

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN SERUM BÜTİRİLKOLİNESTERAZININ OLASI LİPOLİTİK AKTİVİTESİ-
LİPİD METABOLİZMASI İLE İLİŞKİSİ**

Müslüm GÖK

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2021

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN SERUM BÜTİRİLKOLİNESTERAZININ OLASI LİPOLİTİK AKTİVİTESİ-
LİPİD METABOLİZMASI İLE İLİŞKİSİ**

Müslüm GÖK

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2021

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İNSAN SERUM BÜTİRİLKOLİNESTERAZİNİN OLASI LİPOLİTİK AKTİVİTESİ-
LİPİD METABOLİZMASI İLE İLİŞKİSİ

Müslüm GÖK

Danışman: Prof. Dr. Ebru BODUR

Bu tez çalışması 13.01.2021 tarihinde jürimiz tarafından “Biyokimya Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri** *Prof. Dr. Ediz Demirpençe*
Başkanı: *TOBB ETÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.*
- Üye:** *Prof. Dr. Yasemin Aksoy*
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.
- Üye:** *Prof. Dr. Özden Tacal*
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.
- Üye:** *Prof. Dr. Aylin Sepici Dinçel*
Gazi Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.
- Üye:** *Prof. Dr. İncilay Lay*
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ⁽¹⁾ 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

21/01/2021
Müslüm GÖK

^{1 1}“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurul** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Tez Danışmanının Prof. Dr. Ebru BODUR danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Müslüm GÖK

TEŞEKKÜR

”Düşünmek bilmekten daha ilginçtir; ama incelemekten daha ilginç değildir.”

Goethe

Lisansüstü eğitimim boyunca, hem akademik hayatta hem de sosyal yaşantımda desteğini sürekli yanımda hissettiğim, duraksadığım anlarda motive edici konuşmalarıyla beni araştırmaya teşvik eden ve doktora tezimin ortaya çıkmasında bilgisi, tecrübesi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ebru Bodur’a,

Hacettepe’de göreve başladığımdan Doktora eğitimimi tamamladığım bu günlere gelene kadar bilgi paylaşımları, destek ve anlayışlarıyla bana her zaman yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ediz Demirpençe, Prof. Dr. Yasemin Aksoy, Prof. Dr. Özden Tacal, Prof. Dr. İncilay Lay, Prof. Dr. Günnur Dikmen, Prof. Dr. Asuman Özkara, Prof. Dr. Nuray Ulusu, Prof. Dr. Emirhan Nemutlu’ya

Varlıklarıyla bana güç veren Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı’nda görev yapan tüm Hocalarım ve Asistan Arkadaşlarıma,

Lisansüstü Eğitimim sırasında desteklerini her zaman hissettiğim Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi’ndeki Hocalarımdan başlıca Prof. Dr. İsmail Çetin Öztürk ve Prof. Dr. Ümmühani Özel Türkcü’ye,

Tez savunma sınavımda yer alarak gerekli katkıları sağlayan Prof. Dr. Aylin Sepici Dinçel, Prof. Dr. Ayşe Bilgihan’a ve doktora eğitimim sırasında araştırma projelerinde çalıştığım Hebrew Üniversitesi’nden Prof. Dr. Hermona Soreq ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Eğitimim süresince hem akademik ve hem de arkadaşlıklarıyla her daim yanımda olan, iyiki tanıdığım dediğim kıymetli arkadaşlarım ve yoldaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem Çiçek, Dr. Mehmet Özcan, Dr. Ahmet Yalçınkaya, Dr. Seda Önder, Dr. Öğr. Üyesi Nurnehir Baltacı, Öğr. Gör. Dr. Canan Çakır Aktaş ve Dr. Ender Fakı’ya,

Yaşamım boyunca desteklerini her zaman yanımda hissettiğim abim, ablalarım, annem, babam ve her birini ayrı sevdiğim birbirinden değerli kardeşlerime,

Doktora eğitimim süresince 2211-Yurt İçi Lisans Üstü Burs ve 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs programları kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK’a ve tez çalışması kapsamında beni destekleyen Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP)’na,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

ÖZET

GÖK M., İnsan Serum Bütirilkolinesterazının Olası Lipolitik Aktivitesi-Lipid Metabolizması ile İlişkisi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2021. Kolinesterazlar (AChE ve BChE), başlıca kas-sinir kavşaklarındaki kolinerjik sinapslarda asetilkolin uyarılı nörotransmisyonu sonlandırır. BChE ekspresyonunun esansiyel yağ asitleri tarafından düzenlendiğini daha önce göstermiştik. Lipazların ve kolinesterazların (ChE) katalitik bölgesinin benzeşmesi, ChE'lerin da çeşitli lipit ve fosfolipitleri hidroliz edebilecekleri hipotezini öne sürmemize neden oldu. ChE'lerin serbest yağ asitleri, trigliseritler ve fosfatidilkolin-sfingomiyelin gibi zar fosfolipitlerinin olası hidrolizi kromatografik ve spektrofotometrik-florometrik yöntemlerle incelendi. Ticari BChE-AChE ve insan plazmasından saflaştırılan BChE'nin lipolitik aktiviteleri farklı kaynaklardan kontrol enzimleri (Pankreatik (PanL) ve buğday tohumu (BTL) lipaz, fosfolipaz (PLA₂), sfingomiyelinaz) ile birlikte değerlendirildi. BChE'nin PLA₂ ve sfingomiyelinaz aktiviteleri tarandı. BChE'nin kısmi PLA₂ aktivitesi gösterdiği, ancak sfingomiyelinaz aktivitesi göstermediği bulundu. Substrat olarak serbest yağ asidi hidrolizi, 4-mu palmitat ile gerçekleştirildi. Sonuçlar, saflaştırılan BChE'nin 4-mu palmitat'ı BTL kadar etkin hidroliz edebildiğini gösterdi. Michaelis-Menten kinetik sonuçları substrat olarak 4-mu palmitat kullanan enzimlerin afinitesini şu şekilde sıralar: BTL (10,4 µM) > Saf BChE (34,2 µM) > PanL (129,8 µM) > tic BChE (186 µM). Kolinesterazların trioleik asit (TO) hidrolizi GC-MS ve LC-MS/MS ile analiz edildi. TO hidrolizinin GC-MS sonuçları, saflaştırılan BChE'nin PanL'nin %7'si kadar oleik asiti ortama saldırdığını gösterdi. LC-MS/MS sonuçları PanL'nin diğer enzimlerden daha yüksek TO hidrolitik aktivitesi (18593 ppm/dk/mg protein enzim) olduğunu gösterdi (p<0,001). TO hidroliz yetisi olduğu bugüne kadar gösterilmemiş olan saflaştırılan BChE'nin aktivite değeri (714,3 ppm/dk/mg protein enzim), BTL'den (80,7 ppm/dk/mg protein enzim) daha yüksekti (p=0,024). Aynı çalışmalar ticari AChE ile gerçekleştirildi. Ancak AChE'nin adı geçen substratları hidroliz etmediği gözlemlendi. BChE aktivitesinin spesifik inhibitörü IsoOMPA varlığında ve BChE'nin lektin afinite kromatografisi sonrası elde edilen süpernatanda lipolitik aktivitesi çok düşüktü. Bu sonuç lipolitik aktivitenin BChE'ye ait olduğunu ve BChE'nin 4-mu palmitat ile trioleik asiti hidroliz ettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: kolinesterazlar, fosfolipitler, trigliseritler, lipit hidrolizi, kütle spektrometresi

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK BİDEB 2211-Yurt İçi Lisans Üstü Burs (2211-E, 2015/1) ve 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs (2214-A, 2018/1) Programları. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (HÜBAP): TDK-2018-17028.

ABSTRACT

GÖK M., Potential Lipolytic Activity Of Human Serum Butyrylcholinesterase-Its Function in Lipid Metabolism. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Department of Biochemistry, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2021.

Cholinesterases (AChE and BChE) terminate acetylcholine-induced neurotransmission at cholinergic synapses in muscle-nerve junctions. We previously showed BChE expression is regulated by essential fatty acids. The similarity of catalytic domain of lipases with cholinesterases (ChE) led us to hypothesize that ChEs can hydrolyze various lipids and phospholipids. The possible hydrolysis of free fatty acids, triglycerides and membrane phospholipids such as phosphatidylcholine-sphingomyelin by cholinesterases was investigated, using chromatographic and various spectrophotometric-fluorometric methods. Lipolytic activity of BChE purified from human plasma, commercial BChE-AChE were compared with control enzymes from various sources (pancreatic (PanL) and wheat germ (BTL) lipase, phospholipase (PLA₂), sphingomyelinase). PLA₂ and sphingomyelinase activity of BChE were measured. PLA₂ activity of BChE was partial, but there was no sphingomyelinase activity. Free fatty acid hydrolysis was studied with 4- μ palmitate as substrate. Results showed purified BChE can hydrolyze 4- μ palmitate as effectively as BTL. Michaelis-Menten kinetic results sort the affinity of the enzymes, that uses 4- μ palmitate as substrate, as follows: BTL (10.4 μ M) > Pure BChE (34.2 μ M) > PanL (129.8 μ M) > tic BChE (186 μ M). Trioleic acid (TO) hydrolysis of cholinesterases were analyzed by GC-MS and LC-MS/MS. According to GC-MS TO hydrolysis results, oleic acid released by BChE corresponded to 7% released by pancreatic lipase. LC-MS/MS results showed that TO hydrolytic activity of PanL (18593 ppm/min/mg protein enzyme) was higher than other enzymes ($p < 0.001$). TO hydrolytic activity of purified BChE (714.3 ppm/min/mg protein enzyme), whose TO hydrolysis ability hasn't been demonstrated to date, was higher than BTL (80.7 ppm/min/mg protein enzyme) ($p = 0.024$). All studies were performed also with commercial AChE. However, AChE didn't hydrolyze the substrates used here. The lipolytic activity of BChE in the presence of IsoOMPA, a specific inhibitor of BChE, and the supernatant obtained after BChE-treated lectin affinity chromatography was very low. This result shows the lipolytic activity belongs to BChE, and BChE hydrolyzes both trioleic acid and 4- μ palmitate.

Keywords: cholinesterase, phospholipids, triglyceride, lipid hydrolysis, mass spectrometry

Supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit: Project code: TDK-2018-17028; TÜBİTAK BİDEB: 2214-A, International Fellowship Programme (2018/1) and 2211-E, National Scholarship Programme (2015/1) for PhD Students.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolinesterazlar	3
2.2. Kolinesterazların Moleküler Formları	4
2.3. Kolinesterazların Genetik Yapısı	6
2.4. Kolinesterazların Molekül Yapısı	8
2.5. Kolinesterazların İşlevleri	10
2.5.1. Asetilkolin Hidrolizi	10
2.5.2. Asetilkolin Dışındaki Substratları	11
2.5.3. Yağ metabolizması	12
2.6. Kolinesterazların Fizyolojik Rolü	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Kullanılan Kimyasallar, Kitler ve Cihazlar	17
3.2. BChE Enziminin Plazmadan Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	19
3.2.1. BChE'nin İnsan Serumundan Saflaştırılması	19
3.2.2. Kolinesterazların Aktivite Tayini	20

3.2.3. BChE ve Kontrol Lipazların Jel Elektrofrezisi: Protein ve Aktivite Boyaması	22
3.2.4. BChE'nin Substrat (Bütiriltiyokolin) Kinetiği	23
3.3. BChE Enzimi ile Yağ Asitleri, Fosfolipitleri ve Trigliserit Hidrolizinin Spektroskopik Yöntemlerle Analizi	23
3.3.1. BChE'nin 4-Metilumbelliferil Palmitat Hidrolizi	23
3.3.2. BChE'nin Olası Fosfolipaz A2 (PLA ₂) Aktivitesinin Belirlenmesi	27
3.3.3. BChE'nin Sfingomiyelinaz Aktivitesinin Ölçülmesi	28
3.4. BChE Enzimi ile Yağ Asitleri, Fosfolipitleri ve Trigliserit Hidrolizinin Kromatografik Yöntemlerle Analizi	29
3.4.1. Trioleik Asit, Oleik Asit ve 4-mu Palmitat Hidrolizinin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Analizi	29
3.4.2. BChE ve PanL Lipit Hidrolizi Sonuçlarının Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile İncelenmesi	30
3.4.3. BChE ve PanL'nin TO ve 4-mu Palmitat Hidrolizinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (HPLC-FLD ve LC-MS/MS) ile Analizi	33
4. SONUÇLAR	38
4.1. BChE Enziminin Plazmadan Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	38
4.1.1. BChE'nin İnsan Serumundan Saflaştırılması	38
4.1.2. BChE ve Kontrol Lipazların Nativ Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi: Protein ve Aktivite Boyaması	39
4.1.3. BChE'nin Substrat (Bütiriltiyokolin) Kinetiği	40
4.2. BChE Enzimi ile Yağ Asitleri, Fosfolipitleri ve Trigliserit Hidrolizinin Spektroskopik Yöntemlerle Analiz Sonuçları	42
4.2.1. BChE'nin 4-mu Palmitat Hidrolizi	42
4.2.2. BChE'nin Olası Fosfolipaz A2 (PLA ₂) Aktivitesinin Belirlenmesi	54
4.2.3. BChE'nin Sfingomiyelinaz Aktivitesinin Ölçülmesi	56
4.3. BChE Enzimi ile Yağ Asitleri, Fosfolipitleri ve Trigliserit Hidrolizinin Kromatografik Yöntemlerle Analizi	57

4.3.1. TO, Oleik Asit ve 4-mu Palmitat Hidrolizinin TLC Analizi	57
4.3.2. BChE ve PanL Lipit Hidrolizi Sonuçlarının Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile İncelenmesi	60
4.3.3. BChE ve PanL'nin TO ve 4-mu Palmitat Hidrolizinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (HPLC-FLD ve LC-MS/MS) ile Analizi	61
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	77
7. KAYNAKLAR	79

SİMGELER ve KISALTMALAR

Å	Angstrom
Da	Dalton
ppb	Milyarda bir (<i>parts per billion</i>)
ppm	Milyonda bir (<i>parts per million</i>)
U	Ünite
4-mU	4-metilumbelliferon
4-mu palmitat	4-metilumbelliferil palmitat
A	Asimetrik
A4-12	Kolinesterazların asimetrik formları
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AChE-E	Asetilkolinesteraz Eritrositik varyantı
AChE-Next	Asetilkolinesteraz N-terminali genişletilmiş varyantı
AChE-R	Asetilkolinesteraz <i>Readthrough</i> varyantı
AChE-S	Asetilkolinesteraz Sinaptik varyantı
Acyl	ATP sitrat liyaz
AD	Alzheimer hastalığı (<i>Alzheimer's disease</i>)
ALA	α -linolenik asit
ATCh	Asetiltiyokolin
AVV	Adeno-ilışkili virüs
BChE	Bütirilkolinesteraz
BSA	Sığır Serum Albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BTCh	Bütiriltiyokolin
BTL	Buğday Tohumu kaynaklı Lipaz
BW284C51	1, 5-bis (4-allildimethylamonyum fenil)
BzCh	Benzoilkolin
ChE	Kolinesteraz (<i>Cholinesterase</i>)
CoA	Koenzim A

ColQ	Kollajen Q
ConA	Konkanavalin A
ConA-Safl BChE süpernatant	Saflaştırılan BChE-Konkanavalin A lektin afinitesi sonrası elde edilen süpernatant
ConA-Tic BChE süpernatant	Ticari BChE-Konkanavalin A lektin afinitesi sonrası elde edilen süpernatant
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DTNB	5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
E	Ekzon
G	Globüler
G1-G4	Kolinesterazların globüler formları
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein (<i>High density lipoprotein</i>)
HMG-KoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-Koenzim A
HPLC-FLD	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi-Floresans Dedektörü
I	İntron
İnh	İnhibitör
IsoOMPA	Tetramonoizopropilpirofosfortetramide
Kb	Kilobaz
LA	Linoleik asit
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi
MMS	Merkezi sinir sistemi
MOPS	3-(N-morfolino) propan sülfonik asit
mRNA	Mesajcı RNA (<i>Messenger RNA</i>)
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
OD	Optik Dansite
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PanL	Pankreatik Lipaz
PAS	Periferik anyonik bölge

PLA₂	Fosfolipaz A ₂
PRiMA	Prolince zengin membrana bağlama bölgesi (<i>Proline-rich membrane anchor</i>)
RNA	Ribonükleik asit
Rt	Alıkonma süresi (<i>Retention time</i>)
Safl BChE	Saflaştırılan BChE
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SMaz	Sfingomiyelinaz
TLC	İnce tabaka kromatografisi
Tic BChE	Ticari olarak satın alınan BChE
TO	Trioleik Asit (Triolein)
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (<i>Very low density lipoprotein</i>)

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
2.1.	ChE enzimlerinde gözlenen moleküler yapılar	5
2.2.	İnsan BCHE geni ve mRNA'sı	7
2.3.	İnsan ACHE geni ve onun alternatif mRNA varyantları	8
2.4.	Kolinesterazların aktif bölgesi	9
2.5.	Kolinergic sinyal iletimi	10
2.6.	İnsan AChE, insan BChE ve insan PanL üç boyutlu yapısı ve aktif bölgesi	12
2.7.	Kolinesteraz aktivitelerinin çeşitli hastalıklardaki parasempatik (ACh düzeyleri) / sempatik (ChE aktiviteleri) ekspresyon düzeyi değişimi farklılıkları	14
3.1.	Çalışma planı ve deneysel akış diyagramı	17
3.2.	Ellman reaksiyon mekanizması	21
3.3.	4-mu palmitat hidrolizinin reaksiyon mekanizması	24
4.1.	Prokainamid Sefaroz 4B afinite kromatografisinin birinci-ikinci tuz elüsyonu	38
4.2.	Lipazlar, BChE'ler ve ConA-Safıl BChE süpernatant için protein ve aktivite boyaması	40
4.3.	Safıl BChE enziminin 0,01-4mM BTCh substratı ile Michealis-Menten grafiği	41
4.4.	BChE enziminin 0,01-0,40 mM BTCh substratı ile Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri	41
4.5.	Lipazların ve Safıl BChE enziminin 15-10000 μ M 4-mu palmitat ile pH 7,4 ve pH 8'deki Michealis-Menten kinetik sonuçları	43
4.6.	Lipazların ve Safıl BChE enzime ait pH 7,4 ve pH 8'de 250 μ M 4-mu palmitat hidrolizi değerleri	45
4.7.	Kontrol Lipazlar (PanL ve BTL), Safıl BChE ve tic BChE enziminin 4-mu palmitat substratı ile Michealis-Menten kinetiği grafikleri	46
4.8.	Safıl BChE veya tic BChE'nin ConA ile muamelesi	48
4.9.	4-mu palmitat hidrolizi için kullanılan 4-mU standart grafiği	49
4.10.	85 μ M ve 125 μ M 4-mu palmitat hidroliz sonuçları	50
4.11.	85 μ M ve 125 μ M 4-mu palmitat hidroliz sonuçlarına ait saçılım grafiği.	51
4.12.	Zamana bağlı 85 μ M 4-mu palmitat hidroliz sonuçları	53

4.13.	PLA ₂ doğrusal standart grafiği	55
4.14.	Tic BChE'nin PLA ₂ aktivitesi	55
4.15.	Sfingomiyelinaz standart grafiği	56
4.16.	TO, oleik asit ve 4-mu palmitat standartlarının nonpolar yürütücüdeki TLC sonuçları	58
4.17.	BChE ve BTL enzimlerinin TO hidrolizinin TLC sonuçları	59
4.18.	BChE ve PanL'a ait TO hidrolizinin GC-MS analizi sonuçları	60
4.19.	4-mU standardının HPLC'deki alıkonma süresi	62
4.20.	HPLC analizinde kullanılan 10-100 ppb 4-mU standart grafiği	63
4.21.	TO'nın LC-MS/MS'deki parçalanma ürünü ve alıkonma süresi	64
4.22.	LC-MS/MS analizinde kullanılan 25-800ppb TO-NH ₄ ⁺ standart grafiği	64
4.23.	TO hidrolizinin LC-MS/MS analizi ile elde edilen kromatogram sonuçları	65
4.24.	LC-MS/MS ile elde edilen TO hidrolizi sonuçları	66

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. BChE ve AChE enzimlerinin yetişkin insan vücudundaki dağılımı	4
3.1. Deney sırasında kullanılan malzeme listesi	18
3.2. Lipit hidrolizi/lipolitik aktivite ve diğer analizler için kullanılan kitler	19
3.3. Kullanılan cihaz listesi	19
3.4. 96-kuyulu plaka ChE aktivite ortamı	22
3.5. Kontrol lipazlar, AChE, BChE ve ConA-BChE sonrası kalan süpernatantların 4-mu palmitat hidroliz ortamı	26
3.6. Zamana bağlı enzimatik 4-mu palmitat hidroliz ortamı	27
3.7. TO'nun lipazlar ve BChE ile hidroliz ortamı	30
3.8. GC-MS analizi için TO'nun BChE ve lipaz ile hidroliz ortamı	31
3.9. GC-MS analizi için 4-mu palmitatın BChE ve lipaz ile hidroliz ortamı	31
3.10. Supelco 37 Component FAME Mix standart yağ asit karışımı içeriği	32
3.11. LC-MS/MS analizi için gerçekleştirilen 4-mu palmitatın BChE ve lipaz ile hidroliz ortamı	34
3.12. LC-MS/MS analizi için gerçekleştirilen TO'nun BChE ve lipaz ile hidroliz ortamı	35
4.1. Bütirikolinesteraz enziminin plazmadan saflaştırma basamakları	39
4.2. BChE'nin 0,01-0,40 mM BTCh ile substrat kinetiği parametreleri	42
4.3. Kontrol lipazlar ve BChE'nin pH 7,4 ve pH 8'de 4-mu palmitat hidrolizine ait kinetik parametreleri	44
4.4. 4-mu palmitat hidrolizi yapan kontrol lipazlar, Saf BChE ve tic BChE'e ait kinetik parametreler	47
4.5. Kontrol Lipazlar ve BChE'lerin 85 μ M 4-mu palmitat hidroliz hızları	54

1. GİRİŞ

Kolinesterazlar (ChE), başlıca kas-sinir kavşaklarında olmak üzere kolinerjik sinapslarda asetilkolin uyarılı nörotransmisyonu sonlandırır (1). Kolinesterazlar asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE), yapısal özellikleri, fizyolojik ve hidrolitik özellikleri bakımından farklılık gösterir. BChE başlıca karaciğerde sentezlenir ve çeşitli ksenobiyotiklerin hidrolizinde rol alır (2). Lipazlar, trigliseritler ve çeşitli lipitlerin hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (3). Lipazlar ve kolinesterazlar aynı enzim alt kategorisine (karboksilik ester hidrolazlar, E.C.3.1.1) aittir. Hem lipazlar hem de kolinesterazlar, karboksil esterlerin hidrolizini katalizlerler. Bu nedenle, katalitik merkezleri çok farklı değildir: pankreatik lipaz (PanL) aktif merkezinde katalitik üçlü olarak Serin152, Histidin263 ve Aspartik Asit176 yer alırken, BChE'nin katalitik merkezinde Serin198, Histidin438 ve Glutamat325 yer almaktadır (4-6).

BChE'nin lipit metabolizmasında henüz belirlenememiş bir rolü olduğu düşünülmektedir. BChE aktivitesinin diyabetik farelerde kontrollere göre %150 daha fazla olduğu bulunmuştur (7). Farelere hiperlipoproteineminin azaltılmasında etkili olan 3-hidroksi-3-metil-glutaril-Koenzim A (HMG-KoA) redüktaz inhibitörü olan simvastatin verilmesi, BChE aktivitelerinin azalmasına yol açmıştır (8). Yakın tarihteki bir araştırmada, bütirikolinesteraz geni silinen farelerin, yağ içeriği yüksek diyetle beslenmesi sonucu obez oldukları bulunmuştur (9). Diğer bir çalışmada ise, adipoz dokudaki BChE eksikliğinin hepatik lipit birikimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, BChE geni silinen farelere adeno-ilişkili virüs (AAV)-BChE gen transferinin obeziteyi geri döndürdüğü, ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir (10).

Sedanter genç erkeklerde konjuge linoleik asit ve egzersiz uygulamasının kandaki serbest yağ asitleri ve BChE seviyelerinin değiştirdiğini önceki çalışmalarımızda gösterdik (11). Yaptığımız başka bir çalışmada, esansiyel yağ asitlerini (linoleik asit (LA) ve α -linolenik asit (ALA)) insan karaciğer kökenli HepG2 hücrelerine uygulayarak, lipit metabolizmasıyla BChE'nin ilişkisini inceledik. Sonuçlar, BChE ekspresyonunun serbest yağ asitleri tarafından düzenlendiğini gösterdi (12). Açlık durumunda mideden kana

salgılanan ghrelin peptidi, aktif formunda 3. amino asit serin üzerindeki -OH (hidroksil) grubu 8 karbonlu oktanoik asit ile açillenmiş halde olup oktanoil-ghrelin olarak ifade edilir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, BChE'nin oktanoil-ghrelin'deki açil bağı hidroliz ederek inaktif formu olan "desaçil-ghrelin"e dönüştürdüğü gösterilmiştir (13).

Tüm bu sonuçlar lipit metabolizması ile BChE'nin ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, lipazların katalitik bölgesinin kolinesterazlar ile benzeşmesi, kolinesterazların çeşitli lipitler ve fosfolipitleri hidroliz edebileceği teorisini öne sürmemize neden oldu. Daha önce elde edilen sonuçlardan yola çıkarak bu tezde, ChE'nin olası lipolitik aktivitesi incelendi. İncelemeye alınan lipit substratlar arasında trigliserit türevleri, çeşitli yağ asitleri (4-metilumbelliferil palmitat) ve fosfatidilkolin ve sfingomiyelin gibi zar fosfolipitleri yer aldı. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma literatürdeki ilk çalışma olması açısından, büyük bir önem sahiptir. Bu araştırma, ChE'nin lipit metabolizması ile olan ilişkisine ve lipit hidroliz rolüne ışık tutacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolinesterazlar

Kolinesterazlar (ChE), başlıca kas-sinir kavşaklarında olmak üzere kolinerjik sinapslarda asetilkolin uyarılı nörotranmisyonu sonlandırır (14). Substrat ve inhibitör seçicilikleri bakımından ChE'ler iki alt tipe sınıflandırılır: Asetil- ve butiril- kolinesteraz.

