bu aşamada geni doğru bir şekilde alan vektörü taşıyan 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.

3.2.13. Rekombinant plazmidin protein üretimi için konağa transformasyonu

Plazmitlerin doğruluğu tespit edildikten sonra rekombinant vektörler protein üretiminin gerçekleştirileceği konak organizmalara transfer edildi. Transfer işlemi klasik ısı şoku yöntemiyle yapıldı.

Bu işlemin yapılmasında yine 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. besi yeri eklendi,
- e. 1 saat 37°C'de 200 rpm de inkübe edildi,
- f. Tüpten 50 µl alınıp antibiyotikli katı besi yerine inoküle edildi.

Ekim sonrası katı LB petrisi inkübatörde, sıvı besi yeri ise 37°C'de 200 rpm'de inkübe edildi.

3.2.14. Pilot (deneme) ekspresyon

Rekombinant vektör transforme edilen hücreler daha büyük besiyerlerinde büyütüldü ve indükleyici ile ekspresyon seviyesindeki etki saptandı. Bunun için;

- İlk olarak önceki geceden transformasyona uğramış hücreler 200 ml antibiyotikli besi yerine alındı.
- OD₆₀₀ olana kadar inkübatörde büyütüldü.
- Yeterli büyüme düzeyine ulaştıktan sonra bu besi yeri eşit hacimlerde iki yeni erlene bölündü.
- Erlenlerden birine hiçbir şey eklenmezken diğerine son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde IPTG eklendi. IPTG eklenen erlenden 0., 2., 4., 6. ve 7. saatte örnekler alındı.
- Alınan bu örnekler kısa süreli santrifüj işleminin ardından sulu fazı uzaklaştırıldıktan sonra -20°C’de saklandı.

3.2.15. Toplanan örneklerin analizi

Bu aşamada önce hücreler parçalanıp protein içeriği açığa çıkarıldı ardından kalitatif ve kantitatif tayinler yapılarak proteinin üretilip üretilmediği tespit edildi.

3.2.15.a. Hücrelerin parçalanması

Lizis işlemi için toplanan örneklerden elde edilen pelletler üzerine uygun miktarda lizis tamponu eklendikten sonra yavaş yavaş erimesi beklendi. Örnekler soğuk su içerisinde 15 saniye sonikasyon 45 saniye bekleme olacak şekilde 3-4 kez tekrarlanan işlemle parçalandı. Parçalama sonrası santrifüj edilen örneklerden alınan sulu faz hemen soğuk ortama alındı.

3.2.15.b. Aktivite tayini

AChE enziminin aktivitesinin ölçümü için bu enzime spesifik olan Ellman metodu kullanıldı.

Ellman metoduyla AChE aktivitesinin tayini

Asetilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümü için Ellman metodu kullanıldı. Bu yöntemin esası, reaksiyon esnasında oluşan sarı renkli anyon (2-nitro-5 tiyobenzoat)'un pH 8'de spektrofotometrede 412 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. Substrat olarak tiyokolin esteri kullanıldı (Ellman *et al.* 1961).

Çizelge 3.7. Aktivite ölçümünde küvet içeriği

	Kör	Numune
Saf Su	800 µl	750 µl
Tampon (Tris-HCL, pH:8)	100 µl	100 µl
DTNB	50 µl	50 µl
Enzim	50 µl	50 µl
AChI	—	50 µl

3.2.15.c. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Öncelikle elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. İki cam plaka birbiri üzerine konup jel hazırlama cihazına sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlandıktan sonra plakalar arasına cam pipetle döküldü. Jel yüzeyinin düzgün olması için izopropanol katılaşınca kadar (yaklaşık yarım saat) beklendi. Üstündeki izopropanol döküldü ve daha sonra yığma jeli üst yüzeye kadar ilave edilerek üzerine dikkatlice tarak yerleştirildi. Polimerleşmenin ardından tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme

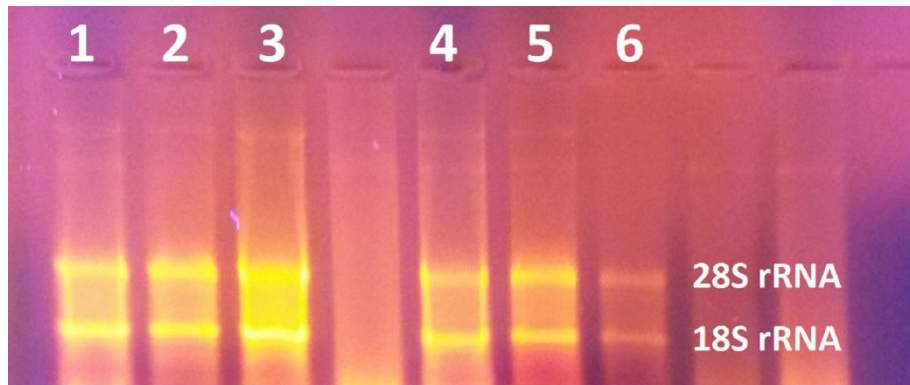
tamponu konuldu. Numuneler her birinden 20 µg olacak şekilde hazırlanıp toplam hacim 1 ml olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu ilave edildi. 3 dakika su banyosunda kaynatılan numuneler soğutularak yuvalara yüklendi. Numuneler, önce 30 dk 60 voltta daha sonra da 90 dk 12 voltta oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesildikten sonra cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Jel kabına konularak üzerini kaplayacak kadar renklendirme çözeltisi ile dolduruldu. 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldıktan sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılıp renksizleştirme çözeltisine konuldu. Belirli aralarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılarak, protein bantlarının belirginleşmesi sağlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İzole Edilen RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Kalitatif Tayini

Temin edilen organizma olan sıçan (*Rattus norvegicus*) uygun şekilde sakrifiye edilip yine uygun şartlarda beyin dokusu alınarak -20°C'de saklandı. Bu dokulardan total RNA izolasyonu bölüm 3.2.1'de anlatılan protokole göre gerçekleştirildi ve agaroz jel elektroforezi ile kalitatif tayini yapıldı.