Asetilkolinesteraz (EC 3.1.1.7) (AChE), başta asetilkolin (ACh) olmak üzere kısa fonksiyonel gruba sahip molekül esterlerini hidroliz eder. İnsan kırmızı kan hücreleri, kas ve beyin hücrelerindeki başlıca ChE'dir. Memelilerin beyinde AChE mRNA'sı, BChE mRNA'sından 20 kat fazla bulunur (6).

Bütirilkolinesteraz (EC 3.1.1.8) (BChE), AChE'ye kıyasla bütirilkolin (BCh) gibi daha uzun alifatik esterleri ve benzoilkolin (BzCh) gibi aromatik açil fonksiyonel gruplu esterleri hidroliz eder. BChE, dolaşımdaki birincil ChE'dir (6). İnsan kanında AChE'den üç kat daha fazla olup karaciğer, akciğer, kas, beyin ve kalp dokusunda bulunur. İnsan vücudu toplam 58 mg BChE ve 4,34 mg AChE içerir. Dolayısıyla, yetişkin bir insanda BChE enzimi AChE'den 10 kat daha fazladır. Her dokuda hem BChE hem de AChE vardır (Tablo 2.1) (15). Enzim aktivitesi doku kütlesi ile çarpıldığında, BChE enziminin en fazla bulunduğu yerler plazma ve karaciğerdir, ardından deri ve bacak kası gelir. AChE enziminin ise en zengin olduğu yerler bacak kası, deri ve beyindir (16).

Tablo 2.1. BChE ve AChE enzimlerinin yetişkin insan vücudundaki dağılımı. Tablo referans (15)'den modifiye edilmiştir.

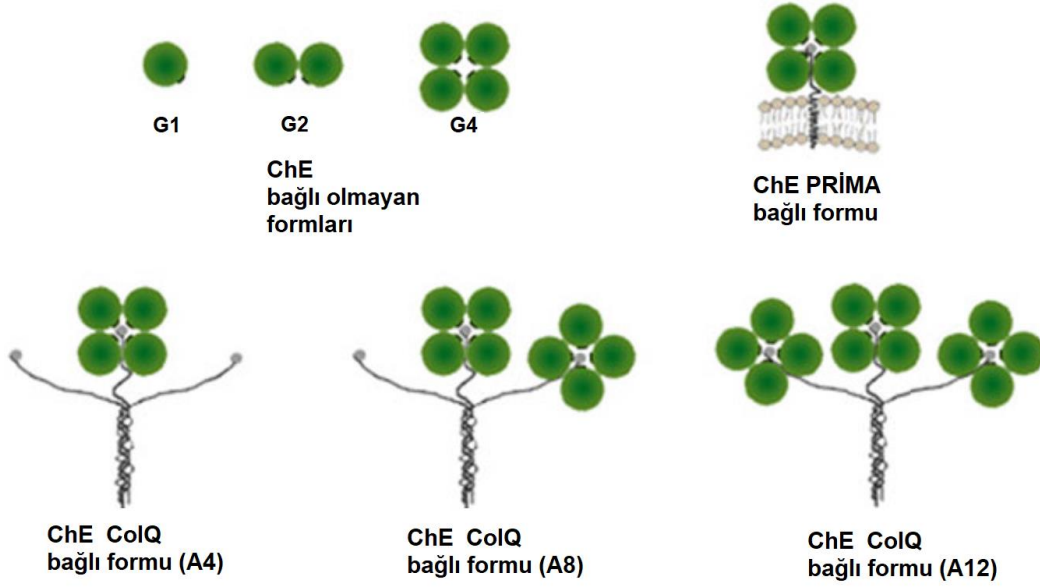
Doku	Doku Ağırlığı (g)	BChE (mg)	AChE (mg)
Plazma	3500	16	0,003
Karaciğer	1400–1500	13	0,10
Deri	4000–5000	7	0,77
Ayak Kası	3500	6	2,3
Bağırsak	800–900	4	0,14
Akciğer	400	3	0,06
Serebral Korteks	1200	3	0,46
Mide	300	1,8	0,05
Dalak	150–200	1	0,05
Böbrek	130–160	1	0,02
Serebellum	150	0,8	0,25
Kalp	300	0,6	0,06
Omurilik Soğani	20–25	0,085	0,08
Tiroit	20	0,0085	0,002
Toplam		58	4,34

Asetilkolinesterazın biyolojik rolünün kolinerjik sinapslarda sinaptik iletimin sona ermesi olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, yapısal homoloğu BChE ile beraber, sinir sistemi içinde ve dışında geniş çapta dağılmıştır ve çoğu durumda, her iki enzimin rolü belirsiz kaldığı öne sürülmüştür (17).

2.2. Kolinesterazların Moleküler Formları

Kolinesterazlar, farklı doku dağılımları ile dokularda ve vücut sıvılarında çeşitli amfifilik ve çözünür homo- ve hetero-oligomerik molekül formları halinde bulunur. Alt birimlerin molekül ağırlığı BChE enziminde 85.000 Dalton (Da) iken, AChE enziminde

70.000 Da'dır (15). ChE'nin moleküler formları genel olarak asimetrik (A) ve küresel (G) olarak sınıflandırılabilir (6) (Şekil 2.1). A formları omurgalılarda öncelikle nöromusküler kavşaklarda görülür (18-20). A molekül formları, kollajen kuyruğa tutturulmuş bir (A4), iki (A8) veya üç (A12) tetramerden oluşan birimler içerir. Bu kollajen kuyruk sinaptik aralıktaki bazal laminaya tutturulmuştur (21). G biçimleri sırasıyla monomerler (G1), dimerler (G2) veya tetramerlerdir (G4) (17). Zara bağlı veya suda çözünür halde olabilirler (22). ChE enzimleri tüm bu moleküler formlarda (A ve G) bulunabilirler. Tüm bu moleküler formlara ek olarak son yıllarda yapılan çalışmalar ile ChE'nin, PRiMA (prolin bakımından zengin membran bağlantısı) bağlı G4 formları olduğu da gösterilmiştir (23-26).

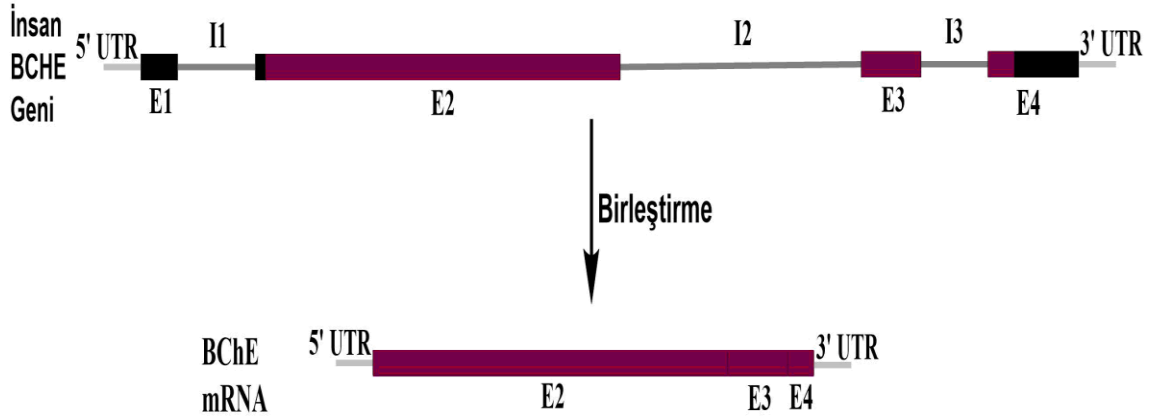


Şekil 2.1. ChE enzimlerinde gözlenen moleküler yapılar. Temel olarak beş alt gruba ayrılırlar: üstte, monomerik (G1), dimerik (G2) ve tetramerik (G4) formları ve ChE PRiMA formu. Altta, ColQ kuyruklu ChE formları (A4, A8 ve A12). Şekil referans (6)'dan modifiye edilmiştir.

1. Amfifilik monomer ve dimer (G1, G2): Her iki ChE türünde (AChE ve BChE), memelilerin beyni, kasları ve bağırsaklarında bol miktarda bulunur.
2. Çözünür tetramerik form (G4): Dört özdeş monomerden oluşur. Monomerlerin C terminalinde hidrofobik amino asitlerin hidrofobik etkileşimleriyle stabilize edilir. Memeli vücut sıvılarında BChE, beyinde ise AChE bol miktarda bulunur.
3. Hidrofobik kuyruklu tetramerler: Memeli merkezi sinir sisteminde (MSS) bol miktarda bulunur. PRiMA (prolin bakımından zengin membran bağlantısı) adlı hidrofobik, 20 kilodalton (kDa) uzunlukta bir polipeptit alt birimi ile plazma membranlarına sabitlenmiştir.
4. Kollajen benzeri (ColQ) kuyruklu formlar veya asimetric multimer: Her biri bir (A4), iki (A8) veya üç (A12) ChE tetrameri ile ilişkili, bazal laminaya bağlanan üç kollajen alt birim Q'nun üçlü sarmal yapısı ile karakterize edilir. Nöromusküler bağlantı noktalarında AChE BChE'den daha fazla bulunur (6).

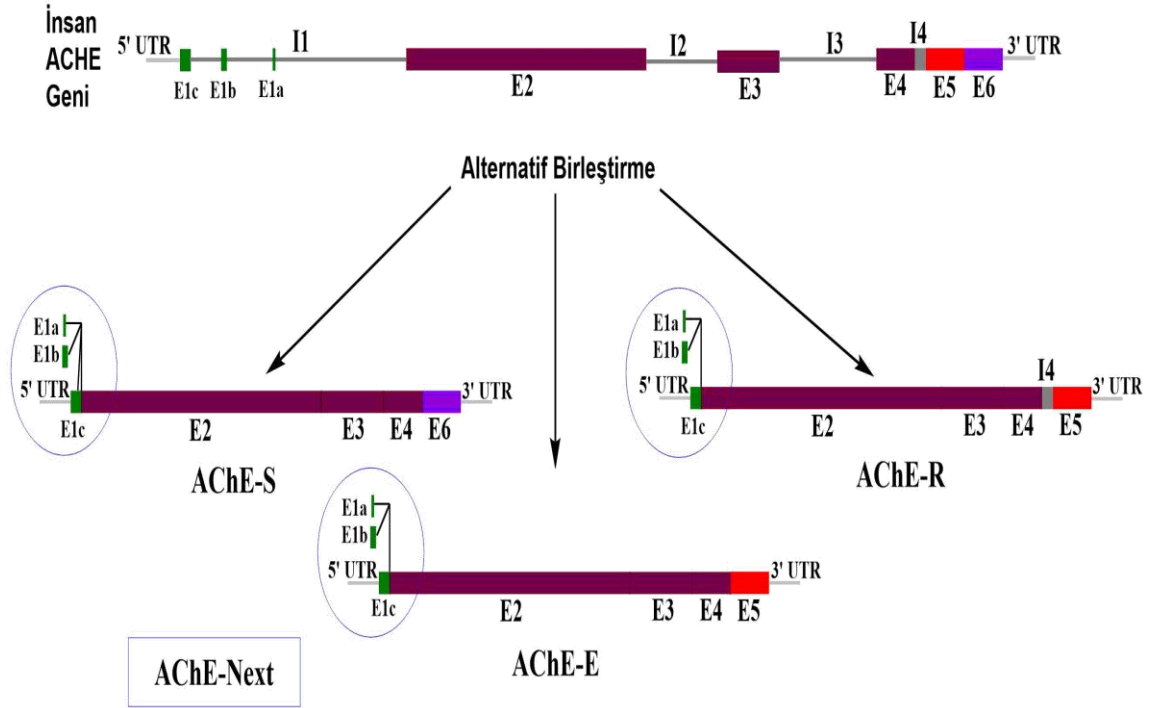
2.3. Kolinesterazların Genetik Yapısı

İnsan BCHE geni (3q26.1-q26.2) 64.57 kilobaz (kb) uzunluğundadır ve 4 ekzon (E) ile 3 intron (I) bölgesi içerir. İnsan BChE'i geninden tek bir polipeptit üretilir, genden alternatif kırılma ile üretilen başka bir ürün yoktur (Şekil 2.2) (6). BChE'nin plazmadaki çözünür globüler tetramerik formunun yanı sıra, kas ve beyindeki zara bağlı formları da aynı BCHE mRNA'sı tarafından kodlanır (22). İnsan BChE'si her bir katalitik alt birimi 574 amino asit kalıntısına sahiptir. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) sitesinde yer alan 602 amino asit dizisi, 28 kalıntı fazla ile sinyal peptidi de içeren olgun salgılanan proteini göstermektedir (15).



Şekil 2.2. İnsan BCHE geni ve mRNA'sı. BCHE ekzonları bordo (kodlanan) ve siyah dikdörtgenlerle belirtilmiştir. İntronlar gri yatay çizgilerle işaretlenmiştir. Birleştirilmiş BChE mRNA formu okla gösterilmiştir. Şekil referans (6)'dan modifiye edilmiştir.

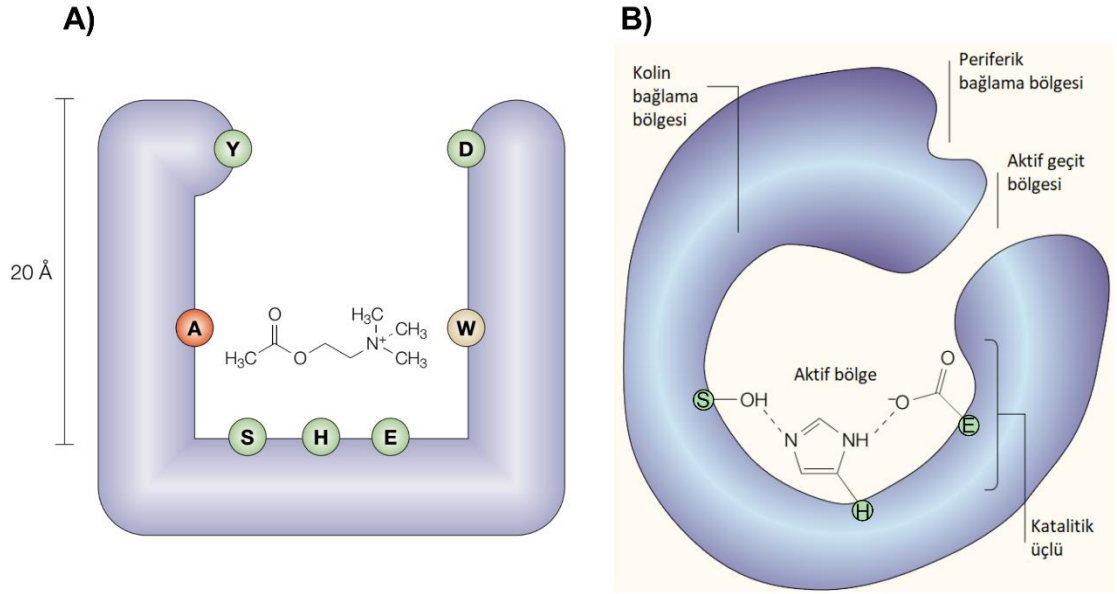
İnsan AChE geni (7q22) 7 kb uzunluğundadır. Bu gen E2, E3 ve E4 ekzonları tarafından kodlanan 543 amino asidi kapsayan, bir çekirdek alanı paylaşan tüm AChE varyantlarında bulunur. E1, kodlamayan bir ekzondur (Şekil 2.3). AChE varyantları, sinaptik (AChE-S), eritrositik veya kuyruklu (tailed) (AChE-E) ve çözünür haldeki *readthrough* (AChE-R) şeklinde sınıflandırılır. Tüm bu formların ayrıca N-ucundan genişletilmiş (AChE-Next) ekzon varyantları vardır (6). Transkripsiyon sonrası olaylar, N'-ve C'-ucunu değiştirir. Bu durum sonucu genişletilmiş bir N-ucu eklenir (Next), C-terminal bölgesi dönüşür ve AChE varyantlarının birleşmesinde farklılıklara neden olur (27).



Şekil 2.3. İnsan AChE geni ve onun alternatif mRNA varyantları. Ekzonlar dikdörtgenler ve intronlar yatay çizgiler olarak gösterilir. Birleştirilmiş AChE alternatif mRNA formları okla gösterilmiştir. E1a, E1b ve E1c, insan AChE ekzon 1'in alternatif çeşitleridir. Şekil referans (6)'dan modifiye edilmiştir.

2.4. Kolinesterazların Molekül Yapısı

İnsan BChE'si aktif bölgesi Ser198(S), His438(H), Glu325(E) katalitik üçlüsü içerir (28). Bu bölge yüzeyden yaklaşık 20 Angstrom (\AA) uzaklıkta bir oyuğun tabanına yakın kısmında bulunur. AChE'nin aktif bölgesi de aynı katalitik bölgeyi içerir (29, 30). Ancak, BChE'nin katalitik üçlüsü, AChE'nin substrat bağlama bölgesinde yer alan 14 aromatik amino asit yerine sadece altı aromatik amino asit kalıntısı içerir (14, 31). Bu durum BChE'ye daha büyük substrat bağlama bölgesi sağlamaktadır (Şekil 2.4).



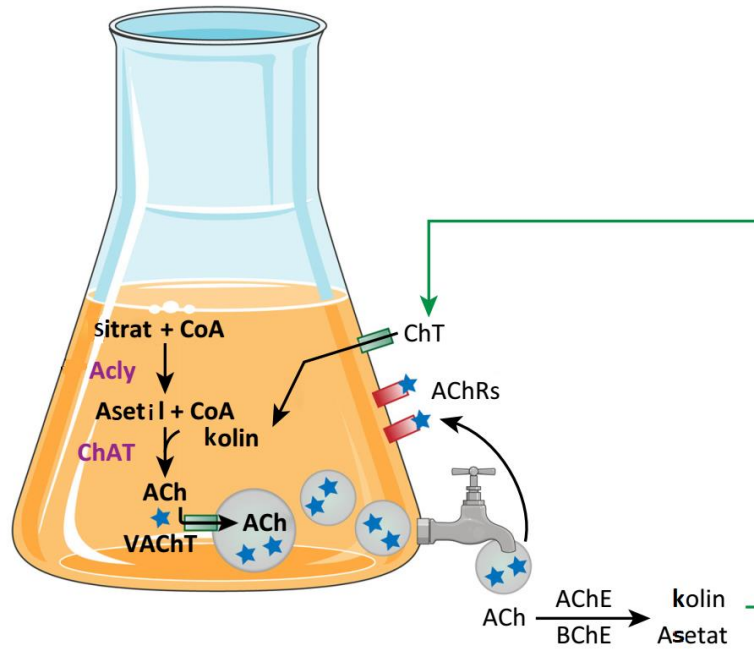
Şekil 2.4. Kolinesterazların aktif bölgesi. A) BChE'nin aktif merkezi girintiden 20 Å derinlikte yer alır. Katalitik üçlü, serin (S), histidin (H) ve glutamik asit (E) amino asitlerinden oluşur. Substratın açıl grubu, burada asetilkolin gösterilmektedir, açıl cebine (A) yerleşirken, pozitif yüklü kuaterner azot, triptofan (W) tarafından oluşturulan anyonik bölge ile etkileşime girer. Substratlar, aktif bölge geçidinin ağzında bulunan aspartik asit (D) ve tirozin (Y) ile etkileşerek aktif bölge geçidinden aşağı doğru yönlendirilir. B) AChE enziminin aktif bölgesinin özellikleri. Şekil referans (14, 31)'den modifiye edilmiştir.

Aktif merkez girintisi, katalitik üçlü bölgesine ek olarak anyonik ve açıl bağlama bölgelerini içerir. Anyonik bölge (Trp82, Tyr128, Phe329) kolin bağlama bölgesi olarak da adlandırılır ve substratın pozitif yüklü kolin kısmının bağlanmasından sorumludur (32). Oksianyon deliği (Gly116, Gly117, Ala199) ve açıl bağlama cebi (Trp231, Leu286, Val288) substratın hidroliz sırasında stabilizasyonunu sağlar. Aktif merkez girintisi hemen dışında yer alan Periferik anyonik bölge (PAS) (Asp70, Tyr332), substratın ilk bağlanmasında ve aktivasyonunda yer alır (33).

2.5. Kolinesterazların İşlevleri

2.5.1. Asetilkolin Hidrolizi

Asetilkolin (ACh) ilk keşfedilen nörotransmitterdir (34, 35). "Klasik" ACh sinyal iletiminde, ACh üretimi, paketlenmesi ve hidrolizi arasındaki dinamik denge vardır. Bu denge ACh reseptörlerinin aktivatör ve blokerleri ile etkileşim içindedir. Bu etkileşim sonucunda AChE ve BChE ACh hidrolizini gerçekleştirir (Şekil 2.5) (14, 27, 31).



Şekil 2.5. Kolinerjik sinyal iletimi, beyindeki asetilkolin (ACh) sentezini, paketlenmesini ve yıkımını yönetir, özel reseptörlerle etkileşimlerini düzenler. Şekil referans (27)'den modifiye edilmiştir.

ATP sitrat liyaz (**Acy**) sitrat ve CoA'dan asetil-koenzim A (CoA) sentezini gerçekleştirir. Devamında kolin asetiltransferaz (**ChAT**) Asetil-CoA ve kolinden ACh sentezler. Veziküler ACh taşıyıcısı (**VAcHT**) tarafından ACh veziküler olarak paketlenir (36). Sinaptik aralığa salınan ACh, pre ve postsinaptik membranda bulunan nöronal nikotinik veya muskarinik reseptörlere (**AChRs**) bağlanır (37-39). **AChRs**'ye bağlanan ACh

AChE ve BChE tarafından hidroliz edilerek kolin ve asetatı açığa çıkarır. Açığa çıkan kolin, kolin taşıyıcıları (ChT'ler) yardımıyla ACh üretim hattına geri dönüştürülür (5, 40, 41).

Kolinesterazlar başlıca nörotransmitter olan asetilkolinin hidrolizini kataliz ederek, kolinerjik sinyalin sonlandırılmasında rol almaktadır (1). BChE, kriz durumlarında AChE'nin de asetilkolinin hidrolizindeki fizyolojik işlevini yerine getirir (15). Bu sonuç, AChE nakavt farelerinin sağlıklı olduğu gözlemine dayanmaktadır (42). Diğer yandan, gen mutasyonu nedeniyle BChE aktivitesi göstermeyen insanlar doğurgan, sağlıklı ve uzun süre yaşayabilmiştir (43).

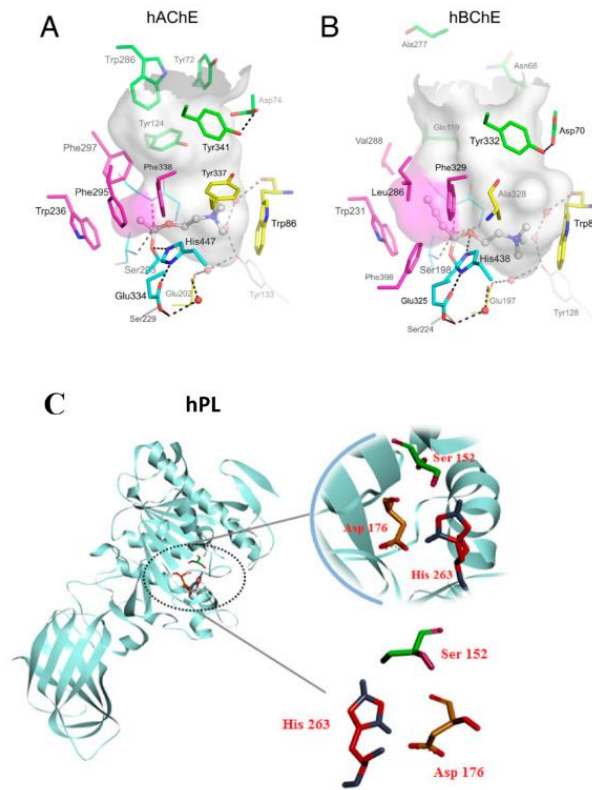
2.5.2. Asetilkolin Dışındaki Substratları

BChE'nin aktif merkezinde yer alan farklı amino asitlerden dolayı, AChE'ye göre daha büyük substrat bağlama bölgesi içermektedir. Dolayısıyla bu durum BChE'nin, dört karbonlu bütirilkolin veya aromatik halka içeren benzoilkolin gibi daha büyük substratları hidroliz etmesine olanak tanır (32).

AChE bazı nötral esterlerin hidrolizini katalizleyebilmektedir. Bu substratlar, indofenil asetat (44), indoksil asetat (45), 1-naftil asetat (46) ve o-nitrofenil asetat'tır (47). BChE ise o-nitrofenil asetat ve o-nitrofenil bütirat (48, 49), p-nitrofenil bütirat (50), alkil asetatlar (51), fenil asetat (52) ile aspirin ve aspirin-ilişkili nötr esterler (53) gibi daha fazla nötral esterleri de hidroliz edebilmektedir. BChE ayrıca, aromatik aminlerin açıl amitlerinin hidrolizini katalizleyen aril açilamidaz aktivitesine sahiptir (54). Bu, BChE'nin esteraz aktivitesinden farklı olarak, başka bir enzimatik aktiviteye sahip olduğu anlamına gelmektedir. Bu nedenle BChE, kolinerjik metabolizma dışındaki işlevlerde de rol oynayabilir. BChE, kokain (55), eroin (56, 57) ve çeşitli ksenobiyotiklerin hidrolizinde rol almaktadır (2). Tüm bunlara ek olarak BChE, anestezi madde olarak kullanılan süksinilkolinin hidrolizini de gerçekleştirmektedir (58).

2.5.3. Yağ metabolizması

Lipazlar, trigliseritler ve çeşitli lipitlerin hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (3). Lipazlar ve kolinesterazlar aynı enzim alt kategorisine (karboksilik ester hidrolazlar, E.C.3.1.1) ait olup karboksil esterlerinin hidrolizini katalizlerler. Bu sebeple aktif merkez yapıları çok benzer ve aynı kataliz mekanizmasına sahiptirler (Şekil 2.6) (5, 41). İnsan PanL aktif merkezinde katalitik üçlü olarak (Serin152, Histidin263 ve Aspartik asit176) yer alırken (4), BChE'nin katalitik merkezinde (Serin198, Histidin438 ve Glutamat325) yer almaktadır. Asetilkolinesterazın da aktif merkezi BChE ile benzerdir (29, 30). İnsan PANL aktif merkezinde yer alan kataliz bölgesinde, BChE enzimindeki katalitik üçlüsünden tek fark glutamat yerine aspartat amino asidi yer almasıdır (4, 31).