Total RNA jelde belirgin olup 18S ve 28S rRNA bantlarına sahiptir. 28S rRNA bandı 18S rRNA bandının yaklaşık iki katı kadar bir parlaklık verir. Bu oran toplam RNA'nın parçalanmadan elde edildiğinin bir göstergesidir.



Şekil 4.1. Sıçan beyin dokusundan elde edilen total RNA'nın jel görüntüsü (1, 2, 3 4, 5,6 jele yüklenen RNA örneği olup 18S ve 28S rRNA bantlarına sahiptir)

4.2. Sıçan AChE Genine Ait cDNA Sekansının Çoğaltılması

Accession Number :NM_172009

Total Baz Sayısı :2066 bç

mRNA Baz Sayısı :1845 bç

NCBI'dan Nucleotide- NM_172009 referens numaralı AChE genine ait ulaşılan sekans bilgisi aşağıda verildiğı gibidir.

ATGAGGCCTCCCTGGTATCCCTGCATACACCCTCCCTGGCTTCTCCACTCCTCTTCCTCCTCCTCTCCC
TCCTGGGAGGAGGGGCAAGGGCTGAGGGCCGGGAAGACCCTCAGCTGCTGGTGAGGGTTCGAGGGGGCCA
GCTGAGGGGCATCCGCCTGAAGGCCCCCTGGAGGGCCAGTCTCAGCTTTTCTGGGCATCCCCTTTGCAGAG
CCACCTGTGGGCTCACGTAGATTTATGCCACCAGAGCCCCAAGCGCCCCCTGGTCAGGAATATTGGATGCTA
CCACCTTCCAAAATGTCTGCTACCAATACGTGGACACCCTGTACCCTGGGTTTGAGGGTACCGAGATGTG
GAACCCCAATCGAGAGCTGAGTGAAGACTGCCTTTATCTTAATGTGTGGACACCATACCCAGGCCCTACT
TCTCCACACCTGTCCTCATCTGGATCTATGGGGGTGGTTTCTACAGTGGAGCATCCTCCTTGGACGTGT
ATGACGGCCGTTTCTGGCCCAGGTTGAGGGAACCGTGTGGTATCTATGAACCTACCGAGTGGGAACCTT
TGGCTTCTTGGCTCTACCAGGAAGCAGAGAAGCCCCCTGGCAATGTAGGCCTGCTGGATCAACGGCTTGCC
TTGCAATGGGTACAAGAAAATATCGCAGCCTTTGGGGGAGACCCAATGTCAGTGAATCTGTTTGGGGAGA
GTGCAGGTGCAGCCTCAGTGGGCATGCACATTCTGTCCCTGCCAGCAGGAGCCTCTTCCACAGGGCTGT
CCTGCAGAGTGGCACACCCAATGGGGCCTGGGCCACTGTGAGTGCGGGAGAGGCCAGGCGCAGGGCCACA
CTGCTGGCCCGCCTTGTGGGCTGTCCCCCAGGTGGCGCTGGTGGCAATGACACCGAGCTGATATCCTGCT
TGAGGACAAGGCCCCGCTCAGGACCTGGTGGACCACGAGTGGCATGTGCTGCCTCAAGAAAGTATCTTCCG
GTTTTCTTTCGTGCCTGTGGTGGACGGGGATTTCCTCAGTGACACGCCGGACGCTCTCATCAATACTGGA
GATTTTCAAGACCTGCAGGTGCTGGTGGGTGTGGTGAAGGACGAGGGCTCCTACTTTCTGGTTTACGGGG
TCCCAGGCTTCAGCAAAGACAATGAATCTCTCATCAGCCGGGCCCAGTTCTTGCTGGGGTGC GGATCGG
TGTACCCCAAGCGAGTGACCTGGCGGCCGAGGCTGTGGTCCCTGCATTATACAGACTGGCTGCACCCTGAG
GACCCTGCCCACCTGAGAGATGCCATGAGTGCGGTGGTAGGCGACCACAACGTTGTGTGCCCTGTGGCCC
AGCTGGCTGGGCGACTGGCTGCCCCAAGGGGCTCGGGTCTATGCCTACATCTTTGAACACCGTGCCCTCCAC
ATTGACTTGGCCCCCTCTGGATGGGGGTGCCCCATGGCTATGAAATCGAGTTCATCTTTGGGCTCCCCCTG
GATCCCTCACTGAACCTACACCGTGGAGGAGAGAATCTTTGCTCAGCGACTTATGCAATACTGGACCAATT
TTGCCCCGACAGGGGACCCCAATGACCCTCGAGACTCTAAGTCTCCACGGTGGCCACCGTACACCCTGC
CGCGCAGCAATACGTGAGCCTGAACCTGAAGCCTTTGGAGGTGCGGCGGGGACTGCGCGCCCAGACCTGC
GCCTTCTGGAATCGTTTTCTCCCCAAATTGCTCAGCGCCACAGACACGCTGGACGAGGCGGAGCGCCAGT
GGAAGGCCGAGTTCCACCGCTGGAGCTCCTACATGGTGCCTGGAAGAACCAGTTCGACCCTATAGCAA
GCAGGAACGCTGCTCAGACCTGTGACCCCTTGGGGACCCAGGTCCCTGCCGTCCCTGCCGAGCCCCCTGATT
GTATATACACTATTTATTTAAGGGCTGGGATATAATACAACCGAGCCCCCAGGCCCTGTCCACCCCTCCC
CGACTTCCTCCCACTAGGGGATCCTCATCTTCTGCATGTTTTAAACTGAGCTCCCCCTCCCCGCGGTGCCT
TGCCCCCTCTGGGCCGCCAATAAACTGTTACAGCTC

Çizelge 4.1. AChE genine ait primer bilgileri

Primer	Sekans (5' - 3')	Tm (°C)	Uzunluk (bç)
AChE İleri	ATGAGGCCTCCCTGGTATCC	60	20
AChE Geri	TCACAGGTCTGAGCAGCGT	60	19

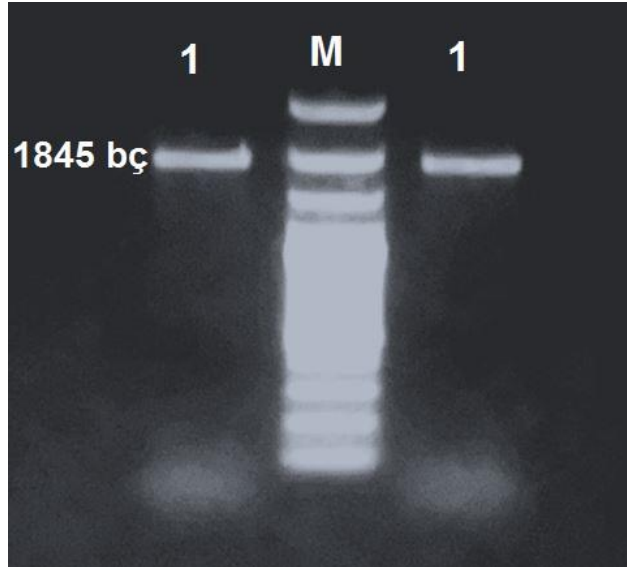
Rekombinant vektörü PCR'da çoğaltarak kontrol analizi yapmak için kullanılan primerler aşağıdaki gibidir.

Çizelge 4.2. SUMO vektörüne ait primer bilgileri

Primer	Sekans (5' - 3')	Tm (°C)	Uzunluk (bç)
SUMO İleri	AGATTCTTGTACGACGGTATTAG	60	23
T7 Geri	AGATTCTTGTACGACGGTATTAG	60	20

4.2.1. PCR ürününün agaroz jel elektroforezi ile doğrulanması

Oluşturulan cDNA kütüphanesi kullanılarak klonlanmak istenilen gen bölgesi Çizelge 3.2’de ki PCR reaksiyonu karışımı protokolü ve Çizelge 4.1’de ki primerler ile çoğaltıldıktan sonra elde edilen ürünlerin doğruluğu agaroz jel elektroforezi ile kalitatif olarak teyit edildi.

**Şekil 4.2.** cDNA kütüphanesinden PCR ile elde edilen gen bölgesi. (1: Jele yüklenen PCR örneği, M: Markır)

4.3. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi ve Konak Organizmaya Transformasyonu

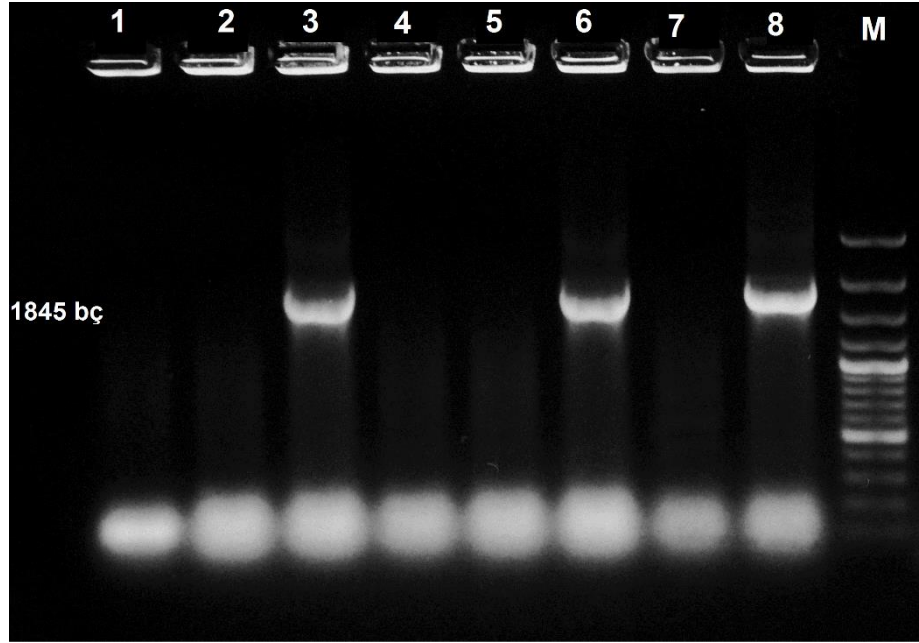
Elde edilen gen bölgeleri bölüm 3.2.7’de anlatıldığı gibi uygun konak organizmaya aktarılacak üzere ligasyon işlemi ile vektöre insört edildi. Bu işlemin ardından ilgili ürünü taşıyan vektör, bölüm 3.2.8’de verilen protokole göre transformasyon işlemi ile konak organizmaya aktarıldı. Bu organizmalar bir gece inkübasyondan sonra, elde edilen yeni bakteriler uygun besi yeri ortamına ekildi. Ekim işleminin ardından petri kapları yine bir gece uygun sıcaklıkta büyümeye bırakıldı.