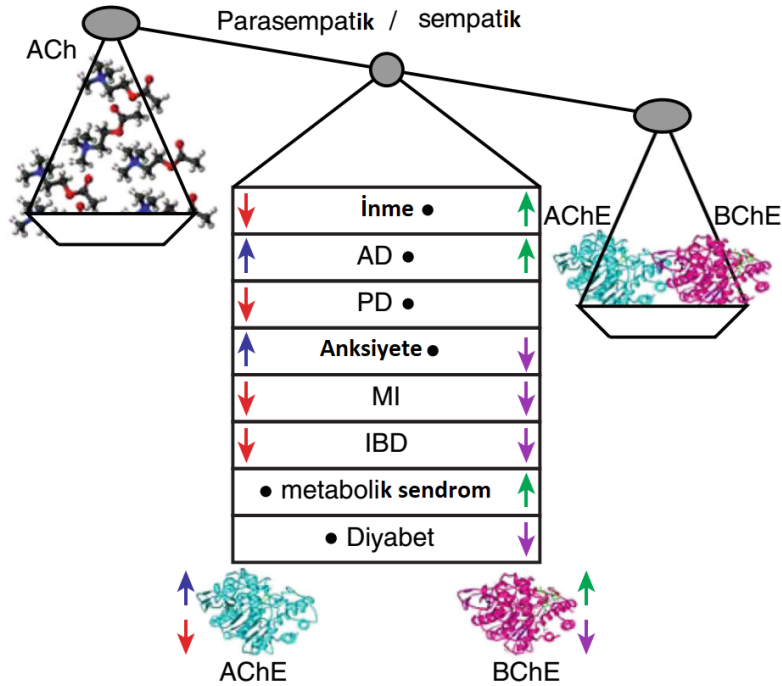
Şekil 2.6. İnsan AChE (hAChE) (A), insan BChE (hBChE) (B) ve insan PanL (hPL) (C) üç boyutlu yapısı ve aktif bölgesi. Şekil referans (5, 41)'den modifiye edilmiştir.

BChE'nin lipit metabolizmasında henüz belirlenmemiş bir rolü olduğu düşünülmektedir. BChE aktivitesinin diyabetik farelerde kontrollere göre %150 daha fazla olduğu bulunmuştur (7). Yapılan başka bir çalışmada, hiperlipoproteinemi olan insanlarda BChE aktivitesi artmış, serum HDL seviyeleri ise azalmıştır (59). Farelere hiperlipoproteineminin azaltılmasında etkili olan HMG-KoA redüktaz inhibitörü olan simvastatin verilmesi, BChE aktivitelerinin azalmasına yol açmıştır (8). Yapılan çalışmalarda, BChE'nin varyantlarının obezite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Plazmada %20 yüksek BChE aktivite gösteren kişilerin, düşük BMI ve az kilolu olduğu (60, 61); %40 düşük (K varyant) BChE aktivite gösteren kişilerin ise yüksek obezite, tip 2 diyabet ve tansiyon insidansı gösterdiği bulunmuştur (62-64). Yakın tarihteki bir araştırmada, BChE geni silinen farelerin, yağ içeriği yüksek diyetle beslenmesi sonucu obez oldukları bulunmuştur (9). Diğer bir çalışmada ise, adipoz dokudaki BChE eksikliğinin hepatik lipit birikimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, BChE geni silinen farelere adeno-ilişkili virüs AAV-BChE gen transferinin obeziteyi geri döndürdüğü, ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir (10). Açlık durumunda mideden kana salgılanan ghrelin peptidi, aktif formunda 3. amino asit serin üzerindeki -OH (hidroksil) grubu 8 karbonlu oktanoik asit ile açillenmiş halde olup oktanoil-ghrelin olarak ifade edilir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, BChE'nin oktanoil-ghrelin'deki açıl bağına hidroliz ederek inaktif formu olan "desaçil-ghrelin"e dönüştürdüğü gösterilmiştir (13). Bu sonuçlar lipit metabolizması ile BChE'nin ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Erkeklerde konjuge linoleik asit ve egzersiz uygulamasının kandaki serbest yağ asitleri ve BChE seviyelerinin değiştirdiğini önceki çalışmalarımızda gösterdik (11). Yaptığımız başka bir çalışmada, esansiyel yağ asitlerini (linoleik asit (LA) ve α -linolenik asit (ALA)) insan karaciğer kökenli HepG2 hücrelerine uygulayarak, lipit metabolizmasıyla BChE'nin ilişkisini inceledik. Sonuçlar, BChE ekspresyonunun serbest yağ asitleri tarafından düzenlendiğini gösterdi (12).

2.6. Kolinesterazların Fizyolojik Rolü

Serum kolinesteraz aktivitelerinin bazı hastalık fenotiplerinde kontrol değerlerinden farklı olduğu bulunmuştur (65-72). Kolinesteraz aktivitelerinin çeşitli hastalıklardaki ekspresyon düzeyi değişimi şekil 2.7’de özetlenmiştir (73).



Şekil 2.7. Kolinesteraz aktivitelerinin çeşitli hastalıklardaki parasempatik (ACh düzeyleri) / sempatik (ChE aktiviteleri) ekspresyon düzeyi değişimi farklılıkları. Şekil referans (73)’den modifiye edilmiştir.

Yüksek BChE aktivitesi, obezite (64, 74-76), hipertansiyon (77), hipertiroidizm (78) ve tip I ve II diabetes mellitus (DM1 ve DM2) (79, 80) ile ilişkilendirilmektedir. Diğer yandan miyokardiyal enfarktüs, BChE aktivitesinin düşüklüğü ile ilişkilendirilmiştir (81).

BChE’nin kokaini hidroliz edebildiği gösterilmiştir (55). Farelerde BChE viral gen transferi ve takibinde BChE aktivitesinin artışı ile kokain hidrolizi hızlanmaktadır. Fakat, ilginç bir şekilde farelerde saldırganlığın azaldığı gözlenmiştir (82). Daha sonra yapılan çalışmalarda BChE seviyesindeki 100 katlık artışın ghrelin sirkülasyonunu azalttığı

görülmüştür (13). BChE'deki artışın ghrelin hidrolizi artışına, bu da saldırganlığın azalmasına yol açtığı düşünülmektedir. Bu bulgunun tersine, BChE nakavt hayvanlarda BChE ifadesinin azalması, aktif ghrelin seviyelerinin yükselmesine ve saldırganlığın artmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgular BChE'nin farelerde ghrelin hidrolizini katalizleyerek farelerdeki sosyal stress ve saldırganlık davranışını da etkileyebildiği gösterilmiştir (83).

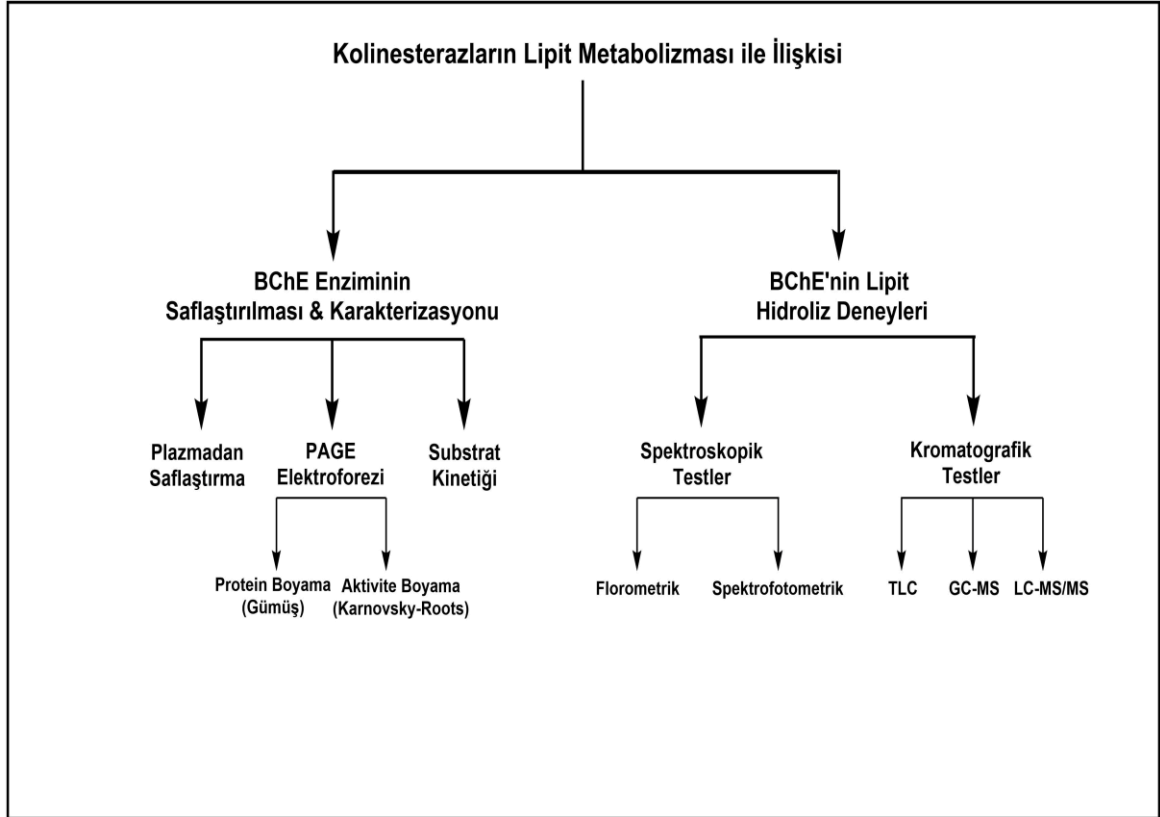
Serum BChE aktivitesi serum trigliserit, total kolesterol, açlık insülini ve insülin direnci seviyeleri ile güçlü pozitif korelasyon gösterirken, yüksek yoğunluklu lipoprotein-kolesterol ile negatif korelasyon gösterir (11, 75-77, 84). Dahası, yakın tarihli genom analizi çalışmasında, BChE aktivitesi ile obezite ve obezite-ilişkili insülin direnci, yağlı karaciğer arasında oldukça önemli korelasyonlar bulunmuştur (85). Bu çalışmanın sonucunda BChE ekspresyonunun değişimlerinin, metabolik anormalliklerin nedeninden ziyade bir sonucu olabileceği düşünülmüştür.

Dişi sıçanlarda vücuttaki yağ miktarının yanı sıra plazma BChE aktivitesi de erkeklerden daha yüksek olduğu bulunmuştur (86). BChE eksikliği oluşturulan erkek farelerde yüksek-yağlı diyetin, karaciğerde lipit birikimine ve adipoz doku büyümesine yol açtığı son yıllarda yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (10). Bu çalışmada dişi fareler kullanılmamıştır ancak gelecek çalışmalarda, cinsiyet hormonlarının yağ metabolizması ve depolaması üzerine etkisinin de incelenmesi gerektiği söylenmiştir.

Tüm bu veriler lipit metabolizması ile BChE'nin ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, lipazların katalitik bölgesinin kolinesterazlar ile benzeşmesi, kolinesterazların çeşitli lipitler ve fosfolipitleri hidroliz edebileceği teorisini öne sürmemize neden oldu. Daha önce elde edilen sonuçlardan yola çıkarak bu tezde, ChE'nin olası lipolitik aktivitesi incelendi. İncelemeye alınan lipit substratlar arasında trigliserit türevleri, çeşitli yağ asitleri (4-mu palmitat) ve fosfatidilkolin ve sfingomiyelin gibi zar fosfolipitleri yer aldı. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma literatürdeki ilk çalışma olması açısından, büyük bir önem sahiptir. Bu araştırma, ChE'nin lipit metabolizması ile olan ilişkisine ve lipit hidroliz rolüne ışık tutacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, kolinesterazların (AChE ve BChE) serbest yağ asitleri, trigliseritler ve membran fosfolipit türevlerini olası hidroliz yetisinin varlığı, kromatografik yöntemler ve çeşitli spektrofotometrik-florometrik yöntemlerle incelendi. Bu amaçla, lipit hidrolizi deneylerinde kullanılmak üzere insan BChE enzimi plazmadan saflaştırıldı. Saflaştırma sonunda elde edilen BChE (Safl BChE) ve ticari olarak satın alınan BChE (tic BChE) ve AChE enzimlerinin, elektroforez yöntemi sonrası çeşitli boyama metotları ile saf olup olmadıkları incelendi. Saflaştırma sonrası elde edilen BChE enzimine, lektin afinite kromatografisi de uygulanarak olası diğer lipaz veya esteraz aktivitesine sahip enzimlerin ortamdaki uzaklaştırılması sağlandı. Zar fosfolipitleri, trigliseritler ve çeşitli yağ asitleri gibi substratlar kullanılarak insan BChE ve AChE enziminin lipolitik aktivitesine bakıldı. Karşılaştırma amacı ile farklı kaynaklardan lipazların (PanL, fosfolipaz, sfingomiyelinaz gibi) aktiviteleri de kontrol enzimi olarak kullanılarak, ChE lipolitik aktivitesi ile birlikte değerlendirildi. Elde edilen hidroliz ürünleri, ince tabaka kromatografisi (TLC), Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS), Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS), ve spektroskopik ölçümler gibi çeşitli analiz yöntemleri ile incelendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışma planı ve deneysel akış diyagramı

3.1. Kullanılan Kimyasallar, Kitler ve Cihazlar

Deney sırasında kullanılan tüm kimyasalların listesi Tablo 3.1'de özetlendi. Tabloda belirtilmeyen ama deneyde kullanılan diğer malzemeler, Merck (Almanya) ve Sigma-Aldrich (MO, ABD)'den alındı. Lipit hidrolizi/lipolitik aktivite analizleri için kullanılan kitler Tablo 3.2.'de belirtildi. Kullanılan cihazların listesi ise Tablo 3.3.'te özetlendi.

Tablo 3.1. Deney sırasında kullanılan malzeme listesi

Malzemeler	Üretici Firma/Katalog numarası
4-metilumbelliferon sodium tuzu, ≥%98	Sigma/M1508
4-metilumbelliferil palmitat	Santa Cruz/sc-214256
Palmitik Asit, HPLC Saflıkta	Calbiochem/5064
Pankreatik Lipaz (Pancreatin From Porcine Pancreas)	Sigma-Aldrich/P1750
Buğday Tohumu (Wheat Germ) Lipaz	Sigma-Aldrich/L3001
İnsan Serum Bütirikolinesterazi (Ticari BChE)	Sigma-Aldrich/C5386
Konkanavalin A-Agaroz	Sigma-Aldrich/C7555
İnsan Asetirilkolinesterazi (Ticari AChE)	Sigma-Aldrich/C1682
Oleik Asit	Wako Chemicals/754666
5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Sigma-Aldrich/D8130
S-Butiriltiyokolin iyodür	Sigma-Aldrich/B3253
MOPS	Sigma-Aldrich/M1254
Cıva (II) Klorür	Sigma-Aldrich/215465
Asetonitril, HPLC Saflıkta	Sigma-Aldrich/34851
Metanol, HPLC Saflıkta	Sigma-Aldrich/34885
İzopropanol, HPLC Saflıkta	Sigma-Aldrich/34863
Hekzan, HPLC Saflıkta	Sigma-Aldrich/34859
Hidroklorik asit, %37	Sigma-Aldrich/30721
Dietileter, ≥%99	Sigma-Aldrich/
Asetik Asit, ≥%99	Sigma-Aldrich/A6283
Amonyum Format, ≥%97	Sigma-Aldrich/156264
Kloroform, HPLC Saflıkta	Sigma-Aldrich/34854
Amonyum Tiyosülfat	Sigma-Aldrich/336726
Sodyum Sitrat dihidrat	Sigma-Aldrich/W302600
Monosodyum Fosfat	Sigma-Aldrich/S9638
Disodyum Fosfat	Sigma-Aldrich/S9763
Glisin	Sigma-Aldrich/410225
Sodyum Hidroksit	Sigma-Aldrich/S5881

Tablo 3.2. Lipit hidrolizi/lipolitik aktivite ve diğer analizler için kullanılan kitler

Kitler	Üretici Firma/Katalog numarası
Sfingomiyelinaz Tayin Kiti (Florometrik)	Sigma-Aldrich /MAK155
Fosfolipaz A2 Aktivite Tayin Kiti (Florometrik)	BioVision/K400-100
Esterleştirilmemiş Yağ Asiti Tayin (NEFA) Kiti	WakoChemicals/999-34691
BCA Protein Tayin Kiti	Thermo Fisher/23227

Tablo 3.3. Kullanılan cihaz listesi

Cihazlar	Üretici Firma
Spectramax M2 mikropilaka okuyucusu	Molecular Devices
Analitik terazi	Mettler Toledo
pH metre	Consort
Elektroforez tankı ve güç kaynağı	Biorad mini protean 3
Santrifüj	Eppendorf 5417R
Vorteks	Nüve-NM110
Distile Su	Mp Minipure Basic
Pipetler ve pipet uçları	Gilson&Eppendorf
Sonikatör	
UHPLC Ultimate 3000	Thermo
LC-MS/MS TSQ Quantum Access Max triple quadrupole mass spectrometer	Thermo
Hypersil Gold (50X2,1 mmX1,9 µ) C18 ters faz kolonu	Thermo
TraceGold TG-5 MS (30 mX0,25 mm, 0,25 µm)	Thermo

3.2. BChE Enziminin Plazmadan Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

3.2.1. BChE'nin İnsan Serumundan Saflaştırılması

Lipit hidroliz deneylerinde kullanmak amacıyla BChE enzimi insan serumunu kullanılarak sırasıyla, asitli diyaliz, anyon değiştirici (DEAE Trisakril M) ve afinite kromatografisi (Prokainamid Sefaroz 4B) basamaklarıyla saflaştırıldı (87). Prokainamid Sefaroz 4B kromatografisinde son aşamada 25 mM potasyum fosfat tamponu içinde

hazırlanmış 100 ml hacimde 0,2-0,8 M NaCl gradiyenti bağlandı. Kolon akış hızı 20 mL/saat, hacmi 14ml olan prokainamid-sefaroze 4B kolonuna yüklendi ve 3 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Tuz gradiyentinin amacı ortamdaki iyonik kuvveti değiştirerek BChE'nin prokainamidden ayrılmasını sağlamaktır. Bu işlemde enzim aktivitesine sahip tüpler birleştirilip, diyaliz yapıldıktan sonra yeniden Prokainamid Sefaroz 4B kromatografisine yüklendi. Son aşamada 60 ml 0,2-0,9 M NaCl gradiyenti bağlanarak saf BChE enzimi kolondan elüe edildi.

Ayrıca ticari BChE (tic BChE) (sigma C5386) enzimi satın alındı. Enzimatik aktivite çalışmalarında ileri bir saflık kontrolü olarak konkanavalin A (ConA) lektin afinite kromatografisi uygulandı. Bu kromatografi ile ortamda diğer lipaz veya esteraz aktivitesine sahip enzimler var ise onların uzaklaştırılması amaçlanmaktaydı.

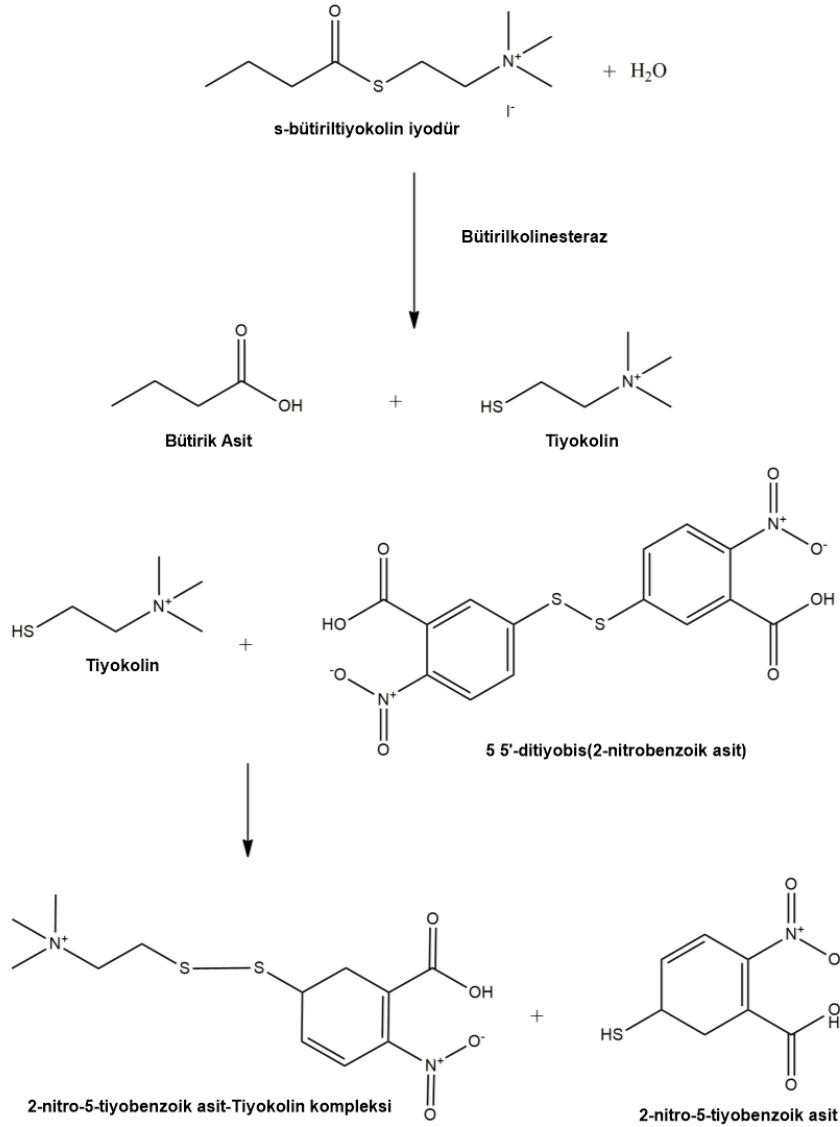
3.2.2. Kolinesterazların Aktivite Tayini

Kolinesterazlar, nörotransmitter asetilkolinin hidrolizini katalizleyerek onu kolin ve asetik aside hidroliz eder. Kolinesterazların hidrolitik aktivitesi, Ellman tekniği modifiye edilerek ölçüldü (88, 89). Ellman yöntemi, substrat olan tiyokolin esterlerinin kolinesterazlar tarafından hidrolizi (Şekil 3.2) ile açığa çıkan tiyokolinin, DTNB'yi indirgenmesi sonucu oluşan sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asit miktarının 412 nm'de spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır (88).

BChE aktivite tayini için, öncelikle BChE spesifik AChE inhibitörü olan finalde 10µM BW284C51 ile 5dk inkübe edildi. Ortama son olarak substrat (bütiriltiyokolin (BTCh)) eklenerek reaksiyon, spektrofotometrik olarak 412nm'de 5 dakika kinetik olarak izlendi. Enzim aktiviteleri, 412 nm'de 2-nitro-5-tiyobenzoat için ekstinsiyon katsayısı 13,6 mM⁻¹cm⁻¹ kullanılarak hesaplandı. Aktivite ortamında 0,25 mM DTNB, 2,6 µg BChE, pH 7,4 50 mM MOPS tampon, 1 mM BTCh içerdi.

AChE aktivitesi aynı şartlarda gerçekleştirildi. AChE içeren örnek ile spesifik BChE inhibitörü olan finalde 10µM IsoOMPA ile 10dk inkübe edildi. Asetiltiyokolin (ATCh) substratı en son eklenerek başlatılan reaksiyon, spektrofotometrik olarak 412nm'de 5

dakika kinetik olarak izlendi. Enzim aktivitesi, 412 nm'de 2-nitro-5-tiyobenzoat için ekstinsiyon katsayısı $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplandı. Ortamdaki final konsantrasyonlar, $4 \mu\text{g}$ AChE, pH 7,4 50 mM MOPS tampon, 1 mM ATCh, 0,25 mM DTNB içerdi.



Şekil 3.2. Ellman reaksiyon mekanizması

Kolinesteraz katalitik aktivite ölçümleri, spektrofotometrik Ellman yöntemini 96 kuyulu plakaya uyarlanarak yapıldı. 96 kuyulu mikrolakaya ChE aktivite tayini için aktivite ortamı (Tablo 3.4) karışım çözeltiler olarak hazırlandı.

Tablo 3.4. 96-kuyulu plaka ChE aktivite ortamı

Plaka Karışımı İçin	Kimyasal	Hacim (μL)	Final	1 kuyu için (μL)
Enzim Karışımı	100 mM MOPS	100	50 mM	124
	2,5 mM DTNB	20	0,25 mM	
	Enzim-(BChE/AChE)	4	2,6-4 μg	
İnhibitör	200 μM İnh	10	10 μM	10
Substrat Karışımı	Distile Su	56	-	66
	20 mM BTCh (ATCh)	10	1 mM	
Total		200		200

İnhibitör ve enzim çözeltileri 96 kuyulu plaka içerisine pipetlendi. 10 dk plaka karıştırıcı üzerinde karıştırılarak inkübe edildi. Ortama en son substrat eklendikten sonra Spectramax M2 mikrolakaya okuyucu ile 412 nm dalga boyunda 5 dk boyunca kinetik okuma yapıldı. Tüm çalışmalar en az üç kez tekrarlandı.

3.2.3. BChE ve Kontrol Lipazların Jel Elektrofrezisi: Protein ve Aktivite Boyaması

İnsan serumundan Safl BChE ve tic BChE'nin saflığını kontrol etmek amacıyla, örnekler poliakrilamid jel elektrofrezisi (PAGE) nativ olarak uygulandı (90). Deneyde

kullanılan jel ve çözeltiler Laemmli ve arkadaşları tarafından önerilen şekilde hazırlandı (91). Ancak ortama indirgeyici madde β -merkaptoetanol ve deterjan (SDS) konulmadı. BChE enziminin ağırlığına uygun olan %5-%7,5 yükleme-ayırım jeli hazırlandı. Jele deneyde kullanılan kontrol lipazlar (PanL ve BTL), Safı BChE ve tic BChE ve ortamda BChE aktivitesi içermeyen: ConA-Safı BChE süpernatant yüklendi. Protein boyaması ve aktivite boyaması için kullanılan jeller ve yüklenen protein miktarları farklı idi. Protein boyaması yapılacak jel için kuyu başına 1 μ g, aktivite boyaması için ise her kuyuda 3 μ g protein yüklenerek, jeller 2 saat boyunca 100 V'da yürütüldü. Elektroforezin ardından BChE protein boyaması gümüş boyama (92), aktivite boyaması ise Karnovsky-Roots tekniği (93)'ne göre yapıldı.