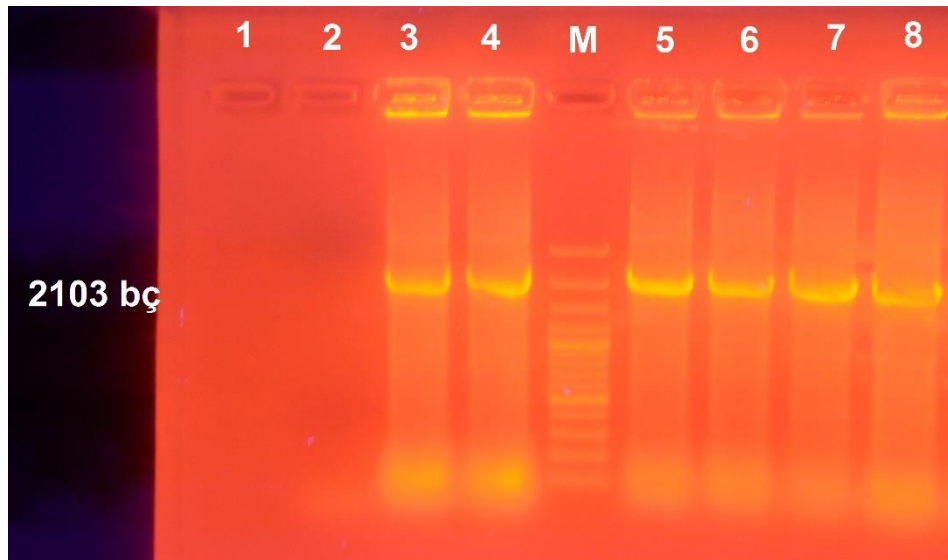
Şekil 4.3. Rekombinant vektörün transformasyonu sonrası besi yerinde büyüyen koloniler

4.4. Koloni PCR

Transformasyon sonucunda elde edilen kolonilerden rastgele 8 koloni alınarak numaralandırıldı. Bölüm 3.2.9’da verilen PCR parametreleri ile koloni PCR yapıldı ve koloni PCR sonucunda rekombinant vektör taşıyan koloniler agaroz jel elektroforezinde tespit edildi.



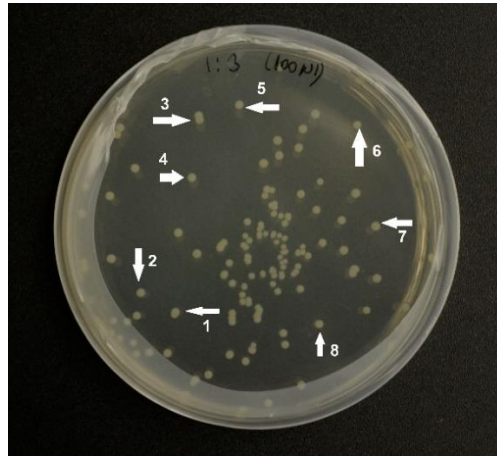
Şekil 4.4. Hedef gene ait primerle yapılan koloni PCR sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü. (M: Markır, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: PCR için numaralandırılan koloniler, 3., 6. ve 8. koloniler 1845 bp'lik bölgede bant verdiğiinden pozitif olarak değerlendirildi).



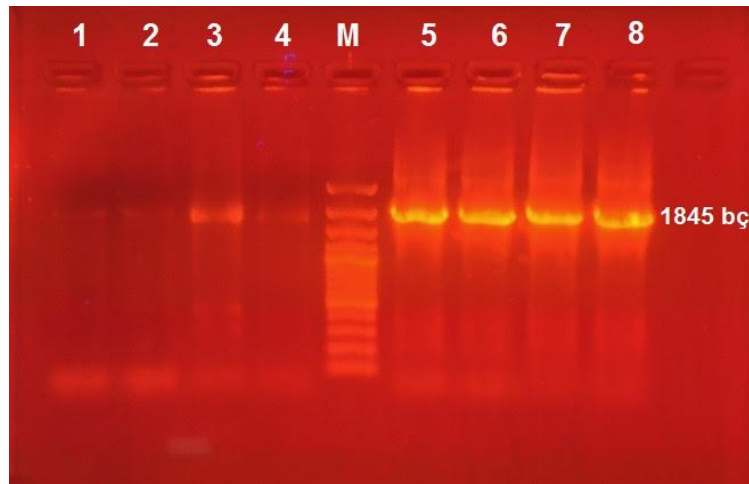
Şekil 4.5. Vektöre ait primerle yapılan koloni PCR sonucu elde edilen bantlara ait jel görüntüsü. (M: Markır, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: PCR için numaralandırılan koloniler, 3., 4., 5., 6. ve 8. koloniler 2103 bp'lik bölgede bant verdiğiinden pozitif olarak değerlendirildi).

4.5. Plazmit İzolasyonu ve Çapraz PCR

Koloni PCR’da pozitif sonuç veren koloniler bir gece antibiyotik içeren sıvı LB ortamında büyütüldükten sonra bölüm 3.2.10’da anlatılan protokole göre plazmit izolasyonunda kullanıldı. İzolasyon sonrası elde edilen plazmitlerden 4 farklı PCR yapılarak genin doğru bir şekilde insört olup olmadığı kontrol edildi. Sonuçta, koloni PCR verilerine paralel olarak her iki koloniden elde edilen plazmitlerin geni doğru şekilde aldığı çapraz PCR ile teyit edildi.



Şekil 4.6. Plazmit izolasyonun yapıldığı koloniler (3 ve 6)



Şekil 4.7. Plazmitten yapılan çapraz PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü

4.6. Rekombinant Plazmidin Protein Üretimi İçin Konağa Transformasyonu

Geni içeren plazmidler doğrulandıktan sonra, protein üretimi için bölüm 3.2.13’de anlatılan pET SUMO sisteminde önerilen protokol baz alınarak konak organizmaya ısı şok yöntemiyle aktarıldı. Transformasyonun başarılı olup olmadığını anlamak için antibiyotikli besi yerine ekilen hücrelerin koloni oluşturduğu gözlemlendi bu da transformasyonun başarılı olduğunu gösterdi.



Şekil 4.8. Plazmit transformasyonu sonrasında elde edilen koloniler

4.7. Toplanan Örneklerin Analizi

4.7.1. Aktivite Tayini

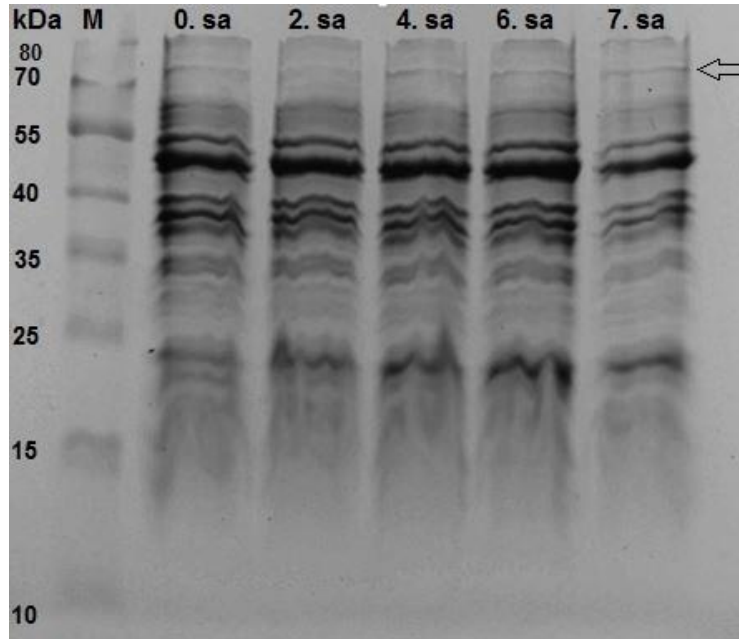
Proteinin homojenatından aktivite tayini yapıldı. AChE enziminin aktivitesinin ölçümü için bu enzime spesifik olan Ellman metodu kullanıldı. IPTG ile indüklenen ve IPTG ile indüklenmeyen erlenlerden alınan örnekler ile AChE’ye spesifik olan Ellman tayini sonucunda elde edilen ürünlerde aktivite tayini yapıldı.

Çizelge 4.3. Aktivite ölçümü sonuçları

Alınan Örneklerin Zamanı	IPTG +	IPTG -
0. saat	16 br	12 br
2. saat	27 br	16 br
4. saat	44 br	22 br
6. saat	72 br	26 br
7. saat	68 br	24 br

4.7.2. SDS-PAGE

Lizis sonrası elde edilen homojenat jele yüklendi ve markıra karşı yaklaşık iki saat yürütüldü. Boyama işleminin ardından elde edilen jelde yaklaşık 80 kDa boyutunda ürün varlığı tespit edildi.

**Şekil 4.9.** Lizis işleminden sonra elde edilen hücre homojenatının SDS-PAGE fotoğrafı (M: Markır, kDa: Kilodalton, 0. sa, 2. sa, 4. sa, 6.sa, 7.sa: Örneklerin alındığı zaman)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışma, *Rattus norvegicus* (sıçan) beyin dokusundan Alzheimer hastalığında önemli bir yeri olan asetilkolini hidrolizleyen enzim olan asetilkolinesterazı kodlayan AChE genin klonlanması ve bir konak organizmada eksprese ettirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Demans, bireylerde beyin hücrelerinin tahribatına ve çok hızlı biçimde bu hücrelerin kaybedilmesine neden olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Günümüzde 70 yaş üstünde görülen demansın yarısından fazlasını Alzheimer tipi demans oluşturur (Şenol 2010). Risk oranı yaşa bağlı olarak doğru orantılı bir şekilde artmakta ve geri dönüşümü olmayan ilerleyici bir hastalık olarak bilinmektedir. AH; yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyerek hafıza, konuşma, yön bulma, problem çözme gibi zihinsel işlevlerin zayıfladığı, günlük hayattaki gereksinim duyulan işleri yerine getirme yeteneklerinin azaldığı ve davranış bozuklukları ile seyreden bir beyin hastalığıdır (Orhan 2010).

Hastalığın kaynağı ve gelişim süreci tam aydınlatılamamış olup en çok kabul edilen görüş, kolinerjik kayıptır. Bu görüşe göre; AH'da kolinerjik kavşak ve sinapslardan salınan, iki sinir hücresi arasında iletişimi sağlayan bir nörotransmitter olan asetilkolin miktarının azalmasına bağlı olarak asetilkolinesteraz miktarının fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle AChE, kolinerjik tedavide merkezi bir konumda bulunmakta ve asetilkolin miktarını arttırmak için AChE enzim inhibitörü karakterli ilaçlar kullanılmalıdır. Ancak hala merkezi sinir sistemine hızlı biçimde nüfuz edecek, etkisini uzun süre koruyabilecek ve düşük yan etkiye sahip olacak AChE inhibitörü bulunabilmiş değildir (Rollinger *et al.* 2004). Günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisinde AChE inhibitörleri, belirli bir başarı oranının elde edildiği tek ilaç grubudur (Orhan 2010).

Alzheimer hastalığı gibi hafıza kaybı ile ilgili hastalıklarda asetilkolinin çok kısa sürede parçalandığı tespit edilmiştir. Asetilkolini parçalayan enzimin inhibe edilmesiyle sinirler arasındaki geçişin kuvvetlendiği tespit edilmiştir (Orhan 2010). AH'nın kesin bir tedavisi olmadığından dolayı ancak yaşam kalitesini mevcut durumdan bir nebze de olsun artırmak için semptomik ilaç tedavisi uygulanmaktadır. AChE inhibitörleri olan takrin, rivastigmin, galantamin ve donepezil gibi ilaçlar hastaların beyinlerinde hücre ölümüne paralel olarak eksilen asetilkolin miktarını artırması amacıyla kullanılmaktadır (Anonim 2011).