3.2.4. BChE'nin Substrat (Bütiriltiyokolin) Kinetiği

Safı BChE'nin substrat hidroliz kinetiği, finalde 0,010-4 mM aralığında (12 farklı derişim) bütiriltiyokolin (BTCh) kullanılarak yapıldı. Aynı BTCh substrat konsantrasyonlarında pH 7,4 ve pH 8'de kontrol lipazları ile BTCh substrat kinetiği çalışması yapıldı. Yapılan kinetik çalışmalarda aktivite ortamı finalde 0,010-4 mM BTCh, 0,25 mM DTNB, 50 mM MOPS pH 7,4 ve özgül aktivitesi 7,35 ünite/mg protein olan Safı BChE enzimden 2,6 μ g içerdi. Aynı ortamda PanL 1,08 μ g, BTL ise 13,6 μ g içermekteydi. Tüm çalışmalar en az üç kez tekrarlandı.

3.3. BChE Enzimi ile Yağ Asitleri, Fosfolipitleri ve Trigliserit Hidrolizinin Spektroskopik Yöntemlerle Analizi

3.3.1. BChE'nin 4-Metilumbelliferil Palmitat Hidrolizi

BChE ve Kontrol Lipazların 4-Metilumbelliferil Palmitat Hidrolizi Ön Deneyleri

4-metilumbelliferil palmitat (4-mu palmitat) hidrolizine en uygun pH ve substrat konsantrasyonunu belirlemek için kontrol lipazları (BTL ve PanL) ve Safı BChE ile modifiye asit lipaz aktivite ölçümü (94) gerçekleştirildi. Geniş substrat aralığında, finalde 15-10000

belirlendi. Açığa çıkan 4-mU miktarı, 0,063-2,0 nmol 4-mU standart grafiği yardımıyla hesaplandı.

Konkanavalin A ile Muamele Sonrası BChE Enziminin 4-mu Palmitat Hidrolizi

Lektinler karbohidratları yüksek özgüllükle bağlayan proteinlerdir (95). BChE'nin konkanavalin A (ConA) lektinine tam olarak bağlandığı bilinmektedir (96). Çalışmada lipit hidrolizini tetikleyebilecek Safıl BChE ve tic BChE enzimlerindeki safsızlıkları gidermek için enzimler lektin ile muamele edilmiştir. Bunun amaçla, 200 µL ConA ile 200 µL tic BChE veya Safıl BChE karıştırılıp gece boyu +4°C'de karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 5000 x g devirde 10 dk boyunca santrifüj yapıldı. ConA-BChE sonrası kalan süpernatant ayrılarak burada BChE aktivitesi ölçüldü. BChE lektin tarafından tutulduğu için, süpernatantlarda herhangi bir BChE aktivitesi gözlenmedi.

Kontrol lipazlar (PanL ve BTL), asetilkolinesteraz (AChE), Safıl BChE ve tic BChE, lektin sonrası elde edilen ConA-BChE sonrası kalan süpernatant (BChE aktivitesi içermeyen) ve IsoOMPA (spesifik BChE inhibitörü) içeren ortamların, finalde 85 µM ve 125 µM 4-mu palmitat hidrolizleri modifiye lipaz deneyi yapıldı (Tablo 3.5). 37°C'de 3 saat inkübasyon sonrası, aktivite ortamlarına HgCl₂ eklenerek durduruldu.

Tablo 3.5. Kontrol lipazlar, AChE, BChE ve ConA-BChE sonrası kalan süpernatantların 4-mu palmitat hidroliz ortamı

Aktivite Ortamı	Hacim (μL)	Final Konsantrasyon
Tris-HCl pH 8 (200 mM)	57,5-100	~100 mM
4-mu palmitat-Tampon Emülsiyonu (345 μ M)	50-72,5	85 μ M -125 μ M (17-25 nmol)
BTL (1,36 mg/ml protein)	10	13,6 μ g
PanL (0,108 mg/ml protein)	10	1,08 μ g
Tic AChE (1 mg/ml)	20	20 μ g
Safl BChE (0,132 mg/ml protein, 7,35 ünite/mg protein)	20	2,64 μ g
Tic BChE (0,650 mg/ml protein, 4,5 ünite/mg protein)	10	6,5 μ g
ConA-Safl BChE süpernatant	10	
ConA-Tic BChE süpernatant	10	
5 mM IsoOMPA (Gerekli ise)	2	50 μ M
15 mM HgCl ₂ (3 saat inkübasyon sonunda)	40	3 mM
Total	200	

Açığa çıkan 4-mU miktarı, Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikroploka okuyucusu kullanılarak, 355 nm eksitasyon-460 nm emisyon dalga boylarında 0,312-2 nmol 4-mU standardı kullanılarak floresans ölçümleriyle belirlendi.

BChE'nin ConA ile Muamele Sonrası 4-mu palmitat Hidrolizinin Zamana Bağlı Kinetiği

Kontrol lipazlar (PanL ve BTL), lektin sonrası elde edilen BChE aktivitesi olmayan: ConA-BChE sonrası kalan süpernatant BChE süpernatant, Safl BChE ve tüm bu enzimlerin IsoOMPA (şesifik BChE inhibitörü) içeren örnekleri ile finalde 85 μ M 4-mu palmitat

bulunan hidroliz ortamlarıyla modifiye lipaz deneyi yapıldı (Tablo 3.6). 37°C'de 2'şer saat aralıklarla 2-8 saat inkübe edildikten sonra, aktivite ortamları HgCl₂ ile durduruldu.

Tablo 3.6. Zamana bağlı enzimatik 4-mu palmitat hidroliz ortamı

Aktivite Ortamı	Hacim (µL)	Final Konsantrasyon
Tris-HCl pH 8 (200 mM)	90-100	100 mM
4-mu palmitat-Tampon Emülsiyonu (345 µM)	50	85 µM (17 nmol)
BTL (1,36 mg/ml protein)	10	13,6 µg
PanL (0,108 mg/ml protein)	10	1,08 µg
Safl BChE (0,132 mg/ml protein, 7,35 ünite/mg protein)	20	2,64 µg
Tic BChE (0,650 mg/ml protein, 4,5 ünite/mg protein)	10	6,5 µg
ConA-Safl BChE süpernatant	15	
5 mM IsoOMPA (Gerekli ise)	2	50 µM
15 mM HgCl ₂ (2-8 saat inkübasyon sonunda)	40	3 mM
Total	200	

Açığa çıkan 4-mU miktarları, 0,063-2 nmol 4-mU standart yardımıyla 355nm eksitasyon-460nm emisyon dalga boylarındaki floresan ölçümler üzerinden belirlendi.

3.3.2. BChE'nin Olası Fosfolipaz A2 (PLA₂) Aktivitesinin Belirlenmesi

Fosfolipaz A2 (PLA₂), beyindeki majör membran fosfolipidi olan fosfatidilkolinin (PC) hidrolizini katalizler (97). BChE'nin trigliserit hidrolizine ek olarak fosfolipaz aktivitesine de sahip olup olmadığını belirlemek amacı ile fosfolipaz A2 (PLA₂) aktivitesi, kit protokolüne (Biovision, Milpitas, CA, ABD) uygun olarak ölçüldü. Kısaca, protokolde yer alan standart enzim yerine tic BChE (10mU/µL) enzimi eklendi. Ayrıca BChE inhibisyonunun incelenen aktivite üzerine etkisini gözlemlemek amacı ile BChE inhibitörü IsoOMPA (finalde 50 µM) bazı aktivite ortamlarına eklenerek tüm ortamlar 30 dakika inkübe edildi. Aktivite ortamları, PLA₂ floresan test standartları (0,2-1,0

nmol/kuyu), pozitif kontrol ve 10 µl (6,5 µg) BChE enzimi, siyah opak 96 kuyulu bir plakaya pipetlendi. PLA2 tamponu, florojenik prob ve substrat kuyulara ilave edildi. Florometrik ölçümler, Spark 10M mikrolaka okuyucu kullanılarak 37 °C'de 45 dakika boyunca kinetik modda 388nm eksitasyon-513nm emisyon dalga boyunda gerçekleştirildi. Sonuçlar doğrusal standart grafik kullanılarak hesaplandı.

3.3.3. BChE'nin Sfingomiyelinaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Sfingomiyelinaz (SMaz), majör membran fosfolipitlerinden sfingomiyelinin (SM), fosfokolin ve seramide hidrolizini katalizler (98, 99). BChE'nin SM hidrolitik aktivitesi olup olmadığını belirlemek amacı ile sfingomiyelinaz aktivitesi, kit protokolüne (Sigma-Aldrich, MO, ABD) uygun olarak ölçüldü. Kısaca, standart için 5-0,078 µg/ml olacak SMaz standardı, farklı miktarlarda Saf BChE enzim (10-50 µL, 1,32-6,60 µg) ve ConA-Saf BChE süpernatant (10-50 µL) opak 96 kuyulu plakaya pipetlendi. Tüm hacim 50 µL'ye reaksiyon tamponu ile tamamlandıktan sonra, 50 µL sfingomiyelin ve reaksiyon tampon karışımı eklendi. Mikrolaka karıştırıcı yardımıyla karıştırıldıktan sonra, 2 saat 37 °C'de inkübe edildi. Florojenik prob ve reaksiyon enzim karışımından 50 µL kuyulara ilave edildi ve 2 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda florometrik ölçümler, Molecular Devices firmasının Spectramax M2 mikrolaka okuyucu kullanılarak 540nm eksitasyon-590nm emisyon dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar logaritmik sfingomiyelinaz standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.4. BChE Enzimi ile Yağ Asitleri, Fosfolipitleri ve Trigliserit Hidrolizinin Kromatografik Yöntemlerle Analizi

3.4.1. Trioleik Asit, Oleik Asit ve 4-mu Palmitat Hidrolizinin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Analizi

Trioleik Asit, Oleik Asit ve 4-mu Palmitat Standartlarının TLC Optimizasyonu

Önceki sonuçlarımızdan yola çıkarak, 500 µL 1 mM (500 nmol) trioleik asit (TO), 500 µL 1 mM (500 nmol) oleik asit ve 600 µL 345 µM (200 nmol) 4-mu palmitat, 130 µL 3,9 mM (500 nmol) palmitat, 500 µL 0,5 mM (250 nmol) 4-mU standartları hazırlanarak, Bligh & Dyer metodu ile ekstraksiyon yapıldı (100). Organik faz çözücüsü azot ile tamamen uzaklaştırılıp, 50 µL 2:1 oranında kloroform:metanol (CHCl₃:MeOH) ile çözüldü. Silika kaplı (5x20 cm) tabakaları yükleme yapılmadan önce, 1,5 saat boyunca 1:1 kloroform:metanol (CHCl₃:MeOH) kullanılarak aktive edildi ve 110 °C'deki etüvde gece boyunca kurutuldu. Daha sonra standartlardan 10 µL örnek alınarak (5 µLx2 defa) silika kaplı iki ayrı TLC tabakaya uygulandı. Kurutulduktan sonra, 60ml nonpolar (80:20:1,5, hekzan:dietileter:asetik asit) ve 60ml polar (12:6:1, kloroform:metanol:su) karışımli iki farklı ortamda farklı tanklar içerisinde 1 saat 15 dakika boyunca (yukarıdan 3 cm kalana kadar) yürütüldü. Son olarak kurutulup %5 CuSO₄ ve %8 H₃PO₄ içeren 50 ml çözeltide 1 dk bekletilip, en sonunda 10 dk 100°C'lik etüvde kurutuldu.

BChE ve Buğday Tohumu Lipazın Olası TO Hidrolizinin TLC Analizi

Lipit hidroliz analizi, pH 8'de, substrat olarak TO ile yapıldı. TO'nun kolinesteraz hidrolizi BTL ile karşılaştırıldı. Önceki sonuçlarımızdan yola çıkarak, pH 8'de TO final konsantrasyonu 615 µM olacak şekilde aktivite ortamı hazırlandı (Tablo 3.7). Kontrol (enzimsiz) için hidroliz ortamına enzim yerine tampon konuldu.

Tablo 3.7. TO'nın lipazlar ve BChE ile hidroliz ortamı

Aktivite Ortamı	Hacim (μL)	Final Konsantrasyon
Tris-HCl pH 8 (200 mM)	187,5-237,5	100 mM
TO-Tampon Emülsiyonu (10 mM)	20	615 μM
NaCl (1 mM)	50	150 μM
CaCl ₂ (75 mM)	12,5	3 mM
BTL (1,36 mg/ml protein)	50	68 μg
Tic BChE (0,65 mg/ml protein, 4,5 ünite/mg protein)	50	32,5 μg
Total	325	

37°C'de 3 saat inkübasyon sonrası elde edilen lipitler Bligh & Dyer metodu ile ekstraksiyon yapıldı. Son aşamada organik faz üzerindeki çözücü azot ile tamamen uzaklaştırılıp, 50 μL 2:1 oranında kloroform:metanol ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$) ile çözüldü. Nonpolar yürütücüde 1 saat 15 dakika yürütüldü. Son olarak kurutulup %5 CuSO_4 ve %8 H_3PO_4 içeren çözeltide 10 dk bekletilip, 10 dk 100°C'deki etüvde bekletildi.

3.4.2. BChE ve PanL Lipit Hidrolizi Sonuçlarının Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile İncelenmesi

Lipit hidrolizleri, substratlar olarak TO ve 4-mu palmitat kullanılarak pH 8'de analiz edildi. Aktivite ortamı final konsantrasyonu 615 μM TO (Tablo 3.8) ve 167 μM 4-mu palmitat (Tablo 3.9) içeriyordu. Kontrol karışımında, enzim tampon ile değiştirildi ve bazı ortamlara BChE inhibitörü (IsoOMPA) ilave edildi.

Tablo 3.8. GC-MS analizi için TO'nun BChE ve lipaz ile hidroliz ortamı

Aktivite Ortamı	Hacim (μL)	Final Konsantrasyon
Tris-HCl pH 8 (200 mM)	197,5-217,5	135 mM
TO-Tampon Emülsiyonu (10 mM)	20	615 μM
NaCl (1 mM)	50	150 μM
CaCl ₂ (75 mM)	12,5	3 mM
PanL (1mg/ml)	10	10 μg
BChE (0,65mg/ml protein, 4,5 ünite/mg protein)	20	13 μg
5 mM IsoOMPA (BChE inhibitörü)	5	75 μM
Total	325	

Tablo 3.9. GC-MS analizi için 4-mu palmitatın BChE ve lipaz ile hidroliz ortamı

Aktivite Ortamı	Hacim (μL)	Final Konsantrasyon
Tris-HCl pH 8 (200 mM)	135	90 mM
4-mu palmitat (345 μM)	145	167 μM
PanL (1 mg/ml)	5	5 μg
BChE (0,65mg/ml protein, 4,5 ünite/mg protein)	10	6,5 μg
5 mM IsoOMPA (BChE inhibitör)	5	80 μM
Total	300	

37°C'de 1 saat inkübasyon sonrası elde edilen lipidlerin ekstraksiyonu Bligh & Dyer metodu ile yapıldı. Son aşamada organik faz üzerindeki çözücü azot ile tamamen uzaklaştırıldı ve 1,6 ml metanolde çözüldü. Hidroliz ortamı ve standartlar, TraceGold TG-5 MS (30x0,25 mm, 0,25 μm) kolonu kullanılarak, elektron iyonizasyonu (EI) kaynağı ve Thermo Trace 1310 GC-MS (ISQ single quadrapol kütle spektrometresi) ile analiz edildi. Fırın sıcaklığı başlangıçta 70 °C 6 dk bekletildi. Ardından 2 °C/dk olacak şekilde 230 °C'ye çıktı ve 230 °C'de 5 dk dakika bekletildi. Son olarak 4°C/dk olacak şekilde 240°C'ye çıkarıldı ve 240°C'de 5dk bekletildi. İyon kaynağı ve detektör sıcaklıkları 250 °C. Hidroliz

ürünlerinin tanımlanması için Supelco 37 Component FAME Mix standart yağ asit karışımı kullanıldı (Tablo 3.10). Ayrıca TO ve 4-mu palmitat hidrolizinin kantitasyonu için 2-20 ppm metil oleat (CAS No 112-62-9) ve 3-30 ppm metil palmitat (CAS No 112-39-0) standartlarının kalibrasyon grafikleri kullanıldı.

Tablo 3.10. Supelco 37 Component FAME Mix standart yağ asit karışımı içeriği

Sıra Numarası	Yağ Asidi (Metil Esteri)	Miktarı (%)
1	C4:0 (Bütirik)	4
2	C6:0 (Kaproik)	4
3	C8:0 (Kaprilik)	4
4	C10:0 (Kaprik)	4
5	C11:0 (Undekanoik)	2
6	C12:0 (Laurik)	4
7	C13:0 (Tridekanoik)	2
8	C14:0 (Miristik)	4
9	C14:1 (Miristoleik)	2
10	C15:0 (Pentadekanoik)	2
11	C15:1 (cis-10-Pentadekanoik)	2
12	C16:0 (Palmitik)	6
13	C16:1 (Palmitoleik)	2
14	C17:0 (Heptadekanoik)	2
15	C17:1 (cis-10-Heptadekanoik)	2
16	C18:0 (Stearik)	4
17	C18:1n9c (Oleik)	4
18	C18:1n9t (Elaidik)	2
19	C18:2n6c (Linoleik)	2
20	C18:2n6t (Linoleaidik)	2
21	C18:3n6 (γ -Linolenik)	2
22	C18:3n3 (α -Linolenik)	2
23	C20:0 (Araşidik)	4

Tablo 3.10. Supelco 37 Component FAME Mix standart yağ asit karışımı içeriği (Devam)

Sıra Numarası	Yağ Asidi (Metil Esteri)	Miktarı (%)
24	C20:1n9 (cis-11-Eikosenoik)	2
25	C20:2 (cis-11,14-Eikosadienoik)	2
26	C20:3n6 (cis-8,11,14-Eikosatrienoik)	2
27	C20:3n3 (cis-11,14,17-Eikosatrienoik)	2
28	C20:4n6 (Araşidonik)	2
29	C20:5n3 (cis-5,8,11,14,17-Eikosapentaenoik)	2
30	C21:0 (Henikosanoik)	2
31	C22:0 (Behenik)	4
32	C22:1n9 (Erusik)	2
33	C22:2 (Cis-13,16-Dokosadienoik)	2
34	C22:6n3 (Cis-4,7,10,13,16,19-Dokosaheksaenoik)	2
35	C23:0 (Trikosanoik)	2
36	C24:0 (Lignoserik)	4
37	C24:1n9 (Nervonik)	2

3.4.3. BChE ve PanL'nin TO ve 4-mu Palmitat Hidrolizinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (HPLC-FLD ve LC-MS/MS) ile Analizi

BChE ve PanL'nin 4-mu Palmitat Hidrolizinin Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi-Floresans Dedektörü (HPLC-FLD) ile Analizi

BChE'in 4-mu palmitat hidrolizi pH 8'de gerçekleştirildi. Çalışmada BChE'in lipit hidrolizi/lipolitik aktivitesi 4-mu palmitat substrat ile taranması hedeflendi. Lipit hidrolizi, farklı enzimlerle (lipazlar ve BChE) aynı reaksiyon karışımı kullanılarak ölçüldü. Pozitif kontrol lipaz analizleri için PanL ve BTL kullanıldı. Kolinesterazların olası lipolitik aktivitesini belirlemek için aktivite ölçümlerinde ConA muamelesinden sonra elde edilen süpernatant ve ConA muamele edilmemiş tic BChE ve Saf BChE kullanıldı. Aktivite ortamı,

finalde 167 μ M 4-mu palmitat (Tablo 3.11) içerdi. Kontrol ortamında, enzim yerine tampon (kör çözelti) konuldu ve bazı ortamlara BChE inhibitörü (IsoOMPA) ilave edildi.

Tablo 3.11. LC-MS/MS analizi için gerçekleştirilen 4-mu palmitatın BChE ve lipaz ile hidroliz ortamı

Aktivite Ortamı	Hacim (μ L)	Final Konsantrasyon
Tris-HCl pH 8 (200 mM)	75-175	90 mM
4-mu palmitat (345 μ M)	145	167 μ M
BTL (1,36 mg/ml protein)	10	13,6 μ g
PanL (0,108 mg/ml protein)	5	0,54 μ g
Safl BChE (0,132 mg/ml protein, 7,35 ünite/mg protein)	100	13,2 μ g
Tic BChE (0,65 mg/ml protein, 4,5 ünite/mg protein)	75	48,75 μ g
ConA-Tic BChE süpernatant	20	
ConA-Safl BChE süpernatant	20	
5 mM IsoOMPA (BChE inhibitör)	5	80 μ M
Total	325	

37 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra, 4-mu palmitat hidroliz ürünleri Bligh & Dyer yöntemi ile ayrıldı ve 1,2 ml metanol içerisinde çözüldü. Örnek 4 kat seyreltildi. Bu örnek ardından Hypersil Gold (150x4,6 mMx5 μ m) C18 ters faz kolonunda yürütücü olarak hareketli faz A %25 metanol içeren 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, hareketli faz B ise metanoldü. Akış hızı 0,8 ml/dk, olarak 8 dakika boyunca sadece A fazından, sonrasında 2 dakikada lineer olarak %40 metanol olacak şekilde B'den alındı. Son olarak bu mobil fazda (%40 metanol) 25 dakika boyunca analize devam edildi. Sonraki enjeksiyon için sistem başlangıç koşullarına 2 dakikada döndü ve 15 dakika kadar bu modda devam edilip sonraki örnek enjeksiyonu yapıldı (101). Örnek, Thermo Ultimate 3000 UHPLC cihazında ayrıldı ve FLD (RF-20A Floresans Dedektör) dedektörü ile 355 nm eksitasyon-460 nm emisyon dalga boylarında analiz edildi. 4-mu palmitat hidrolizinin miktar belirlemesi için 10-100 ppb 4-mU standartları kalibrasyon grafiği kullanıldı.

BChE ve PanL TO Hidrolizinin Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile Analizi

BChE'in ve kontrol lipazların lipit hidrolizi, substrat olarak TO kullanılarak pH 8'de gerçekleştirildi. Lipit hidrolizi, farklı enzimlerle (lipazlar ve BChE) aynı reaksiyon karışımı kullanılarak ölçüldü. Kolinesterazların olası lipolitik aktivitesini belirlemek için aktivite ölçümlerinde ConA muamelesinden sonra elde edilen süpernatant ve ConA muamele edilmemiş tic BChE ve Saf BChE kullanıldı. Aktivite ortamı, TO hidrolizi için finalde 615 µM TO (Tablo 3.12) içerdi. Kontrol ortamında, enzim yerine tampon konuldu ve bazı ortamlara BChE inhibitörü (IsoOMPA) ilave edildi.

Tablo 3.12. LC-MS/MS analizi için gerçekleştirilen TO'nun BChE ve lipaz ile hidroliz ortamı

Aktivite Ortamı	Hacim (µL)	Final Konsantrasyon
Tris-HCl pH 8 (200 mM)	197,5- 237,5	135 mM
TO-Tampon Emülsiyonu (10 mM)	20	615 µM
NaCl (1 mM)	50	150 µM
CaCl ₂ (75 mM)	12,5	3 mM
BTL (1,36 mg/ml protein)	10	13,6 µg
PanL (0,108 mg/ml protein)	5	0,54 µg
Saf BChE (0,132 mg/ml protein, 7,35 ünite/mg protein)	100	13,2 µg
Tic BChE (0,65 mg/ml protein, 4,5 ünite/mg protein)	75	48,75 µg
ConA-Tic BChE süpernatant	20	
ConA-Saf BChE süpernatant	20	
Total	325	

37 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra, karışımdaki lipitler Bligh & Dyer yöntemi ile ayrıldı. Son aşamada, organik faz çözücüsü azot ile tamamen uzaklaştırıldı ve hidroliz ortamı, 1,2 ml metanol içerisinde çözülüp 1000 kat seyreltilti. Bu örnek ardından Hypersil

Gold (50x2,1 mMx3 µm) C18 ters faz kolonunda yürütücü olarak %51,5 izopropil alkol, %35 Asetonitril, %13,5 su (%0,1 Amonyum format) 0,8 ml/dk akış hızında ve 30 °C kolon sıcaklığı koşullarında incelendi. Örnek, ESI iyonizasyon kaynağı kullanılarak, Thermo Ultimate 3000 UHPLC cihazında ayrıldı ve TSQ Quantum Access Max MS/MS dedektörü ile analiz edildi. LC-MS/MS cihazı substratımızın amonyumlu kompleksini seçici olarak tanıyıp (triolein-NH₄⁺, m/z 902,85) analizini alıkonma süresi (rt) 9,53 dakika olan diaçilgliserol parçalanma ürünü (m/z 603,8) üzerinden gerçekleştirildi (102). TO hidrolizinin miktar belirlenmesi için 25-800 ppb TO-NH₄⁺ standartları kalibrasyon grafiği için kullanıldı.

Protein Tayini

Örneklerdeki protein içerikleri Bikinkoninik asit (BCA) protein tayin (103) kiti (Sigma) 96 kuyulu mikro yöntemine göre yapıldı. Kısaca 200 µL BCA çalışma solüsyonuna, uygun olarak seyreltilmiş protein örneklerinden ve sığır serum albumin (BSA) standartlarından 25 µL konuldu. Karışım 30 dk boyunca 37 °C'de inkübasyon sonrası Spectramax M2 mikroparka cihazı ile 562 nm'de okutuldu. Örneklerin protein düzeyleri, 200-1000 µg/ml BSA lineer standart grafiği kullanılarak elde edildi. Tüm örnekler en az üç kez tekrarlandı.

İstatistiksel Değerlendirmeler

Enzim kinetiklerine ait verilerin hesaplanmasında ve tüm grafikler çizilirken Graphpad Prism 8.42, istatistik analizleri için IBM SPSS Statistics 23 ve Graphpad Prism programı kullanıldı.

Verilerin ilk önce normal dağılıma uygunlukları ve tanımlayıcı istatistikleri gerçekleştirildi. Enzim - substrat ilişkisinin Michaelis-Menten modeline uyumu ve kinetik parametrelerin belirlenmesi nonlineer regresyon ile gerçekleştirildi. Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, bağımsız değişkenli 2 grubun karşılaştırmasında, parametrik olmayan t-testi Mann-Whitney U kullanıldı. Ayrıca, 2'den fazla grubun

karşılaştırmasında, One-way ANOVA'nın parametrik olmayan karşılığı, Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Post-hoc karşılaştırmaları gerektiğinde çoklu gruplarda Dunn's düzeltmesi yapıldı. Tüm bu istatistik testlerin sonuçlarına göre $p \leq 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

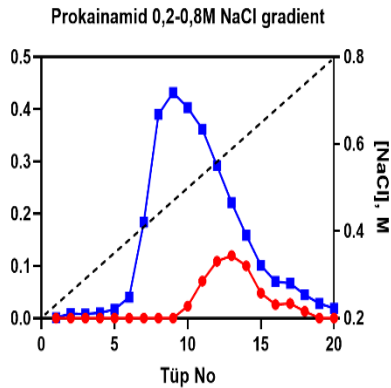
4. SONUÇLAR

4.1. BChE Enziminin Plazmadan Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

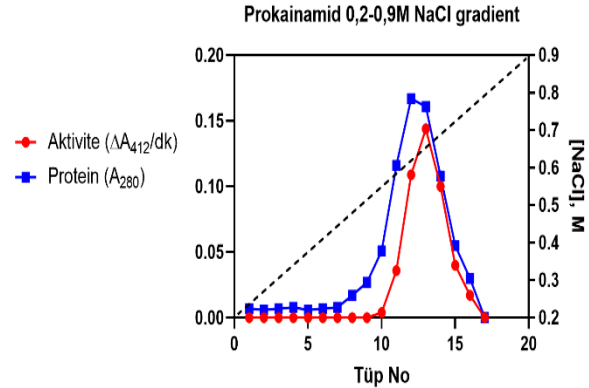
4.1.1. BChE'nin İnsan Serumundan Saflaştırılması

BChE enzimi insan serumu kullanılarak sırasıyla, asitli diyaliz, anyon değıştirici (DEAE Trisakril M) ve afinite kromatografisi (Prokainamid Sefaroz 4B) basamaklarıyla saflaştırıldı. Prokainamid Sefaroz 4B kromatografisinde son aşamada 25 mM potasyum fosfat tamponu içinde hazırlanmış 100 ml hacimde 0,2-0,8 M NaCl (Şekil 4.1. A) gradiyenti bağlandı. Kolon akış hızı 20 mL/saat, hacmi 14ml olan prokainamid-sefaroze 4B kolonuna yüklendi ve 3 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Bu işlemde enzim aktivitesine sahip tüpler birleştirilip, diyaliz yapıldıktan sonra yeniden Prokainamid Sefaroz 4B kromatografisine yüklendi. Son aşamada 60 ml 0,2-0,9 M NaCl (Şekil 4.1. B) gradiyenti bağlanarak saf BChE enzimi kolondan elüe edildi.

A)



B)



Şekil 4.1. Prokainamid Sefaroz 4B afinite kromatografisinin birinci (A) ve ikinci (B) tuz elüsyonu

Gradyent sonucunda saf BChE, 0,67 M NaCl konsantrasyonunda tek bir zirve halinde elde edildi. Her saflaştırma aşamasının sonunda 500 µL ayrılan örneklerde

protein ve aktivite tayini yapıldı ve elde edilen veriler ile saflaştırma tablosu oluşturuldu (Tablo 4.1).

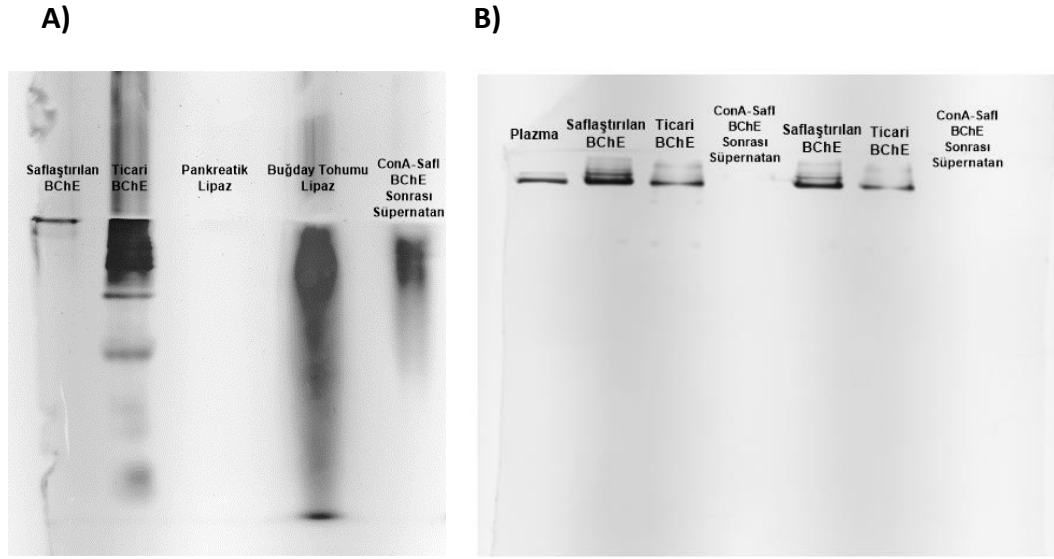
Tablo 4.1. Bütirikolinesteraz enziminin plazmadan saflaştırma basamakları

Numuneler	V _{Toplam} (ml)	Aktivite (Ünite/ml)	Protein Kons. (mg/ml)	Total Aktivite (Ünite)	Spesifik aktivite (Ünite/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Plazma	40	1,695	68,26	67,80	0,025	100,0	1
Asitli Diyaliz	40	1,427	49,10	57,10	0,029	84,2	1
DEAE Tris akril M Reçin	24	2,206	6,02	52,95	0,366	78,1	14,6
İkinci Prokainamid- Sefaroz 4B (Safl BChE)	23,5	0,97	0,132	22,80	7,35	33,6	294

Safl BChE enziminin saflaştırma oranı 294 kat olup, herhangi bir safsızlık içerip içermediğini göstermek için protein boyaması yapıldı.

4.1.2. BChE ve Kontrol Lipazların Nativ Poliakrilamid Jel Elektroforezi: Protein ve Aktivite Boyaması

İnsan serumundan Safl BChE ve tic BChE'nin saflığını kontrol etmek amacıyla, örnekler nativ poliakrilamid jel elektroforezine (PAGE) uygulandı (90). Jele deneyde kullanılan kontrol lipazlar (PanL ve BTL), Safl BChE ve tic BChE ve ortamda BChE aktivitesi içermeyen: ConA-Safl BChE süpernatant yüklenmiştir. Protein boyaması yapılacak jel için kuyu başına 1 µg, aktivite boyaması için ise her kuyuda 3 µg protein yüklendi. Elektroforezin sonrasında jeller protein boyaması (Şekil 4.2. A) için gümüş boyama (92), BChE aktivite boyaması (Şekil 4.2. B) ise Karnovsky-Roots tekniği (93)'ne göre yapıldı.

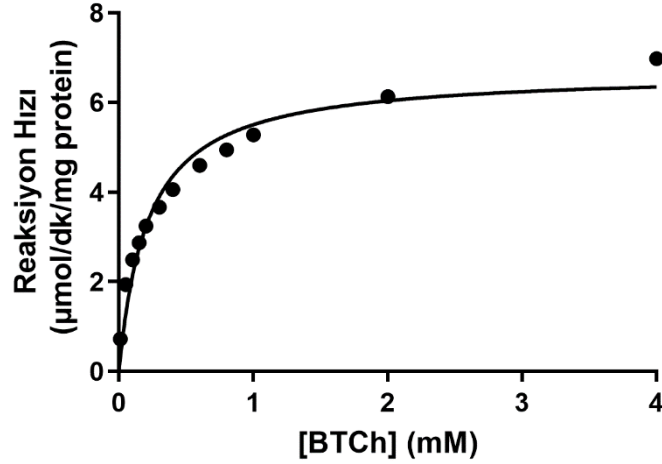


Şekil 4.2. Lipazlar, BChE'ler ve ConA-Saft BChE süpernatant için protein (A) ve aktivite (B) boyaması (%5-%7,5 yükleme-ayırım jeli)

Protein boyaması sonuçlarına göre, Safl BChE'nin tic BChE'ye göre daha saf olduğunu gösterdi. BChE aktivite boyaması ise, aynı miktarda protein konsantrasyonunda Safl BChE'nin tic BChE'ye göre daha yüksek aktivite gösterdiği bulundu. Ayrıca ConA-Saft BChE süpernatantında herhangi bir BChE aktivitesine rastlanmadı.

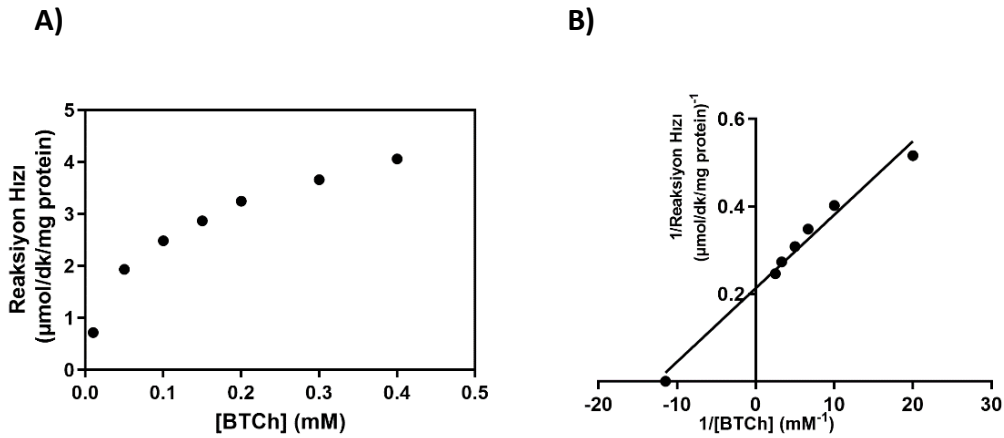
4.1.3. BChE'nin Substrat (Bütiriltiyokolin) Kinetiği

Safl BChE'nin substrat hidroliz kinetiği, finalde 0,010-4 mM aralığında (12 farklı derişim) bütiriltiyokolin (BTCh) kullanılarak yapıldı. Elde edilen verilere ait Michealis-Menten grafiği çizildi (Şekil 4.3). Burada kullanılan tüm enzimler için bir enzim ünitesi; 1 μmol substratı 1 dakikada uygun şartlar altında hidroliz eden enzim (kolinesterazlar, lipazlar vb.) miktarı olarak tanımlandı (1U, $\mu\text{mol}/\text{dk}$).



Şekil 4.3. Saf BChE enziminin 0,01-4mM BTCh substratı ile Michealis-Menten grafiği

Elde edilen veriler değerlendirildikten sonra, ilk bağlanmanın afinite sabiti (K_m) GraphPad Prism programının nonlinear regresyon modülü hesaplandı. İlk bağlanmanın gerçekleştiği substrat aralığı 0,01-0,40 mM'dir. Bu verilere ait Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Graphpad programı ile çizildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. BChE enziminin 0,01-0,40 mM BTCh substratı ile Michealis-Menten (A) ve Lineweaver-Burk (B) grafikleri

Nonlinear regresyon modellemesi sonuçlarından elde edilen kinetik parametreler tabloda gösterildi.

Tablo 4.2. BChE'nin 0,01-0,40 mM BTCh ile substrat kinetiği parametreleri

Kinetik Parametreler	Değer
V_{max}	4,763 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein
K_m	87 μM

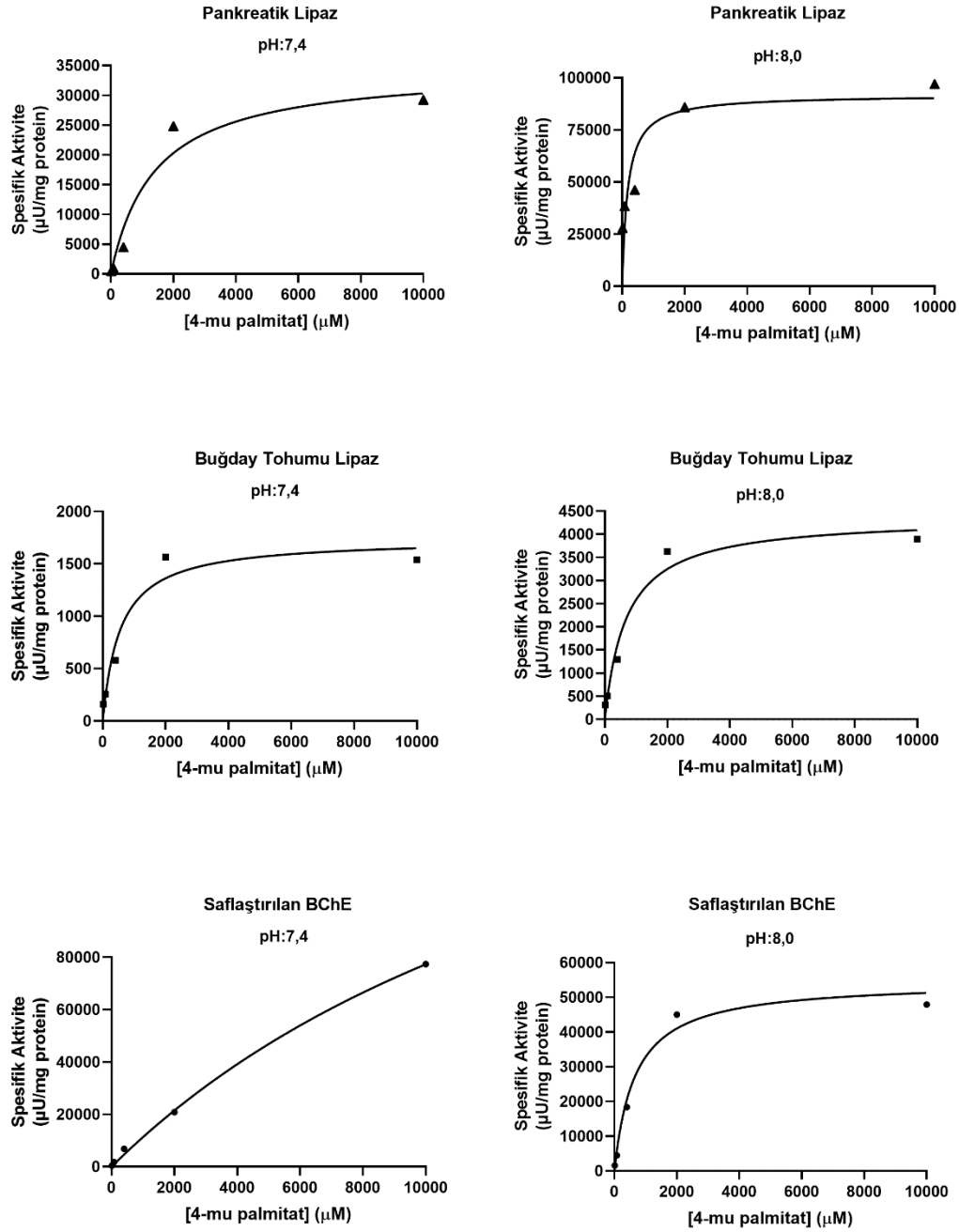
PanL ve BTL ile farklı pH (pH 7,4 ve 8) ve finalde 10-4000 μM BTCh kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, kullanılan lipazların BTCh hidrolizini gerçekleştiremediğini gösterdi.

4.2. BChE Enzimi ile Yağ Asitleri, Fosfolipitleri ve Trigliserit Hidrolizinin Spektroskopik Yöntemlerle Analiz Sonuçları

4.2.1. BChE'nin 4-mu Palmitat Hidrolizi

BChE ve Kontrol Lipazların 4-mu Palmitat Hidrolizi Optimizasyonu

4-mu palmitat hidrolizine en uygun pH ve substrat konsantrasyonunu belirlemek için kontrol lipazları (BTL ve PanL) ve Saf BChE ile modifiye asit lipaz aktivite ölçümü (94) gerçekleştirildi. Finalde 15-10000 μM 4-mu palmitat kullanılarak pH 7,4 ve pH 8'de hidroliz deneyleri yapıldı. Serbest kalan 4-mU miktarı 355nm-460nm uyarma-emisyon dalga boylarındaki floresan ölçümleri ile belirlendi. Açığa çıkan 4-mU miktarı, 0,312-10 nmol 4-mU standart grafiği yardımıyla hesaplandı. Burada kullanılan tüm enzimler için bir enzim ünitesi; 1 μmol substratı 1 dakikada uygun şartlar altında hidroliz eden enzim (kolinesterazlar, lipazlar vb.) miktarı olarak tanımlandı (1U, $\mu\text{mol/dk}$). Lipazların ve BChE enziminin pH 7,4 ve pH 8'deki Michealis-Menten kinetik sonuçları şekil 4.5'te gösterildi.



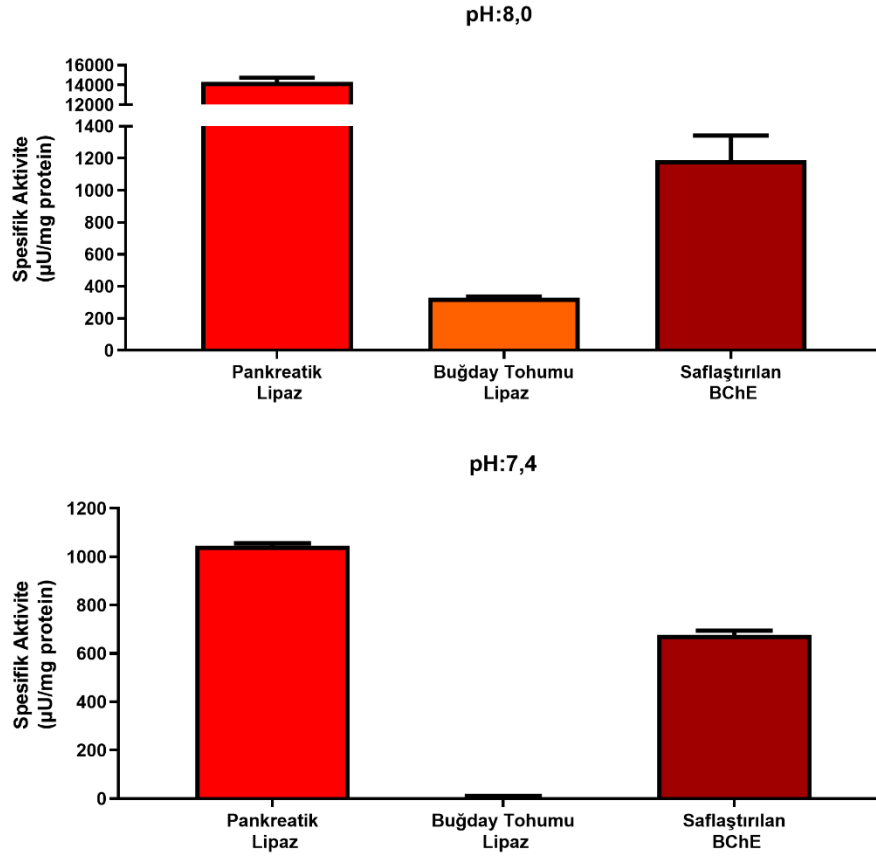
Şekil 4.5. Lipazların ve Saflı BChE enziminin 15-10000 µM 4-mu palmitat ile pH 7,4 ve pH 8'deki Michealis-Menten kinetik sonuçları

Grafikte gösterilen verilerin Graphpad Prism programı kullanılarak nonlineer regresyon analizi ile elde edilen kinetik parametreler aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 4.3. Kontrol lipazlar ve BChE'nin pH 7,4 ve pH 8'de 4-mu palmitat hidrolizine ait kinetik parametreleri

Enzim	pH 7,4		pH 8	
	Vmax, pmol/dk/mg protein (Değer±Std. Hata)	Km, µM (Değer±Std. Hata)	Vmax, pmol/dk/mg protein (Değer±Std. Hata)	Km, µM (Değer±Std. Hata)
PanL	34592±2942	1411±426	91847±6777	177,5±63,3
BTL	1741±94	557±122	4371±193	692,8±119,7
Saf BChE	21033±4195	18594±2982	54688±2147	666,6±93,5

Substrat kinetiği sonuçlarından yola çıkarak finalde 250 µM 4-mu palmitat kullanılarak pH 7,4 ve pH 8'de hidroliz deneyi yapıldı. 2 saat inkübasyon sonunda HgCl₂ ile reaksiyon sonlandırıldı ve açığa çıkan 4-mU miktarı, 0,312-10 nmol 4-mU standart grafiği yardımıyla hesaplandı. Lipazların ve BChE enziminin pH 7,4 ve pH 8'de 4-mu palmitat hidroliz sonuçları şekil 4.6'da gösterildi.



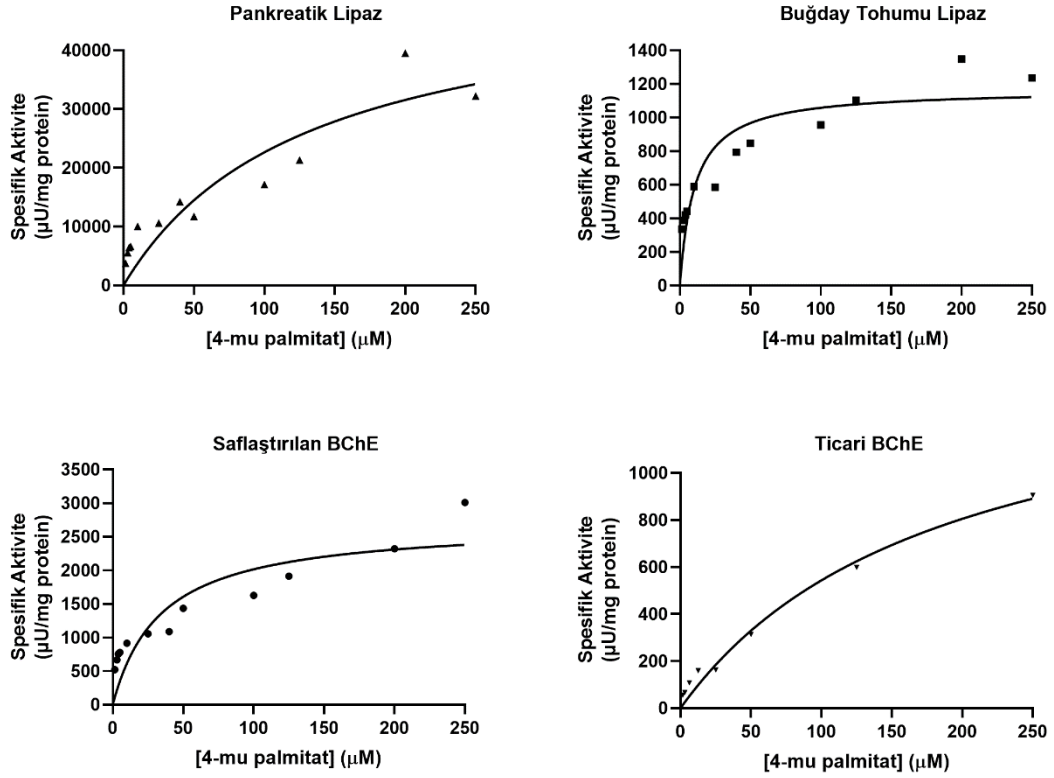
Şekil 4.6. Lipazların ve Safıl BChE enzimine ait pH 7,4 ve pH 8’de 250 µM 4-mu palmitat hidrolizi değeri

Elde edilen sonuçlar, hem kontrol olarak kullanılan lipazlar (BTL ve PanL) hem de Safıl BChE enzimlerinin 4-mu palmitatı pH 8’de daha etkili biçimde hidroliz ettiğini göstermektedir.

BChE ve Kontrol Lipazların 4-mu Palmitat Substrat Kinetiği

4-mu palmitat substrat kinetikleri, kontrol lipazlar, Safıl BChE ve tic BChE enzimi kullanılarak pH 8’de gerçekleştirildi. Finalde artan 4-mu palmitat kullanılarak 1,5-250 µM (12 farklı derişim), modifiye asit lipaz ölçümü ile Michaelis Menten kinetiği yapıldı. Hem Safıl BChE enzimi hem de kontrol lipazlar için 4-mu palmitat’ı substrat olarak kullanabilme

yetileri, verilerin Graphpad Prism istatistik programı kullanılarak Michaelis-Menten kinetiğine uyumları ve kinetik parametreleri saptanması ile değerlendirildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kontrol Lipazlar (PanL ve BTL), Saf BChE ve tic BChE enziminin 4-mu palmitat substratı ile Michealis-Menten kinetiği grafikleri

Grafikte gösterilen verilerin Graphpad Prism programı kullanılarak nonlinear regresyon analizi ile elde edilen kinetik parametreler aşağıdaki tabloda (Tablo 4.4) gösterildi.