Sinir sisteminin sağlıklı çalışması için asetilkolinesteraz enzimi gerekli bir enzimdir. Sinirler arasında ve sinirlerden kaslara doğru iletimi sağlayan asetilkolin, sinaptik boşluğa salındıktan sonra ortamdaki temizlenmelidir aksi takdirde iletim devam eder. Bu temizleme işlemini asetilkolinesteraz tarafından gerçekleştirildiğinden sinirler arasındaki sinyallerin düzgün bir şekilde iletilmesi için bu enzim gereklidir. Asetilkolin, kolinerjik nöronların gövdesinde kolin ile asetilCoA'dan gelen asetilin kolinasetil transferaz (ChAT) tarafından birleştirilmesi yoluyla oluşmaktadır. Oluşan asetilkolin, aksonal transport yoluyla sinir uçlarına taşınır ve sinaptik aralığa salınır. Normal kolinerjik ileti, sinaptik aralıktaki asetilkolinin, kolinesteraz enzimleri tarafından hızlı katalitik hidrolizi yolu ile sonlandırılmasına bağlıdır (Swartz 2000). Bu hidroliz sonucu sinaptik aralıkta oluşan kolin tekrar presinaptik nörona alınır ve asetilkolin sentezinde kullanılır. Kolinesterazların ortamda bulunmaması, hem asetilkolin sentezi için gereken hücre içi kolinin azalmasına hem de sinaptik aralıktaki asetilkolin etkisinin uzamasına yol açmaktadır. Kolinesteraz inhibisyonu, alzheimer hastalığı ve miyasteni gibi hastalıklarda sinaptik aralıktaki asetilkolini arttırmak üzere tedavi amaçlı kullanılır. Ayrıca öldürücü asetilkolinerjik uyarım yaratmak üzere kimyasal gaz üretiminde de kullanılmaktadır (Silver 1974; Mesulam *et al.* 2002).

Beyindeki kolinerjik sistemin bozulması ile bellek arasındaki ilişkiye dayanılarak, asetilkolinesteraz inhibitörleri (antikolinesterazlar) tedavide en etkili ilaç grubu olarak kullanılmaktadır. Hafıza kaybı ile ilgili nörodejeneratif hastalıklarda (alzheimer

hastalığında gibi), kognitif eksikliğin tedavisinde onaylanan antikolinesterazlar, asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek etkisini göstermektedir (Hebert *et al.* 1995).

Çalışmamızda uygun yöntemlerle sakrifiye edilen sıçandan alınan beyin dokusu ile yapılan total RNA izolasyonunun akabinde asetilkolinesteraz enziminin üretiminden sorumlu olan AChE genine ait cDNA sekansı, gene ait primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı ve elde edilen ürünlerin doğruluğu agaroz jel elektroforezi ile kalitatif olarak teyit edildi. AChE geninin nükleotid sayısının 2066 bp, mRNA baz sayısının 1845 bp ve kodladığı aminoasit sayısının ise 614 aa olduğu genom veri tabanından elde edildi ve agaroz jel elektroforezi sonucunda AChE geninin 1845 bp'lik bölgede amplifiye olduğu doğrulandı. Çalışmanın daha sonraki basamaklarında amplifiye edilen AChE geni pET SUMO vektörüne ligasyonu yapılarak rekombinant vektör oluşturuldu. SUMO füzyonları, rekombinant proteinlerin ekspresyonunu ve çözünürlüğünü arttırabilir bir özellikte olduğundan bu vektör kullanıldı. Elde edilen rekombinant vektör kompetent *E.coli* hücrelerine transforme edilerek bu hücreler petri kabında büyütüldü. Kolay çalışılabilir olması, daha önce yapılan çalışmalarda verimli sonuçlar alınması ve rahat elde edilebilmesi nedeniyle bu çalışmada klonlama ve ekspresyon için *E.coli* kullanıldı. Büyüyen kolonilerden koloni PCR yapıldı ve ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Doğru büyüklükte bantların görüldüğü koloniler (3 ve 6 numaralı koloni) sıvı besi yerinde çoğaltıldı. Koloni PCR'da pozitif sonuç veren kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra çapraz PCR yapılarak genin doğru bir şekilde insört olup olmadığı kontrol edildi. Plazmitlerin doğruluğu tespit edildikten sonra rekombinant vektörler protein üretiminin gerçekleştirileceği konak organizmalara transfer edildi ve hücreler daha büyük besiyerlerinde büyütüldü ve bir besi yerine indükleyici olan 1mM IPTG eklenirken diğer besi yerine eklenmeyerek 7 saatlik bir inkübasyon sonucunda gen ekspresyon seviyesindeki etki saptandı. Hücreler parçalandıktan sonra elde edilen homojenattan Tris-HCl (pH:8) tamponu ile spektrofotometrik aktivite tayini yapıldı. Buna göre IPTG eklenen ve eklenmeyen besiyerlerinde 0. saat, 2. saat, 4. saat, 6. saat ve 7. saatte alınan örneklerin aktivitesi karşılaştırıldı. IPTG olmayan besi yerinden yapılan aktivite tayininde 0. saatte 12 birim, 2. saatte 16 birim, 4. saatte 22 birim, 6. saatte 26 birim, 7. saatte 24 birim aktivite, IPTG