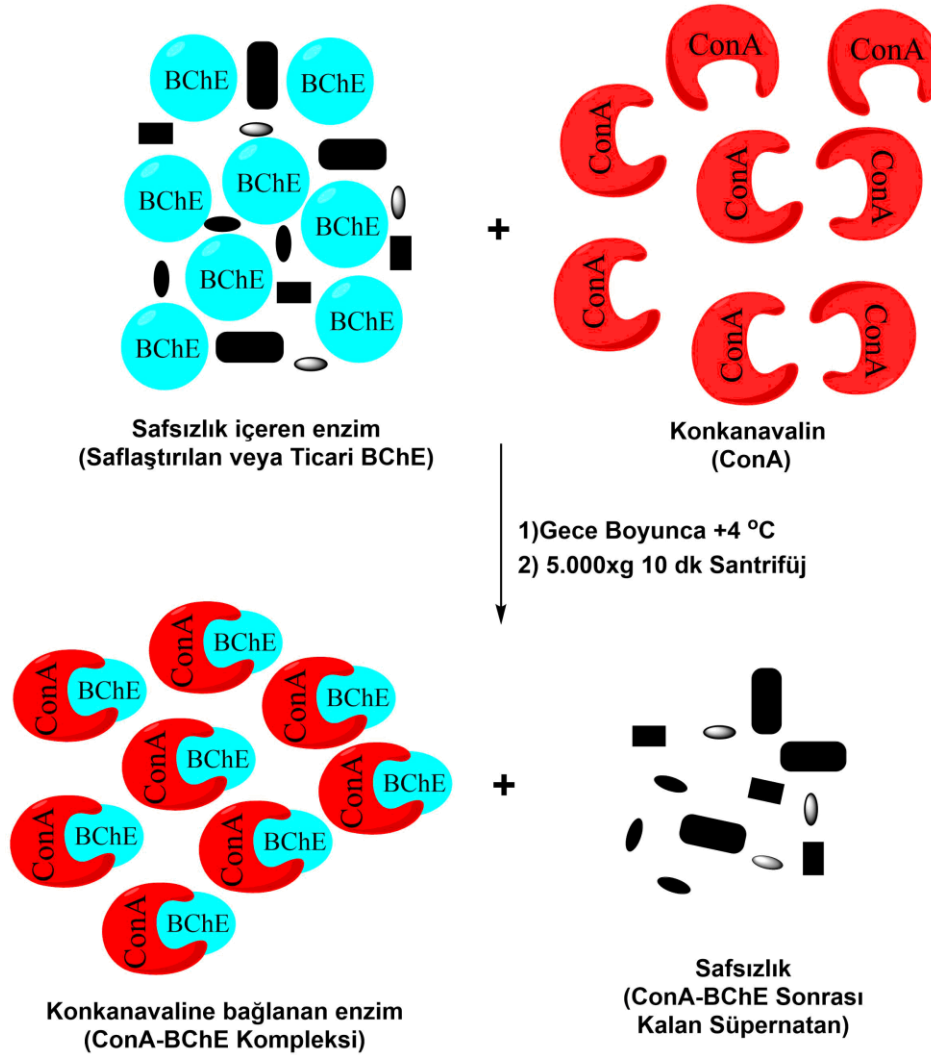
Tablo 4.4. 4-mu palmitat hidrolizi yapan kontrol lipazlar (PanL ve BTL), Safıl BChE ve tic BChE'e ait kinetik parametreler

Enzim	Vmax, pmol/dk/mg protein (Değer±Std. Hata)	Km, µM (Değer±Std. Hata)
PanL	52024±8349	129,8±43,0
BTL	1168±76	10,4±3,0
Safıl BChE	2704±240	34,2±10,0
Tic BChE	1554±219	186,0±49,3

Elde edilen veriler Graphpad prism programı ile Michaelis-Menten davranışı incelendiğinde, bulunan kinetik parametreler bize substrat olarak 4-mu palmitat kullanan enzimlerin afinitesini şu şekilde sıralar: BTL > Safıl BChE > PanL > tic BChE. Bu sonuçlara göre Safıl BChE'inin 4-mu palmitata substrat afinitesi PanL'den daha fazla gözükmetedir.

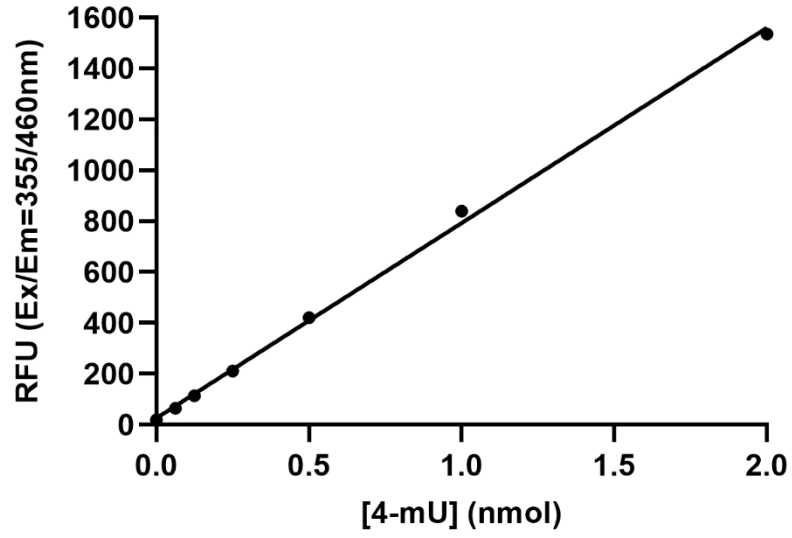
Konkanavalin A ile Muamele Sonrası BChE Enziminin 4-mu Palmitat Hidrolizi

Elde ettiğimiz 4-mu palmitat sonuçlarına göre, tic BChE ve Safıl BChE enzimlerinin 4-mu palmitat'ı hidroliz ettiği gösterilmiştir. Ancak, BChE enzimine ek olarak, enzim örneklerinin içeriğinde lipit hidrolizine neden olabilecek bazı safsızlıklar olabileceği düşünöldü. Bu yüzden tic BChE ve Safıl BChE lektin ile muamele edilip iyice saflaştığından emin olunduktan sonra pH 8'de 4-mu palmitat hidroliz deneyi tekrarlandı (Şekil 4.8).



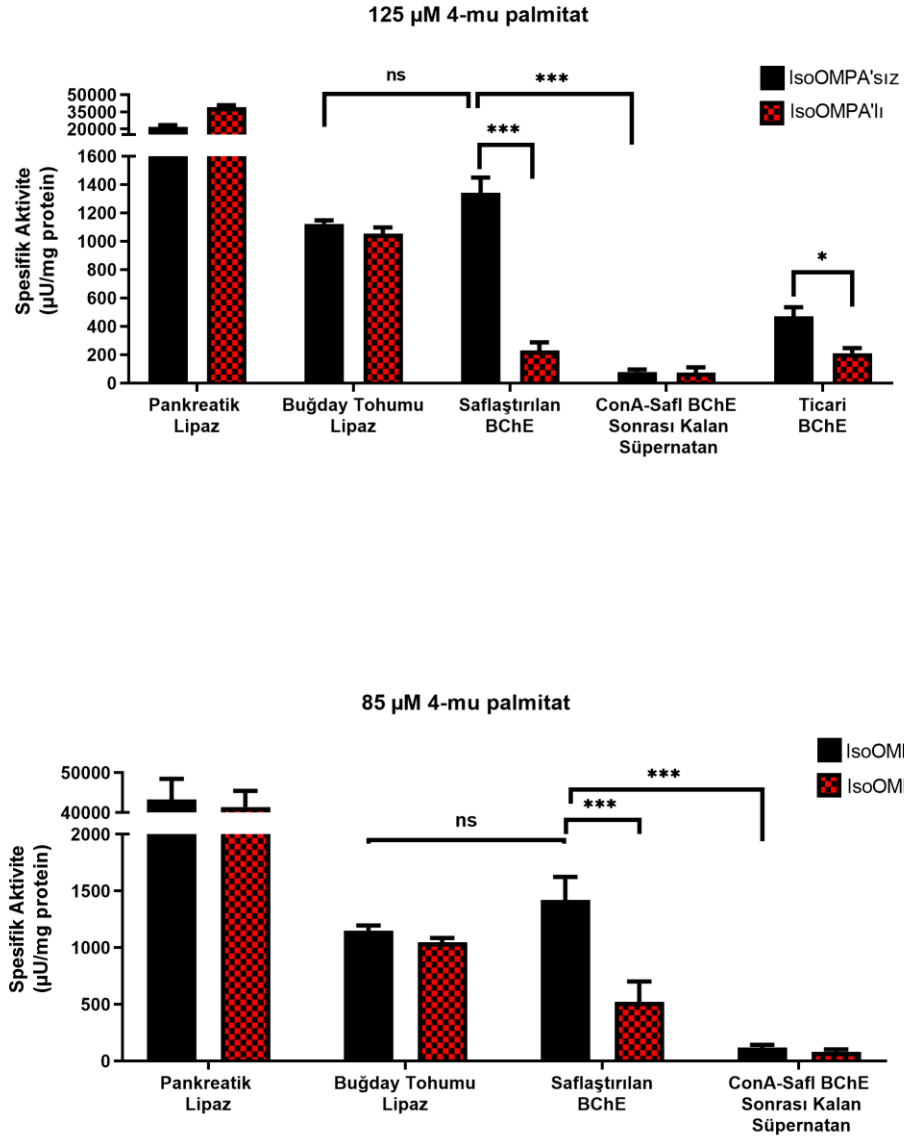
Şekil 4.8. Saf BChE veya tic BChE'nin ConA ile muamelesi

Kontrol lipazlar (PanL ve BTL), asetilkolinesteraz (AChE), Saf BChE ve tic BChE, lektin sonrası elde edilen ConA-BChE sonrası kalan süpernatan (BChE aktivitesi içermeyen) ve IsoOMPA (spesifik BChE inhibitörü) içeren ortamların, finalde 85 μ M ve 125 μ M 4-mu palmitat hidrolizleri modifiye lipaz deneyi yapıldı. 37°C'de 3 saat inkübasyon sonrası açığa çıkan 4-mU miktarları, 0,063-2 nmol 4-mU standart yardımıyla 355nm eksitasyon-460nm emisyon dalga boylarındaki floresan ölçümler üzerinden belirlendi (Şekil 4.9).



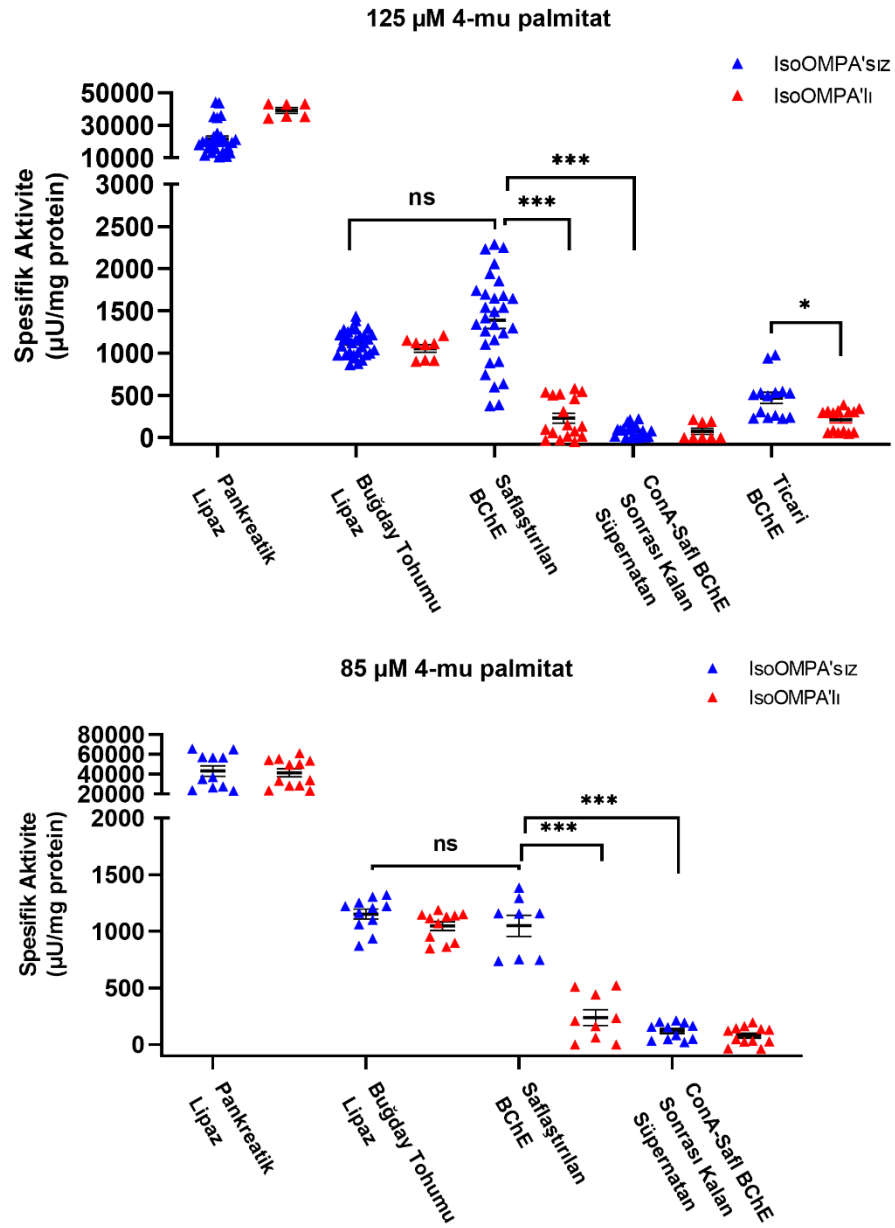
Şekil 4.9. 4-mu palmitat hidrolizi için kullanılan 4-mU standart grafiği

Standart grafikten yararlanılarak elde edilen, 85-125 μM 4-mu palmitat hidroliz sonuçları şekil 4.10'da gösterildi. Enzimler için bir enzim ünitesi; 1 μmol substratı 1 dakikada uygun şartlar altında hidroliz eden enzim (kolinesterazlar, lipazlar vb.) miktarı olarak tanımlandı (1U, $\mu\text{mol}/\text{dk}$).



Şekil 4.10. Kontrol Lipazlar, BChE ve Con A-BChE muamelesi sonrası kalan süpernatının 85 μ M ve 125 μ M 4-mu palmitat'ı hidroliz sonuçları

Elde edilen sonuçların dağılımları ve yapılan deneylerin tutarlılığını daha iyi görmek için, sonuçlar saçılım grafiği olarak da gösterildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Kontrol Lipazlar, BChE ve Con A-BChE muamelesi sonrası kalan süpernatanın 85 μ M ve 125 μ M 4-mu palmitat'ı hidroliz sonuçlarına ait saçılım grafiği.

Kontrol Lipazlar, BChE ve Con A-BChE muamelesi sonrası kalan süpernatanın 85 μ M ve 125 μ M 4-mu palmitat'ı hidroliz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde,

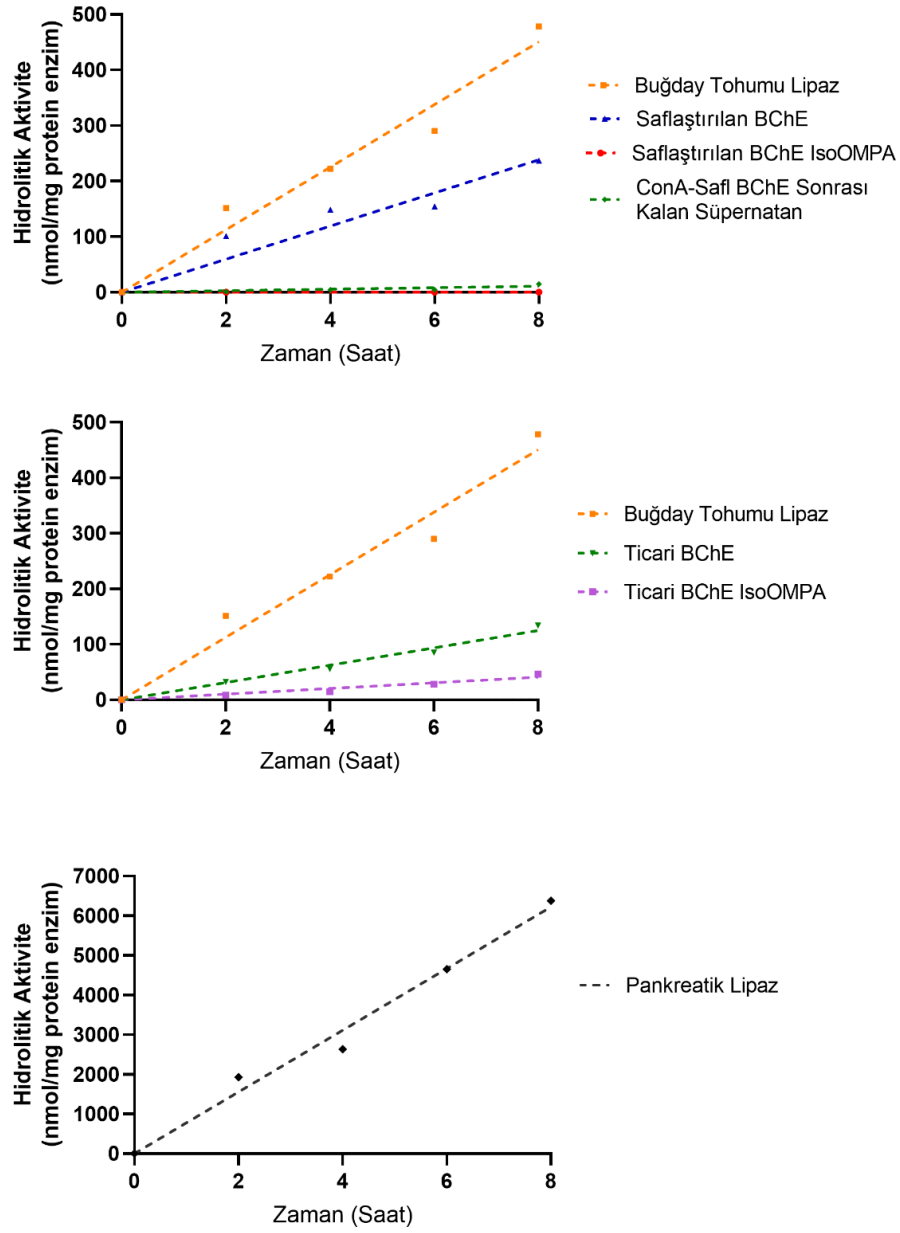
PanL diğer enzim gruplarıyla anlamlı olarak farklıydı ($p < 0,001$). Elde edilen veriler incelenen enzimler arasında 4-mu palmitat hidrolizini en fazla oranda ve en yüksek hızda PanL'nin gerçekleştirdiğini gösterdi. Saf BChE'ye ait 4-mu palmitat hidroliz sonuçları karşılaştırıldığında, saf BChE ile spesifik inhibitörü varlığında ve ConA muamelesi sonucunda elde edilen süpernatant arasında anlamlı bir fark ($p < 0,001$) bulundu. Saf BChE ve BTL arasında, lipolitik aktivite de istatistiksel anlamda herhangi bir fark bulunmadı ($p > 0,050$). Bu bulgu, Saf BChE'nin 4-mu palmitat'ı belirtilen substrat konsantrasyonlarında BTL kadar etkin hidroliz edebildiğini göstermektedir. Tic BChE ile substrat olarak $125 \mu\text{M}$ 4-mu palmitat kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde, inhibitörsüz Tic BChE'nin, IsoOMPA'lı tic BChE arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu ($p = 0,014$). Bu farkın saflaştırılan BChE'nin daha saf olmasından kaynaklandığını düşünülmektedir.

ConA-Saf BChE süpernatantın hem $85 \mu\text{M}$ hem de $125 \mu\text{M}$ 4-mu palmitatı çok düşük düzeyde hidroliz ettiği gözlemlendi. Bu sonuç saflaştırdığımız enzim ile elde edilen 4-mu palmitat hidrolizinin BChE'ye ait olduğunu göstermektedir.

Aynı çalışmalar ticari insan asetilkolinesteraz enzimiyle gerçekleştirildi. Ancak asetilkolinesterazın 4-mu palmitat'ı hidroliz etmediği gözlemlendi.

BChE'nin ConA ile Muamele Sonrası 4-mu Palmitat Hidrolizinin Zamana Bağlı Kinetik Sonuçları

Kontrol lipazlar (PanL ve BTL), lektin afinitesi sonrası elde edilen ConA-Saf BChE süpernatant, Saf BChE, tic BChE ve tüm bu enzimlerin IsoOMPA (spesifik BChE inhibitörü) içeren örnekleri ile finalde $85 \mu\text{M}$ 4-mu palmitat bulunan hidroliz ortamları hazırlanarak 2'şer saat aralıklarla (2-8 saat) inkübe edilmeleri ile modifiye lipaz deneyi yapıldı. Elde edilen zamana bağlı 4-mu palmitat hidroliz sonuçları şekil 4.12'de gösterildi.



Şekil 4.12. Zamana bağlı 85 μ M 4-mu palmitat hidrolizinin IsoOMPA'lı ve IsoOMPA'sız saflaştırılmış BChE ve tic BChE, BTL ve PanL sonuçları

Grafikte sunulan verilerin analizinden elde edilen hidroliz hızları takip eden tabloda gösterildi.

Tablo 4.5. Kontrol Lipazlar (PanL ve BTL) ve BChE'lerin 85 μ M 4-mu palmitat hidroliz hızları

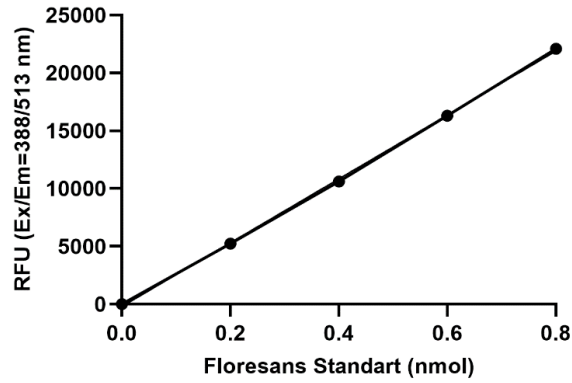
Kontrol Lipazlar	Hidroliz Hızı (nmol/mg protein/saat)	BChE	Hidroliz Hızı (nmol/mg protein/saat)	BChE	Hidroliz Hızı (nmol/mg protein/saat)
PanL	777,9	Saflaştırılmış BChE	29,82	Tic BChE	15,61
BTL	56,33	Saflaştırılmış BChE IsoOMPA	0,002	Tic BChE IsoOMPA	5,12
		ConA-Safl BChE süpernatant	1,37		

Elden edilen sonuçlar Safl BChE'nin 4-mu palmitat hidroliz hızının tic BChE'den daha yüksek, BTL ile yakın olduğunu gösterdi. BChE enzimlerine ait 4-mu palmitat hidroliz sonuçları karşılaştırıldığında Saflaştırılmış BChE'in hidroliz hızı BTL ile yakın olduğu gözlemlendi. IsoOMPA uygulamasının saflaştırılmış BChE'ı neredeyse tamamen inhibe ederken tic BChE aktivitesinin isoOMPA ile gözlenen inhibisyonun inhibitör yokluğunda elde edilen verinin yaklaşık üçte biri olduğu gözlemlendi.

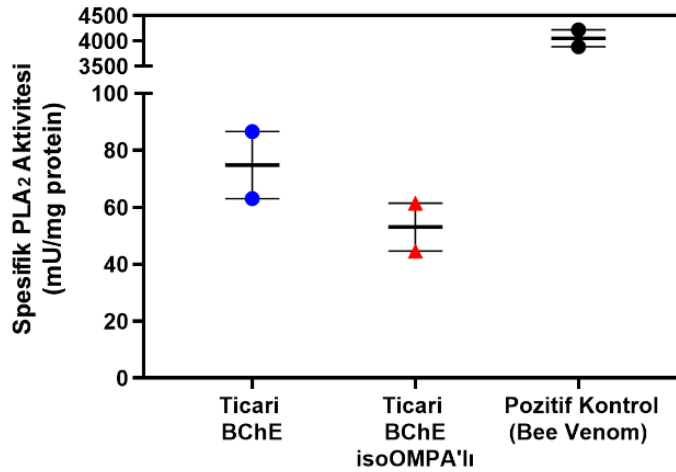
4.2.2. BChE'nin Olası Fosfolipaz A2 (PLA₂) Aktivitesinin Belirlenmesi

BChE'nin trigliserit hidrolizine ek olarak fosfolipaz aktivitesine de sahip olup olmadığını belirlemek amacı ile fosfolipaz A2 (PLA₂) aktivitesi, kit protokolüne (Biovision, Milpitas, CA, ABD) uygun olarak ölçüldü. Kısaca, protokolde yer alan standart enzim yerine tic BChE (10 mU/ μ L) enzimi eklendi. Ayrıca BChE inhibisyonunun incelenen aktivite üzerine etkisini gözlemlemek amacı ile BChE inhibitörü IsoOMPA (finalde 50 μ M) bazı

aktivite ortamlarına eklenerek tüm ortamlar 30 dakika inkübe edildi. Aktivite ortamları, PLA₂ floresan test standartları (0,2-1,0 nmol/kuyu), pozitif kontrol florojenik prob ve substrat kuyulara ilave edildi. Florometrik ölçümler, Spark 10M mikrolpaka okuyucu kullanılarak 37 °C'de 45 dakika boyunca kinetik modda 388nm eksitasyon-513nm emisyon dalga boyunda gerçekleştirildi. Sonuçlar doğrusal standart grafik kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.13 ve 4.14)



Şekil 4.13. PLA₂ doğrusal standart grafiği

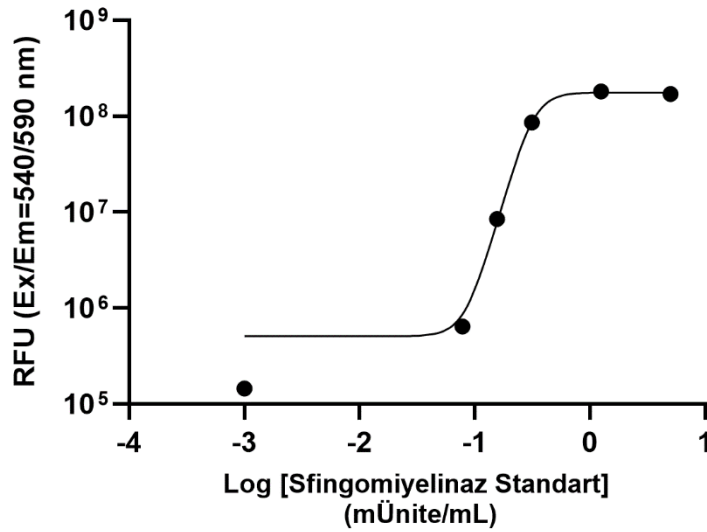


Şekil 4.14. Tic BChE'nin PLA₂ aktivitesi

Sonuçlar, tic BChE'nin kısmi PLA₂ aktivitesi olduğunu gösterdi. Spesifik BChE inhibitörü olan IsoOMPA yokluğunda tic BChE'nin daha yüksek PLA₂ aktivitesi gösterdiği bulundu. Ancak elde edilen veriler kısıtlı olduğu için istatistiksel analiz gerçekleştirilemedi.