olan besi yerinde ise 0. saatte 16 birim, 2. saatte 27 birim, 4. saatte 44 birim, 6. saatte 72 birim, 7. saatte ise 68 birim aktivite saptandı. Bu da AChE geninin başarılı bir şekilde klonlanarak eksprese ettirildiği anlamına gelmektedir. IPTG ile uyarılmasıyla eksprese edilen örneklerin yapılan SDS-PAGE'i sonucunda AChE'nin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 80 kDa olarak tespit edildi.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında AChE geninin klonlamasının ve ekspresyonun gerçekleştirilmiş olması, AChE enziminin karakterizasyonu ile ilgili ilave çalışmaların yürütülmesinin sağlaması bakımından son derece önemlidir. Günümüzde gelişen teknoloji, *in vitro* koşullarda rekombinant DNA teknolojisi üzerinden amino asit sekansının modifikasyonu ile yeni proteinlerin dizaynına ve yapımına imkan sağlamaktadır. Protein moleküllerinin 3 boyutlu konformasyonları ve boyutları protein mühendisliği aracılığı ile yeniden şekillendirilebilmektedir. Mutagenез olarak da adlandırılan bu teknikler, tesadüf olarak bir defada sayısı ve tam yeri belirsiz farklı bölgeleride kapsayan rastgele mutagenез teknikleri ve sadece belirli hedef aminoasitlerin delesyonu, insersiyonu ve değişimini ifade eden yönlendirilmiş mutagenез teknikleri rastgele ve bilinçli olmak üzere ikiye ayrılabilir. Yönlendirilmiş mutagenез ile istenilen bölgeye tam olarak mutasyon yerleştirilebilmektedir. Bu yöntem ile spesifik DNA dizilerin rolü tam olarak tanımlanabilmektedir. Yönlendirilmiş mutagenез, protein yapı-işlev ilişkilerinin incelenmesi ve protein mühendisliğinde kullanılan güçlü bir araçtır. Bu yöntem araştırmacılara proteinin yapısında spesifik değişimler yapabilmesine imkan verir. Dolayısıyla bu yöntemler aracılığıyla AChE enziminin aktif kısmında *in vitro* ortamda yapılabilecek mutasyonlar ile enzim aktivitesinin nasıl değişebileceği hakkında araştırmalar yapılabileceği düşünülmektedir. Bu sayede ilaç tasarımı için kemoterapötik hedef olarak gösterilen AChE enziminin moleküler yapısı ve fonksiyonu hakkında geniş bilgiler elde edilmiş olacaktır. Elde edilecek bu verilerin, kolinerjik kavşakta önemli bir yere sahip olan bu enzime karşı, seçici inhibitörlerin tasarımına olanak sağlayabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Alaşehirli, B., 2005. The Inhibitors of Cholinesterase (Anticholinesterases). Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Science, 1(18), 47-57.
- Alırız, S. ve Türkoğlu, V., 2000. İnci Kefalinden (*Chalcalburnus tarichi*) Asetilkolinesteraz Enziminin (EC 3.1.1.7) Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.
- Alvarez, A., Alarcón, R., Opazo, C., Campos, E O., Muñoz, F.J., Calderón, F. H., Inestrosa, N.C., 1998. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid- β peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. The Journal of Neuroscience, 18(9), 3213-3223.
- Anonim, 2011. www.alzheimerderneği.org.tr, (08.06.2015).
- Anonymous, 2013. <http://www.totalhealthinstitute.com/tips-on-preventing-alzheimers-disease-naturally>, (15.06.2015).
- Anonymous, 2009. <https://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholinesterase>, (19.05.2015).
- Aras, K. ve Erşen, G., 1988. Teorik ve Klinik Enzimoloji. No: 171, 174 s. Ankara.
- Beeri, R., Le Novere, N., Mervis, R., Huberman, T., Grauer, E., Changeux, J.P., Soreq, H., 1997. Enhanced hemicholinium binding and attenuated dendrite branching in cognitively impaired acetylcholinesterase-transgenic mice. Journal of Neurochemistry, 69, 2441-2451.
- Braak, H. and Braak, E., 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathologica, 82, 239-259.
- Campbell, V.A. and Gowran, A., 2007. Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids. British Journal of Pharmacology, 152 (5), 655-62.
- Clark, A., 2004. Health: life expectancy survey. England.
- Demir, H. and Türkoğlu, V., 2005. Effects of Neostigmine Methylsulfate on Enzyme Activity of Acetylcholinesterase in Rat Serum, Plazma, Muscle and Liver In Vivo. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science, 32(1), 24-30.
- Dickson, D.W., 1997. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. Neurobiology of Aging, 18, 21-26.
- Dong, H., Csernansky, C.A., Martin, M.V., Bertchume, A., Vallera, D., Csernansky, J.G., 2005. Acetylcholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits in the Tg2576 mouse model of Alzheimer disease. Psychopharma, 181(1), 145-52.
- Eggers, C., Herholz, K., Kalbe, E., Heiss, W.D., 2006. Cortical acetylcholine esterase activity and ApoE4-genotype in Alzheimer disease. Neuroscience Letters, 408(1), 46-50.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 7, 88-95.
- Ercan, S., 2002. Alzheimer hastalığında tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleri. Demans Dergisi. 2, 5-9.