4.2.3. BChE'nin Sfingomiyelinaz Aktivitesinin Ölçülmesi

BChE'nin sfingomiyelin hidrolitik aktivitesi olup olmadığını belirlemek amacı ile sfingomiyelinaz aktivitesi, kit protokolüne (Sigma-Aldirich, MO, ABD) uygun olarak ölçüldü. Kısaca, standart için 5-0,078 µg/ml olacak SMaz standardı, farklı miktarlarda Saf BChE enzim (10-50 µL), ConA-Saf BChE süpernatant (10-50 µL) ve sfingomiyelin substratı opak 96 kuyulu plakaya pipetlenerek 2 saat 37 °C'de inkübe edildi. Sonuçlar logaritmik sfingomiyelinaz standart grafiği kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Sfingomiyelinaz standart grafiği

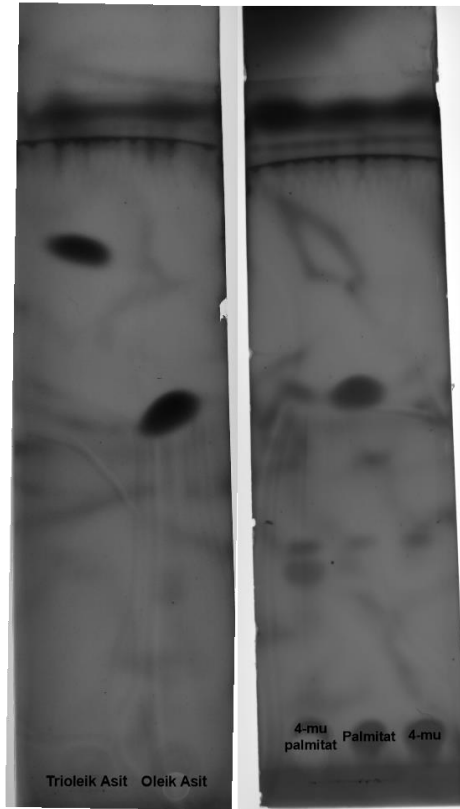
Saf BChE enzimi ile yapılan çalışmalarda protokole uygun gerçekleştirilen aktivite ortamında sfingomiyelinaz aktivitesi ölçülemedi. Buna göre elde edilen sonuçlar, Saf BChE'nin sfingomiyelinaz aktivitesine sahip olmadığını gösterdi.

4.3. BChE Enzimi ile Yağ Asitleri, Fosfolipitleri ve Trigliserit Hidrolizinin Kromatografik Yöntemlerle Analizi

4.3.1. TO, Oleik Asit ve 4-mu Palmitat Hidrolizinin TLC Analizi

TO, Oleik Asit ve 4-mu Palmitat Standartlarının TLC Optimizasyonu

Önceki sonuçlarımızdan yola çıkarak, 500 µL 1 mM (500 nmol) TO, 500 µL 1 mM (500 nmol) oleik asit ve 600 µL 345 µM (200 nmol) 4-mu palmitat, 130 µL 3,9 mM (500 nmol) palmitat, 500 µL 0,5 mM (250 nmol) 4-mU standartları hazırlanarak, Bligh & Dyer metodu ile ekstraksiyon yapıldı (100). Organik faz çözücüsü azot ile tamamen uzaklaştırılıp, 50 µL 2:1 oranında kloroform:metanol (CHCl₃:MeOH) ile çözüldü. Daha sonra standartlardan 10 µL örnek alınarak (5 µLx2 defa) silika kaplı iki ayrı TLC tabakaya uygulandı. Kurutulduktan sonra, 60ml nonpolar (80:20:1,5, hekzan:dietileter:asetik asit) ve 60ml polar (12:6:1, kloroform:metanol:su) karışımli iki farklı ortamda farklı tanklar içerisinde 1 saat 15 dakika boyunca (yukarıdan 3 cm kalana kadar) yürütüldü. Son olarak kurutulup %5 CuSO₄ ve %8 H₃PO₄ içeren 50 ml çözeltide 1 dk bekletilip, en sonunda 10 dk 100°C'lik etüvde kurutuldu. Elde edilen sonuçlar şekil 4.16'da gösterildi.



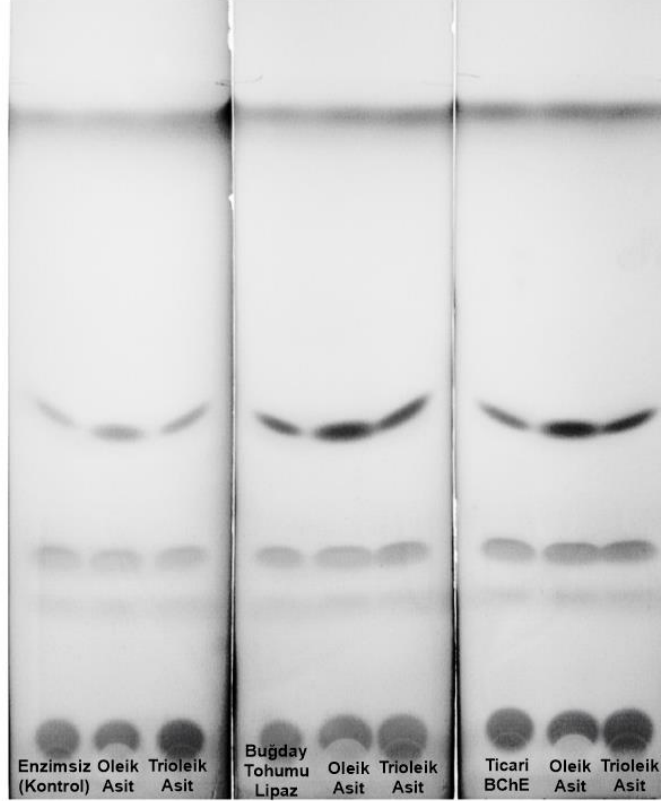
Şekil 4.16. TO, oleik asit ve 4-mu palmitat standartlarının nonpolar yürütücüdeki TLC sonuçları

Elde edilen sonuçlarda, nonpolar yürütücüde TO ile oleik asit bantlarının net bir şekilde ayrıldığı görüldü. Ayrıca, nonpolar yürütücüde 4-mu palmitat, palmitat ve 4-mU bantlarının ise kısmen karıştığı görülmektedir. Polar çözücüde yürütülen standartlarda herhangi bir kromatogram gözlenmedi. Bu sonuçlarına göre nonpolar yürütücünün uygun olduğu, polar yürütücünün ise uygun olmadığı görüldü.

BChE ve BTL'nin Olası TO Hidrolizinin TLC Analizi

Lipit hidroliz analizi, pH 8'de, substrat olarak TO ile yapıldı. BChE'nin TO hidroliz sonuçları BTL ile karşılaştırıldı. TO final konsantrasyonu 615 μ M olacak şekilde aktivite ortamı hazırlandı, kontrol (enzim içermeyen) için hidroliz ortamına enzim yerine tampon konuldu. 37°C'de 3 saat inkübasyon sonrası elde edilen lipitler Bligh & Dyer metodu ile

ekstraksiyon yapıldı. Son aşamada organik faz üzerindeki çözücü azot ile tamamen uzaklaştırılıp, 50 µL 2:1 oranında kloroform:metanol (CHCl₃:MeOH) ile çözüldü. Nonpolar yürütücüde 1 saat 15 dakika yürütüldü. Son olarak kurutulup %5 CuSO₄ ve %8 H₃PO₄ içeren çözeltide 10 dk bekletilip, 10 dk 100°C'deki etüvde bekletildi. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde gösterildi (Şekil 4.17).

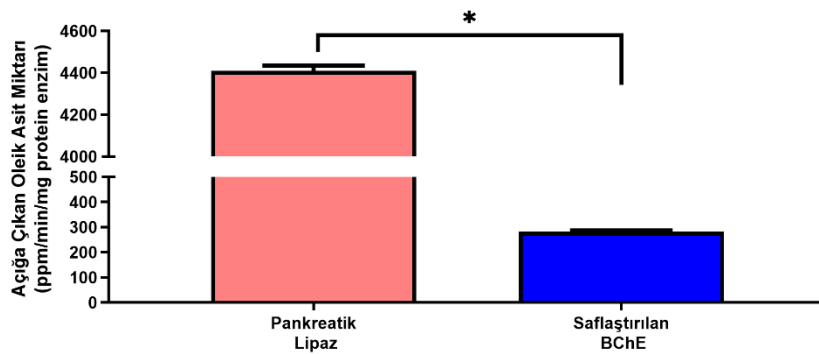


Şekil 4.17. BChE ve BTL enzimlerinin TO hidrolizinin TLC sonuçları

Elde edilen sonuçlara bakıldığında, standartların tek başına yüklenmesi (Şekil 4.16) kromatografi bantlarının iyi ayrıldığı, lipid hidroliz deneyi yapıldığında ise bantların ayrımı iyi olmadığını (Şekil 4.17) gösterdi. Örnekler beraber yüklenip yürütüldüklerinde bantların karıştığı gözlemlendi. Yöntemde bazı değişiklikler yaparak (kullanılan yürütücü içeriği, yüzdesi, örnek uygulama şekli v.b.) TLC deneyi tekrarlandı ancak herhangi bir sonuç alınamadı. Uyguladığımız TLC yönteminin yeteri kadar hassas olmadığı düşüncesi ile hidroliz deneylerine GC-MS ve LC-MS/MS ve fluorometrik yöntemlerle devam edildi.

4.3.2. BChE ve PanL Lipit Hidrolizi Sonuçlarının Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile İncelenmesi

BChE enziminin lipit hidrolizini gerçekleştirip gerçekleştirmediği enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan ürünlerin saptanması üzerinden değerlendirilmek üzere aktivite ortamında açığa çıkan ürünlerin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile incelenmesi hedeflendi. Bu amaçla aktivite ortamı pH 8'de tutulup substrat olarak TO ve 4-mu palmitat kullanılarak lipit hidroliz deneyleri gerçekleştirildi. Aktivite ortamı final konsantrasyonu 615 μM TO ve 167 μM 4-mu palmitat içeriyordu. Kontrol karışımında, enzim tampon ile değiştirildi ve bazı ortamlara BChE inhibitörü (IsoOMPA) ilave edildi. 37°C'de 1 saat inkübasyon sonrası elde edilen lipitlerin ekstraksiyonu Bligh & Dyer metodu ile yapıldı. Son aşamada organik faz üzerindeki çözücü azot ile tamamen uzaklaştırıldı ve 1,6 ml metanolde çözüldü. Hidroliz ortamı ve standartlar, TraceGold TG-5 MS (30x0,25 mm, 0,25 μm) kolonu kullanılarak GC-MS ile analiz edildi. Hidroliz ürünlerinin tanımlanması için Supelco 37 Component FAME Mix standart yağ asit karışımı kullanıldı. Ayrıca TO ve 4-mu palmitat hidrolizinin kantitasyonu için 2-20 ppm metil oleat (CAS No 112-62-9) ve 3-30 ppm metil palmitat (CAS No 112-39-0) standartlarının kalibrasyon grafikleri kullanıldı. Elde edilen sonuçlar şekil 4.18'de gösterildi.



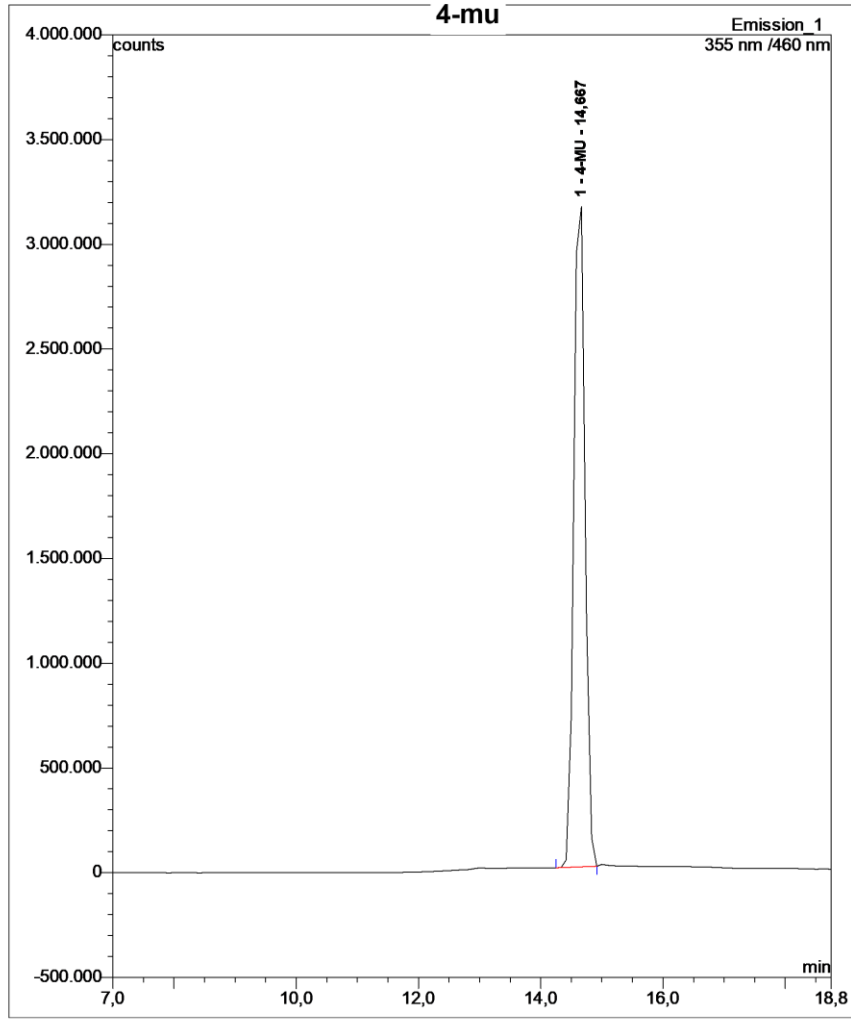
Şekil 4.18. BChE ve PanL'a ait TO hidrolizinin GC-MS analizi sonuçları. Kullanılan TO konsantrasyonu 615 μM .

GC-MS analizlerinde substrat olarak 4-mu palmitat ve ortamda BChE inhibitörü olarak IsoOMPA olduğunda örnekler (girişim yaptığı için) GC-MS ile analiz edilemedi. GC-MS TO hidroliz sonuçlarına göre, Saf BChE PanL'nin %7'si kadar oleik asiti ortama saldığı bulundu.

4.3.3. BChE ve PanL'nin TO ve 4-mu Palmitat Hidrolizinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (HPLC-FLD ve LC-MS/MS) ile Analizi

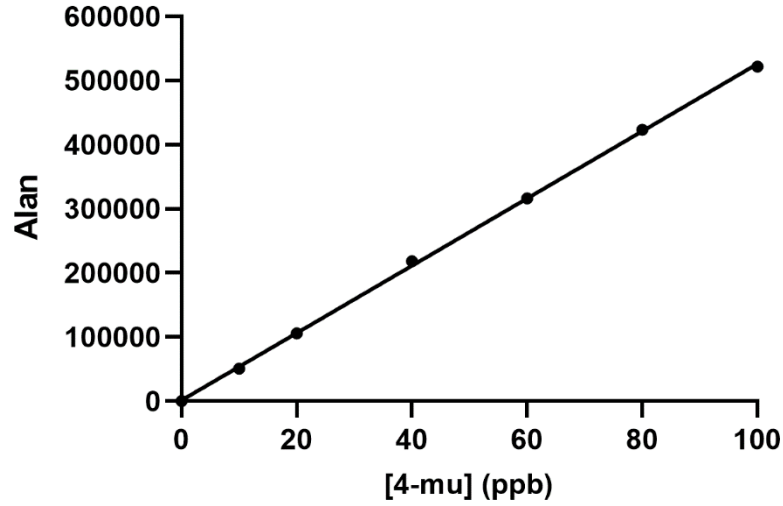
BChE ve PanL'nin 4-mu Palmitat Hidrolizinin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi-Floresans Dedektörü (HPLC-FLD) ile Analizi

BChE'in ve kontrol lipazların lipit hidrolizi, substrat olarak 4-mu palmitat kullanılarak pH 8'de gerçekleştirildi. Kolinesterazların olası lipolitik aktivitesini belirlemek için aktivite ölçümlerinde ConA muamelesinden sonra elde edilen süpernatant ve ConA muamele edilmemiş tic BChE ve Saf BChE kullanıldı. Kontrol ortamında, enzim yerine tampon konuldu ve bazı ortamlara BChE inhibitörü (IsoOMPA) ilave edildi. HPLC cihazında ayrılan substratın analizini alıkonma süresi (rt) 14,67 dakika gelen standart 4-mU piki üzerinden yapıldı (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. 4-mU standardının HPLC'deki alıkonma süresi

4-mu palmitat hidroliz miktarının belirlenmesi için 10-100 ppb 4-mU standartları kalibrasyon grafiği kullanıldı (Şekil 4.20).



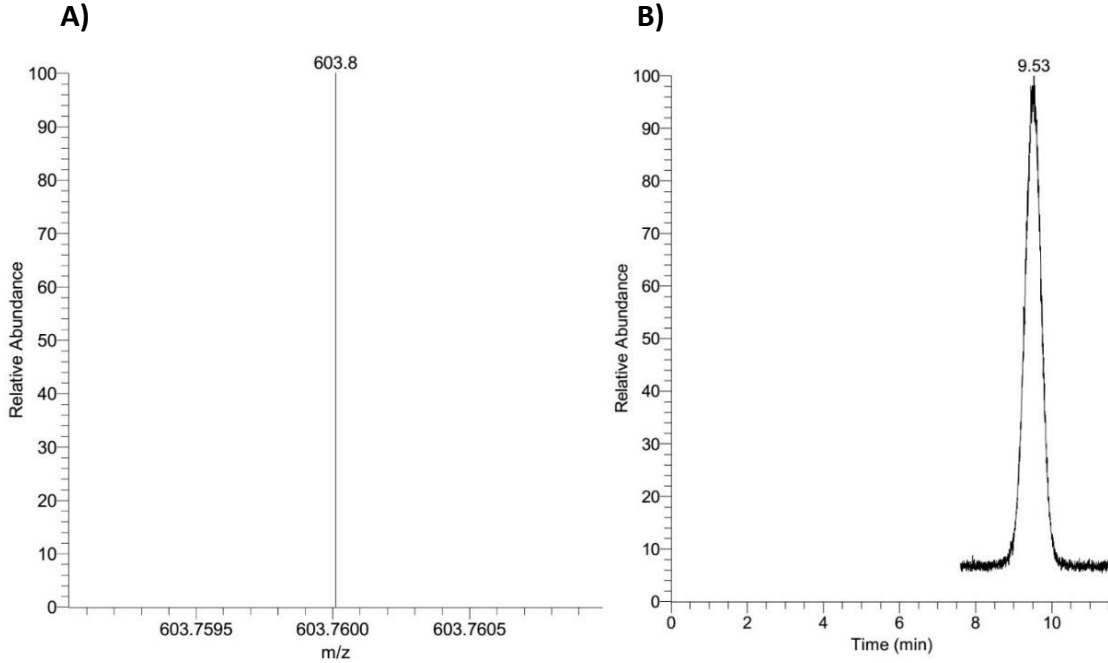
Şekil 4.20. HPLC analizinde kullanılan 10-100 ppb 4-mU standart grafiği

Elde edilen 4-mU doğrusal grafiği ve HPLC’de gözlenen 4-mU standart zirvesi iyi ayrılması ve saptanmasına rağmen, 4-mu palmitat hidrolizi sonrası elde edilen örnekler ortamdaki diğer maddeler ile girişim yaptığı için HPLC analizi yapılamadı.

BChE ve PanL’nin TO Hidrolizinin Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile Analizi

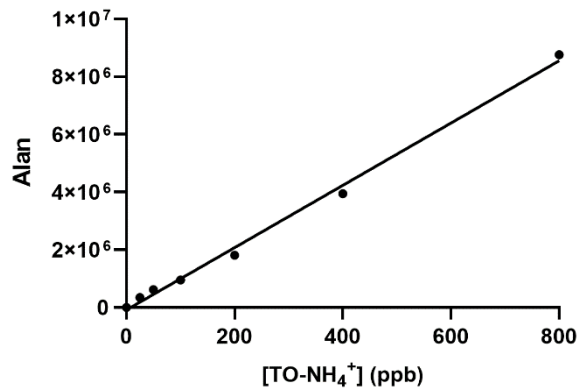
Kontrol lipazlar ile BChE’in trigliserit hidrolizi, substrat olarak TO kullanılarak pH 8’de gerçekleştirildi. TO hidrolizinin incelenmesinde kontrol enzimleri olarak PanL ve BTL, BChE enzimleri olarak da Saf BChE ve tic BChE ile bu iki enzimin ConcanavalinA ile muamelesi sonucu elde edilen süpernatant kullanıldı. Aktivite ortamı, TO hidrolizi için finalde 615 μ M TO (bkz. tablo 3.11) içerdi. Kontrol ortamında, enzim yerine tampon konuldu ve bazı ortamlara BChE inhibitörü (IsoOMPA) ilave edildi. Örnek, ESI iyonizasyon kaynağı kullanılarak, Thermo Ultimate 3000 UHPLC cihazında ayrıldı ve TSQ Quantum Access Max MS/MS dedektörü ile analiz edildi. LC-MS/MS cihazı substratımızın amonyumlu kompleksini seçici olarak tanıyıp (triolein-NH₄⁺, m/z 902,85) analizini

alınma süresi (rt) 9,53 dakika olan diaçilgliserol parçalanma ürünü (m/z 603,8) üzerinden gerçekleştirildi (Şekil 4.21).

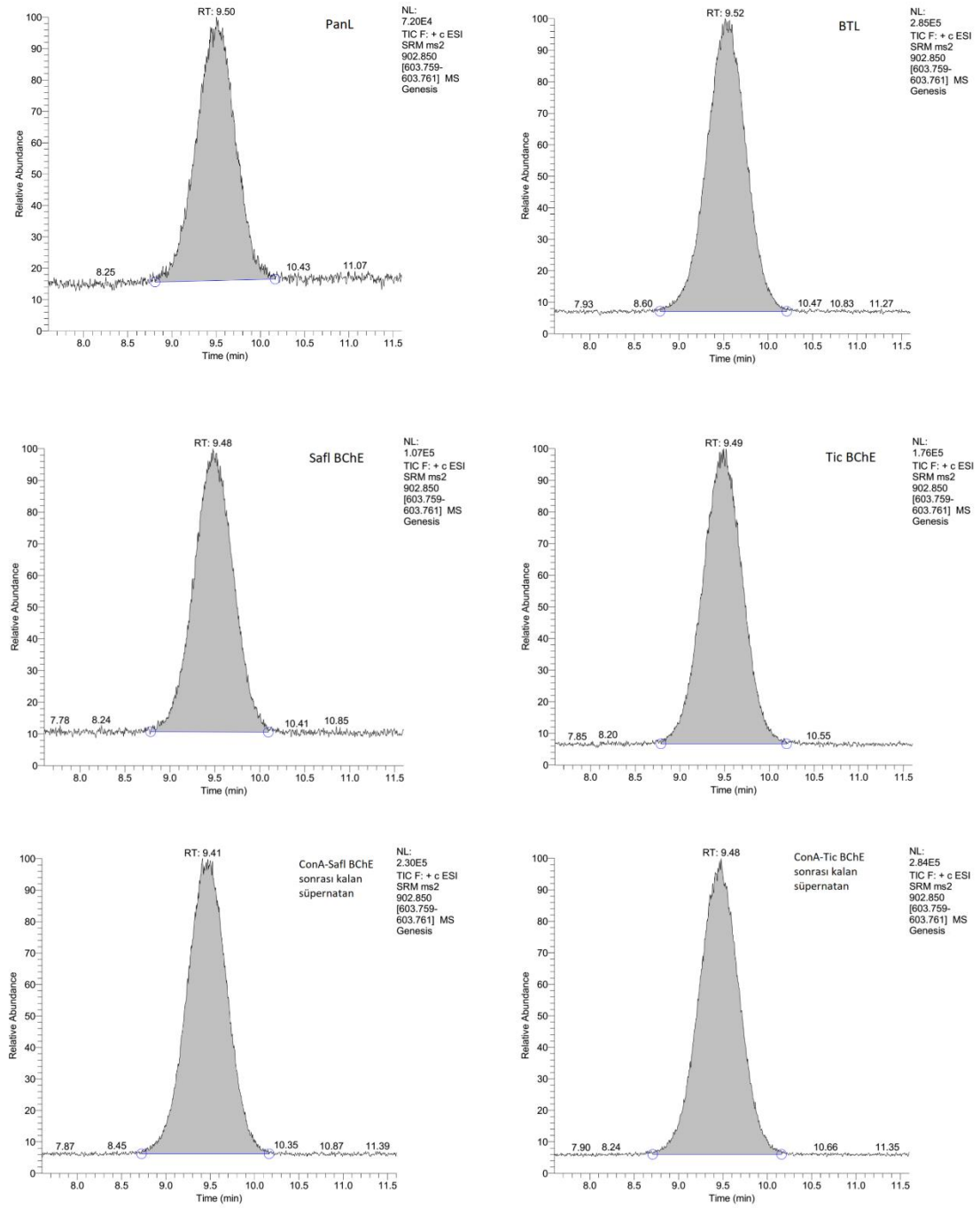


Şekil 4.21. TO'nun LC-MS/MS'deki parçalanma ürünü (A) ve alınma süresi (B)

TO hidroliz sonucunun sayısal olarak belirlenmesi için 25-800 ppb TO-NH₄⁺ standartları kalibrasyon grafiği için kullanıldı (Şekil 4.22).

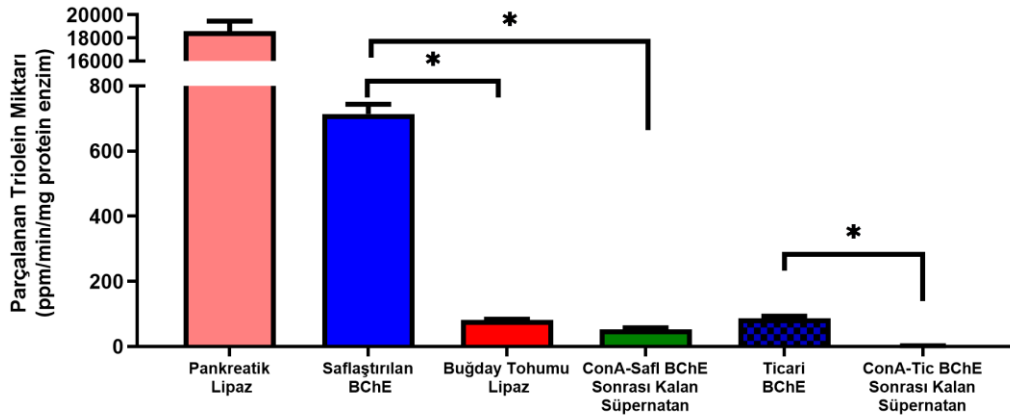


Şekil 4.22. LC-MS/MS analizinde kullanılan 25-800ppb TO-NH₄⁺ standart grafiği



Şekil 4.23. TO hidrolizinin LC-MS/MS analizi ile elde edilen kromatogram sonuçları

Kontrol lipazlar ile BChE enzim örneklerinin finalde substrat olarak 615 μ M TO içeren aktivite ortamında elde edilen LC-MS/MS sonuçları şekil 4.24'teki grafikte gösterildi.