- Estermann, S., Daepf, G.C., Cattapan-Ludewig, K., Berkhoff, M., Frueh, B.E., Goldblum, D. 2006. Effect of oral donepezil on intraocular pressure in normotensive Alzheimer patients. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 22(1), 62-67.
- Eubanks, L.M., 2006. A Molecular Link Between the Active Component of Marijuana and Alzheimer's Disease Pathology. *Molecular Pharmaceutics*, 3(6), 773-7.
- 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 and Psychiatry*, 66(2), 137-47.
- Gaeta, A. and Hider, R.C., 2005. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *British Journal of Pharmacology*, 146, 1041-1059.
- Gnagey, A. L., Forte, M., Rosenberry, T. L., 1987. Isolation, Characterization of Acetylcholinesterase from *Drosophila*. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 1290-1298.
- Govindappa, T., Govardhan, L., Jyoth, P., Veerabhadrapa, P., 1987. Purification and Characterization of Acetylcholinesterase Isozymes From the Latex of *Synadenium Grantii* hook. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 24, 209-217.
- Guhathakurta, S. and Bhattacharya, S., 1989. In Vitro Inhibition of Goat Brain Acetylcholinesterase by Pure and Commercial Anticholinesterase Pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 17, 16-20.
- Güloğlu, Ö. F., Türkoğlu, V., Çelik, İ., 2006. Purification and Characterization of Acetylcholinesterase from Sheep Liver and Inhibition by some Poinkillers. *Asian Journal of Chemistry*, 13(2), 1097-1103.
- Hebert, L.E., Scherr, P.A., Beckett, L.A., 1995. Age-specific incidence of alzheimer's disease in a community population, *Journal of the American Medical Association*, 273, 1354-9.
- Işık, A., 2010. Alzheimer Hastalığı. GATA, Ankara.
- Kawas, C.H., 1997. Epidemiology of Alzheimer's Disease. *American Academy of Neurology Press*, 23-38.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, No: 92, 118 s, Erzurum.
- Massoulié, J. and Bon, S., 1982. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annual Review of Neuroscience*, 5, 57-106.
- Mehndiratta, M.M., Kuntzer, T., Pandey, S., 2009. Anticholinesterase treatment for myasthenia gravis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1-7.
- Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*, 110, 627-639.
- Nachmansohn, D. and Lededer, E., 1939. Chemical And Molecular Basis Of Nerve Activity. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 217-97.
- Nachmansohn, D., 1952. In *Modern Trends in Physiology, Biochemistry*. Academic Press, New York, 229.
- Nordberg, A., 2006. Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 20. 12 p-18p.

- Orhan, İ., 2010. Alzheimer Hastalığı'nın Tedavisinde Geliştirilen Bileşikler. Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara.
- Ott, J., 1985. Analysis of human genetic linkage. Johns Hopkins University Press, 223, Baltimore, USA.
- Ovadia, L., Ayman, S.H., Murray, E.S., A., Amanda, J.D., Fiona, J.T., Jacqueline, B.M., 2003. Cloning and expression of two secretory acetylcholinesterases from the bovine lungworm, *Dictyocaulus viviparus*. Molecular and Biochemical Parasitology, 132, 83–92.
- Perez, L.R. and Franz, K.J., 2010. Minding metals: tailoring multifunctional chelating agents for neurodegenerative disease. Dalton Transactions, 39, 2177-2187.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., Perry, R., 1999. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness. Trends Neuroscience, 273(22), 80.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., Gauthier, S., 1993. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. The Lancet, 342, 697-699.
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. Chemical Review, 87, 955-79.
- Rahman, M.F., Mahboob, M., Grover, P., 2004. In vitro Acetylcholinesterase Inhibition by Novel OP Compounds in Various Tissues of The Fish *Channa punctatus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 72, 38-44.
- Rollinger, J.M., Hornick, A., Langer, T., Stuppner, H., Prast, H., 2004. Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. Journal of Medicinal Chemistry. 47, 6248-6254.
- Rossenberry, T.L. and Scoggin, D.M., 1984. Structure of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase. The Journal Of Biological Chemistry, 5643-5652.
- Selkoe, D.J., 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron, 6, 487-498.
- Shuang, W., Ming, L., Pei-An, T., Gary, W. F., Jin-Jun, W., 2010. Cloning and characterization of acetylcholinesterase 1 genes from insecticide-resistant field populations of *Liposcelis paeta* Pearman (Psocoptera: Liposcelididae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40, 415-424.
- Silver, A., 1974. The biology of cholinesterases. American Elsevier Publishing, New York.
- Sternfeld, M., Shoham, S., Klein, O., Flores-Flores, C., Evron, T., Idelson, G.H., Kitsberg, D., Patrick, J.W., Soreq, H., 2000. Excess “readthrough” acetylcholinesterase attenuates but the “synaptic” variant intensifies neurodeterioration correlates. PNAS, 97, 8647–8652.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. Science, 253, 872-879.
- Swartz, H.J., 2000. Neurotransmitters, principles of neural science., Ed: Kandel, E.R., Schwartz, J.H, Jessell, T.M., 4. Baskı, US. McGraw-Hill Companies, 280-297.
- Şenol, F.S., 2010. Türkiye’de Yetişen Bazı *Salvia* Türlerinin Asetilkolinesteraz İnhibitör Etkisi Üzerinde Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Programı, Ankara.

- Taylor, P., Schumacher, H., MacPhee-Quigley, K., Friedman, T., Taylor, S., 1987. The structure of acetylcholinesterase: relationship to its function and cellular disposition. *Trends in Neuroscience*, 10, 93-95.
- Tosun, E., 2014. Büt-2-endoik asit bis-(benzil-fenil-amit) türevi bileşiklerin sentezi, asetilkolinesteraz ve butilkolinesteraz enzimlerine karşı aktivitelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Whittaker, V., 1990. The Contribution of Drugs and Toxins to Understanding of Cholinergic Function. *Trends in Physiological Sciences*, 11, 8-13.
- Wilson, I. and Nachmansohn, D., 1954. In *Ion Transport Across Membranes*. Academic Press, 35.
- Xiaoxia, Z. and Yuxian, X., 2008. Cloning of an acetylcholinesterase gene in *Locusta migratoria manilensis* related to organophosphate insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 77-84.
- Xie, W., Stribley, J.A., Chatonnet, A., 2000. Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate ingene-targeted mice lacking AChE. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293, 896-902.
- Zatta, P., Drago, D., Bolognin, S., Sensi, S.L., 2009. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30, 346-355.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Kocasinan’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Anadolu’nun çeşitli yerlerinde tamamladıktan sonra 2008 yılında Ankara Anıttepe Lisesi’nden mezun oldu. 2009 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden 2013 yılında mezun oldu. 2013-2014 eğitim öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans öğrenimine halen devam etmektedir.