Şekil 4.24. LC-MS/MS ile elde edilen TO hidrolizi sonuçları: Finalde substrat olarak 615 μ M TO içeren aktivite ortamında kontrol lipaz (PanL ve BTL) ile BChE enzimleri ile elde edilen TO hidrolizi sonuçları.

BChE, ConA-BChE sonrası kalan süpernatan ve lipazların TO hidrolizi LC-MS/MS ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, PanL ile diğer gruplar (BTL ve BChE'ler) arasında en az 20 katlık fark olduğunu gösterdi (Şekil 4.24).

Saflaştırılan BChE ile ConA-BChE sonrası kalan supernatan (BChE aktivitesi bulunmayan) arasında anlamlı olarak fark vardı ($p=0,024$). Aynı şekilde ticari BChE ile ConA-BChE sonrası kalan supernatan arasında anlamlı olarak fark vardı ($p=0,050$) (Şekil 4.24).

BTL ile saflaştırılan BChE arasında istatistiksel anlamda fark vardı ($p=0,024$). Saflaştırılan BChE hidrolitik aktivitesi ticari BChE'ye göre daha fazlaydı. Bu sonuçlara göre saflaştırılan insan serum BChE'nin TO'ü hidroliz edebilme yetisi PanL'den hariç en fazla gözükmetedir (Şekil 4.24). Ticari olarak alınan insan eritrosit asetilkolinesterazın ise TO'ü substrat olarak kullanamadığı gözlemlendi. LC-MS/MS ile IsoOMPA'lı örneklerin analizi yapılamadı, IsoOMPA'nın bu analizde girişim yaptığı düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA

Kolinesterazlar (ChE), başlıca kas-sinir kavşaklarında olmak üzere kolinerjik sinapslarda asetilkolin uyarılı nörotransmisyonu sonlandırır (104). Kolinesterazlar, AChE ve BChE, yapısal özellikleri, fizyolojik ve hidrolitik özellikleri bakımından farklılık gösterir. BChE başlıca karaciğerde sentezlenir ve çeşitli ksenobiyotiklerin hidrolizinde rol alır (2). Lipazlar trigliseritler ve çeşitli lipitlerin hidrolizini katalizler (105). Lipazlar ve kolinesterazlar, karboksil esterlerinin hidrolizini katalizlerler. ChE ve lipazların aynı kataliz mekanizmasına sahip olmasının nedeni aktif merkezlerinin çok benzer olmasındandır (5, 41). İnsan PanL aktif merkezinde katalitik üçlü olarak (Serin152, Histidin263 ve Aspartik asit176) yer alırken (4), BChE'nin katalitik merkezinde (Serin198, Histidin438 ve Glutamat325) yer alır. Asetilkolinesterazın da aktif merkezi BChE ile benzerdir (29, 30).

BChE'nin lipit metabolizmasında henüz belirlenmemiş bir rolü olduğu düşünülmektedir. Diyabetik farelerde BChE aktivitesinin kontrollere göre %150 daha fazla olduğu bulunmuştur (7). Yapılan başka bir çalışmada, hiperlipoproteinemik kişilerde BChE aktivitesi artmış, serum HDL seviyeleri ise azalmış olarak bulunmuştur (59). Farelere hiperlipoproteineminin azaltılmasında etkili HMG-KoA redüktaz inhibitörü simvastatin verilmesi, BChE aktivitelerinin azalmasına yol açmıştır (8). Yapılan çalışmalarda, BChE'nin varyantlarının obezite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Plazmada %20 yüksek BChE aktivite gösteren kişilerin, düşük BMI ve az kilolu olduğu (60, 61); %40 düşük (K varyant) BChE aktivite gösteren kişilerin ise yüksek obezite, tip 2 diyabet ve tansiyon insidansı gösterdiği bulunmuştur (62-64). Yakın tarihteki bir araştırmada, BChE geni silinen farelerin, yağ içeriği yüksek diyetle beslenmesi sonucu obez oldukları bulunmuştur (9). Diğer bir çalışmada ise, adipoz dokudaki BChE eksikliğinin hepatik lipit birikimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, BChE geni silinen farelere adeno-ilişkili virüs AAV-BChE gen transferinin obeziteyi geri döndürdüğü, ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir (10). Açlık durumunda mideden kana salgılanan ghrelinin, aktif formunda 3. amino asit serin üzerindeki -OH (hidroksil) grubu 8 karbonlu oktanoik asit ile açillenmiş haldedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, BChE seviyesindeki 100 katlık artışın oktanoil-

ghrelin'deki açıl bağıni hidroliz ederek ghrelin sirkülasyonunu azalttığı görülmüştür (13). Bu sonuçlar lipit metabolizması ile BChE'nin ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Erkeklerde konjuge linoleik asit ve egzersiz uygulamasının kandaki serbest yağ asitleri ve BChE seviyelerinin değiştirdiğini önceki çalışmalarımızda gösterdik (11). Yaptığımız başka bir çalışmada, HepG2 hücrelerine esansiyel yağ asitleri (linoleik asit (LA) ve α -linolenik asit (ALA)) uygulayarak, lipit metabolizmasıyla BChE'nin ilişkisini inceledik. Sonuçlar, BChE ekspresyonun serbest yağ asitleri tarafından düzenlendiğini gösterdi (12).

Tüm bu veriler, kolinesterazların çeşitli lipitler ve fosfolipitleri hidroliz edebileceği teorisini öne sürmemize neden oldu. Daha önce elde edilen sonuçlardan yola çıkarak bu tezde, ChE'nin olası lipolitik aktivitesi incelendi. İncelemeye alınan lipit substratlar arasında trigliserit türevleri, çeşitli yağ asitleri (4-mu palmitat) ve fosfatidilkolin ve sfingomiyelin gibi zar fosfolipitleri yer aldı. Bu amaçla öncelikle insan serumundan BChE enzimi saflaştırıldı. Saflaştırılan BChE enziminin saflaştırma oranı 294 kat olarak saptandı. Herhangi bir safsızlık içerip içermediğini göstermek için nativ PAGE uygulamasını takiben protein boyaması yapıldı. Elde edilen jelin gümüş boyama görüntüsü saflaştırılan BChE'nin tek bant halinde saf olduğunu (bkz. Şekil 4.2.), ticari BChE ise aynı saflığa sahip olmadığını gösterdi.

Klasik Prokainamid afinite kromatografisine ek olarak saflaştırılan enzim ve ticari enzime lektin afinite kromatografisi de uygulandı. Bu uygulamanın amacı saf örneklerde lipaz veya esteraz aktivitesine sahip enzimler var ise onların uzaklaştırılması idi. Nativ PAGE sonrası yapılan aktivite boyaması ve Ellman BChE aktivite ölçümlerine göre, ConA-Safl BChE sonrası kalan süpernatanda herhangi bir BChE aktivitesine rastlanmadı.

Kolinesterazların lipolitik etkisi incelenmeden önce, lipazların kolin substratını (BTCh) hidroliz edip etmediği incelendi. PanL ve BTL ile farklı pH (pH 7,4 ve 8) ve finalde 10-4000 μ M BTCh kullanılarak BChE substratını hidroliz edebilme yetisi incelendi. Elde edilen sonuçlar, lipazların BTCh hidrolizini gerçekleştirmediğini gösterdi.

Kolinesterazların palmitik asit hidrolizini değerlendirmek için enzimatik 4-mu palmitat hidroliz deneyi gerçekleştirildi. 4-mu palmitat hidroliz deneyi, kontrol olarak

BTL'yi ve insan PanL'yi kullanılarak yapıldı. Kontrol lipazlar ve kolinesterazlar için 4-mu palmitat hidrolizine uygun substrat ve pH'yı belirlemek amacıyla farklı pH'larda (7,4 ve 8) geniş aralıkta (15-10000 μ M) 4-mu palmitat substrat kinetiği yapıldı. Elden edilen sonuçlar, lipazların pH 8'de daha yüksek hidrolitik aktivite gösterdiğini işaret etmektedir. Ancak pH 7,4'te incelenen lipazların hidrolitik aktivitesi çok düşük olarak bulunmuştur. Daha önce yapılan bir araştırmada, BChE'nin sıçan barsağı epiteli kript hücrelerinde ve villuslarda varlığını saptamıştır. Enterositlerdeki BChE dağılımı, bu dokuda sentezlenip ekzositoz yolu ile hücreler arası boşluğa salınan ve BChE içeren lipid damlacıkları ile gösterilmiştir (106, 107). Daha önce sıçan BChE saflaştırıp karakterizasyonunu yaptığımız bir araştırmada, pH 7,4' de optimum aktivite gösterip, BChE'nin uzun zincirli aromatik yapıdaki substratları yüksek etkinlikle hidroliz edebildiğini göstermiştik (107). Bu tezde elde ettiğimiz sonuçlarda, lipolitik aktivitesinin varlığı ilk defa incelenen BChE'in hem pH 7,4'te hem de pH 8'de 4-mu palmitat'ı hidroliz edebildiğini bulduk. Bu durum belki de BChE'nin lipazların daha az etkili olduğu pH'larda (destek olarak), kısmi lipit hidrolizini üstlenmesine olanak sağlayabilir. Daha önceki bağırsak çalışmamız da bu durumu desteklemektedir. Diğer taraftan, ticari olarak alınan insan eritrosit asetilkolinesterazın her iki pH'da 4-mu palmitat'ı substrat olarak kullanamadığı gözlemlendi.

Lipazların ve BChE'lerin 4-mu palmitat ile olan enzim-substrat ilişkisini inceleyip kinetik parametrelerini saptamak için, geniş bir substrat aralığında, 1,5-250 μ M, 4-mu palmitat kinetiği yapıldı. Elde edilen verilerden saptanan Km değerleri, bize substrat olarak 4-mu palmitat kullanan enzimlerin afinitesini şu şekilde sıraladı: BTL > saflaştırılan BChE > PanL > ticari BChE. Bu sonuçlara göre saflaştırılan insan serum BChE'nin 4-mu palmitata substrat olarak afinitesinin PanL'den ve ticari BChE'den daha fazla olduğu bulundu. Bu bulgular bizim daha sonra gerçekleştirdiğimiz hidroliz deneylerine kullanacağımız final 4-mu palmitat konsantrasyonlarını belirlemede de belirleyici oldu. İleri çalışmalarda hidroliz deneylerine finalde 85 μ M ile 125 μ M 4-mu palmitat ile devam edildi. Bu konsantrasyonlar BTL ve BChE için elde edilen Km değerlerinin çok üzerinde ve Vm değerlerindeki konsantrasyonlar olup, dolayısıyla hız kısıtlayıcı bir durum

oluşturmaması nedeniyle seçildi. PanL enzimi için ise seçilen bu iki konsantrasyon Km değeri ve düşük substrat konsantrasyonlarına denk gelmektedir.

Elde ettiğimiz 4-mu palmitat sonuçlarına göre, ticari BChE ve saflaştırılan BChE enzimleri 4-mu palmitat'ı hidroliz etmektedir. Ancak, BChE enzimine ek olarak, enzim örneklerinin içeriğinde lipit hidrolizine neden olabilecek bazı safsızlıklar olabileceği düşünüldü. Bu yüzden, ticari ve saflaştırılan BChE enzim örnekleri lektin ile muamele edilip, ortamda BChE kalmadığından (ConA-BChE sonrası kalan supernatan) emin olunduktan sonra, pH 8'de finalde 85 μ M ve 125 μ M 4-mu palmitat ile hidroliz deneyi tekrarlandı. Bu deneylere paralel olarak spesifik BChE inhibitörü ile deneyler de gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, PanL'nin lipolitik aktivitesinin BTL ve BChE'den anlamlı olarak farklı olduğunu gösterdi ($p < 0,001$).

BTL ile saflaştırılan BChE'in 4-mu palmitat hidrolitik aktiviteleri arasında istatistiksel anlamda herhangi bir fark bulunamadı. Saflaştırılan BChE hem IsoOMPA'lı saflaştırılan BChE hem de ConA-BChE sonrası kalan süpernatandan anlamlı olarak farklıydı ($p < 0,001$). Ticari BChE ise IsoOMPA'lı ticari BChE göre yine anlamlı olarak farklı aktivite gösterdi ($p = 0,014$). Saflaştırılan BChE'nin 4-mu palmitat hidrolitik aktivitesi ve spesifik inhibitörü olarak IsoOMPA kullanıldığında elde edilen hidrolitik fark, ticari BChE'ye göre daha fazlaydı. Bu bulgu tic BChE enzim preparatında daha farklı enzimlerinde var olduğunu ve ticari olarak alınan preparatın saflaştırdığımız enzim kadar saf olmadığını düşündürdü. 4-mu palmitat hidrolizinin 2-8 saat zamana bağlı kinetik sonuçları da, yukarıda elde edilen sonuçlar ile paraleldi.

ConA-Safl BChE süpernatanın lipolitik aktivitesi incelendiğinde, hem 85 μ M hem de 125 μ M 4-mu palmitatı hidroliz etme yetisinin çok düşük düzeyde olduğu gözlemlendi. Bu bulgu saflaştırdığımız enzim ile elde edilen 4-mu palmitat hidrolitik aktivitesinin BChE'a ait olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmalar ticari olarak alınan insan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak da gerçekleştirildi. Ancak asetilkolinesterazın 4-mu palmitat'ı substrat olarak kullanamadığı gözlemlendi.

BChE eksikliği oluşturulan erkek farelerde yüksek-yağlı diyetin, karaciğerde lipit birikimine ve adipoz doku büyümesine yol açtığı son yıllarda yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (10). Açlık durumunda mideden kana salgılanan ghrelinin, aktif formunda 3. amino asit serin üzerindeki -OH (hidroksil) grubu 8 karbonlu oktanoik asit ile açillenmiş haldedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, BChE'nin "oktanoil-ghrelin"deki açıl bağına hidroliz ederek inaktif formu "desaçil-ghrelin"e dönüştürdüğü gösterilmiştir (13). ChE'nin lipit hidrolizi yapabileceğini teorisini ortaya koymamızın diğer bir nedeni ise lipazlar ve kolinesterazların aynı enzim alt kategorisinde yer almasıdır (karboksilik ester hidrolazlar). Lipazlar ve kolinesterazlar, karboksil esterlerinin hidrolizini katalizlemektedir. ChE ve lipazların aynı mekanizmayı katalizmesinin nedeni aktif merkezlerinin çok benzer olmasındandır. İnsan PanL aktif merkezinde yer alan kataliz bölgesinde, BChE enzimidaki katalitik üçlüsünden farkı glutamat yerine aspartat amino asidi yer almasıdır (4, 31). Bu sonuçlar ve lipazların katalitik bölgesinin BChE ile benzemesi, lipit metabolizması ile BChE'nin ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Lipit metabolizmasının ana bileşenlerinden trigliseridlerin BChE tarafından hidroliz edilebileceğini düşündüğümüz için lipit hidroliz deneylerine trigliseritler ile devam ettik.

Enzimatik hidroliz tahlilinin yanı sıra, lipit hidrolizini göstermek için TLC uygulandı. Optimizasyon çalışmaları sonucunda, 4-mu palmitat, TO ve oleik standartları için uygun hareketli faz (yürütücü) karışımı bulunmuştur. Lipit hidroliz deneyi yapıldığında ise bantların ayrımı iyi olmadığını gösterdi. Örnekler beraber yüklenip yürütüldüklerinde bantların karıştığı gözlemlendi. Yöntemde bazı değişiklikler yaparak (kullanılan yürütücü içeriği, yüzdesi, örnek uygulama şekli v.b.) TLC deneyi tekrarlandı ancak hidroliz için kullanılan tüm enzimlerin hiçbiri için enzimatik reaksiyon ürünlerini anlamlı olarak gösterebilen bir sonuç alınamadı. TLC metodunun hedeflenen sonucu saptamak için yeteri kadar hassas olmadığı kanısı ile hidroliz deneyleri GC-MS ve LC-MS/MS ve fluorometrik yöntemler üzerinden devam edildi.

BChE, ConA-BChE sonrası kalan süpernatant ve lipazların TO hidrolizi LC-MS/MS ile analiz edildi. Lipaz enzimleri ile BChE enzimlerinin TO asit hidrolitik aktiviteleri

karşılaştırıldığında PanL'nin diğer tüm enzimlerden anlamlı olarak yüksek bir TO hidrolitik aktivitesine (18593 ppm/min/mg protein enzim) sahip olduğu gözlemlendi. Kontrol enzimi olarak kullanılan ikinci lipaz olan BTL'nin ise PanL aktivitesine kıyasla daha düşük bir TO hidrolizi yapabildiği bulundu (80,7 ppm/min/mg protein enzim). TO hidroliz yetisi olduğu bugüne dek gösterilmemiş olan BChE enziminin aktivite değeri (714,3 ppm/min/mg protein enzim), BTL'ye ait TO hidrolitik aktive değerinden daha yüksekti.

BChE enzimlerinin TO hidrolizi yetilerinin incelemesi ise Saf BChE enziminin tic BChE enziminden çok daha yüksek bir TO hidroliz aktivitesine sahip olduğunu gösterdi ($p=0,024$). Bu bulgu laboratuvarımızda saflaştırdığımız enzimin yüksek derecede saf olmasından dolayı olabilir. Ayrıca Saf BChE'nin, ConA-Saf BChE süpernatant (51,8 ppm/min/mg protein enzim) ile elde edilen TO hidrolitik aktivitesi arasında anlamlı olarak fark olduğu ($p=0,024$) bulundu. Saflaştırılmış BChE enziminin ConA ile muamele sonrası kalan süpernatantının aktivitesi çok düşüktür. Benzer şekilde, Saf BChE ve BTL arasında istatistiksel anlamda fark olduğu saptanmıştır ($p=0,024$).

Tic BChE enzimi ile gerçekleştirilen TO hidrolizi sonuçları incelendiğinde ise Tic BChE (86,5 ppm/min/mg protein enzim) ile ConA-Tic BChE süpernatant arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmektedir ($p=0,050$). Ayrıca kontrol enzimi olarak kullanılan BTL'den daha yüksek bir TO hidroliz hızına sahip olduğu gözlenmektedir ($p=0,400$). Bu bulgu bize laboratuvarımızda saflaştırılan BChE enzime karşın göreceli olarak daha az saf olmasına rağmen tic BChE enziminin de TO hidrolizi yetisine sahip olduğunu göstermektedir.

TO hidrolizinin LC-MS/MS analizi ayrıca insan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak da gerçekleştirildi. Ancak asetilkolinesterazın TO'ü substrat olarak kullanamadığı gözlemlendi. LC-MS/MS ile IsoOMPA'lı örneklerin analizi yapılamadı, IsoOMPA'nın bu analizde girişim yaptığı düşünülmektedir. Elde edilen LC-MS/MS TO hidroliz sonuçları, spektrometrik 4-mu palmitat hidroliz sonuçları ile BTL hariç, paralel seyretmektedir.

PanL, BTL, BChE'ler ve Con A-BChE sonrası kalan süpernatantların TO hidroliz sonuçları incelendiğinde, enzimlerin triolein hidroliz hızları şu şekilde sıralanır: PanL > Saf BChE > tic BChE > BTL > ConA-Saf BChE süpernatant > ConA-Tic BChE süpernatant. Bu sonuçlara göre Saf BChE'nin TO'ü hidroliz edebilme hızı PanL enziminden daha düşük olmasına rağmen diğer tüm enzimlerden daha yüksek olduğu saptanmıştır.

TO hidrolizi GC-MS ile de analiz edildi. 4-mu palmitat ve IsoOMPA'lı örnekler (girişim yaptığı için) GC-MS ile analiz edilemedi. GC-MS TO hidroliz sonuçlarına göre, saflaştırılan BChE PanL'nin %7'si kadar oleik asiti ortama saldığı bulundu. Önceki GC-MS denemelerinde, örnekler GC-MS ile analizi öncesi türevlendirme işlemine tabi tutulmuştu ancak türevlendirme işlemi TO'nun hidrolizi ile sonuçlandığı için, bu denemelerde örnekler türevlendirilmeden GC-MS ile analizi gerçekleştirildi. LC-MS/MS sonuçları ile GC-MS TO hidroliz sonuçları, saflaştırılan BChE ve PanL sonuçları benzer patern gösterdi.

BChE, ConA-BChE sonrası kalan süpernatant ve lipazların 4-mu palmitat hidrolizi HPLC-FLD ile analiz edildi. Standart 4-mU grafiğı elde edilmesine rağmen, 4-mu palmitat hidrolizi sonrası elde edilen örneklerin HPLC analizi yapılamadı. Bunun sebebi, ortamdaki diğer maddeler HPLC'de girişim yaptığı için veya Bligh & Dyer metoduna göre ekstraksiyon yapıldığında, hidroliz ürünlerinin organik faz yerine inorganik fazda olmasından olabilir. Deneylerin ekstraksiyon yapılmadan veya Bligh & Dyer ekstraksiyonu yapıldıktan sonra tekrarlanması gerekmektedir.

4-mu palmitat ve TO hidrolizine ek olarak BChE'nin, PLA₂ tarafından hidroliz edilen fosfolipidi (fosfatidilkolin) hidroliz etme kapasitesini inceledik. Sonuçlar, ticari BChE'nin kısmi PLA₂ aktivitesi olduğunu gösterdi. Spesifik BChE inhibitörü olan IsoOMPA yokluğunda ticari BChE'nin daha yüksek PLA₂ aktivitesi gösterdiği bulundu. Ancak yapılan deney tekrarı sayısının azlığı nedeni ile elde edilen veriler kısıtlı olduğu için istatistiksel analiz gerçekleştirilemedi.

Ayrıca, BChE'nin bir başka fosfolipit olan sfingomiyelin hidrolitik aktivitesi olup olmadığını belirlemek amacı ile sfingomiyelinaz aktivitesi ölçüldü. Saflaştırılan BChE enziminin sfingomiyelinaz aktivitesine sahip olmadığını bulundu.

Daha önce yaptığımız çalışmada sedanter genç erkeklere konjuge linoleik asit (CLA) içeren bir diyet ve beraberinde egzersiz uygulamıştık (11). Çalışma sonucunda, hem egzersiz hem de egzersiz ile beraber CLA diyetinin serum BChE aktivitelerinde düşüşün yanında artan post-heparin lipoprotein lipaz (LPL) aktivitesi ve insülin duyarlılığı rapor edilmişti. Karaciğerde sentezlenen VLDL miktarında da paralel düşüş gözlemlendiğinden obezite sınırında olan bu popülasyonda, BChE'nin sentetik kapasitenin belirteci olarak değerlendirilebileceği öne sürülmüştü. Literatürdeki sonuçlar bu bulgumuzu desteklemektedir. Serum BChE aktivitesi serum trigliserit, total kolesterol, açlık insülini ve insülin direnci seviyeleri ile güçlü pozitif korelasyon gösterirken, yüksek yoğunluklu lipoprotein-kolesterol ile negatif korelasyon gösterir (75-77, 84). Ayrıca yaptığımız çalışmada serum lipoprotein lipaz ve BChE aktivite seviyeleri zıt bir ilişkide olduğu ve leptin düzeyleri ile de anlamlı olarak pozitif korelasyon gösterdiğini saptamıştık. Ghrelin ile leptin arasında bir denge olduğu bilinmektedir (108). Tüm bu sonuçlar, BChE'nin lipid metabolizmasında rolü olduğunu kesin olarak göstermektedir. Bu tezde yaptığımız bu çalışma ile temel kanıt olarak BChE'nin lipid hidrolizini yapabildiğini 2 tane substrat (Trioleik asit ve 4-mu palmitat) ile gösterdik.

AChE'nin aktif merkezinde yer alan on dört aromatik amino asitten farklı olarak, BChE aktif merkezi altı aromatik amino asit içermektedir. AChE'ye göre BChE daha büyük substrat bağlama bölgesi içermektedir (14, 31, 32). Dolayısıyla bu durum BChE'nin, elde ettiğimiz sonuçlarda olduğu gibi daha büyük substratları hidroliz etmesine olanak sağladı. Elde ettiğimiz sonuçlarda BChE'nin aksine, AChE'nin TO ve 4-mu palmitat'ı substrat olarak kullanamadığı gözlemlendi.

Son zamanlarda, 18-22 karbon zincirli doymamış yağ asitlerinin ACh analogları keşfedildi. Normal insan plazması ve idrarında, araşidonik, dokosaheksaenoik, oleik, linoleik, linolenik ve palmitik yağ asidi kalıntılarına sahip kolin türevleri bulunmuştur (109). Yapılan başka bir çalışma, araşidonik kolin ve 18-22 karbon zincirli doymamış yağ asitleri kolin analoglarının nöronal ve kas tipi nikotinik reseptörlerin inhibitörleri olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu asetilkolin analogların, AChE ve BChE'yi kısmen inhibe

ettikleri bulunmuştur. Sonuç olarak araşidonöilkolin ve 18-22 karbon zincirli doymamış yağ asitleri analoglarının asetilkolin sinyal iletiminin endojen modülatörleri olabileceği sonucuna varmışlar (110). Çalışmada ayrıca araşidonöilkolinin BChE tarafından kısmi hidrolizi de gösterilmiştir.

En yaygın nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer'da lipit metabolizması bozulmuştur (27, 111). Alzheimer hastalığı (AD)'nda artan kolinesteraz aktivitesi, azalmış kolin seviyeleri ve membran fosfolipitlerinin değişimi ayırt edici özelliklerindedir (6, 112, 113).

Araştırmamız sonuçlarına göre, BChE kısmi PLA₂ aktivitesi de içermektedir, ancak BChE'nin fosfokolin hidroliz yeteneğine sahip olup olmadığını belirtmek için daha fazla deneyin gerçekleştirilmesine ihtiyaç vardır. Bulgularımız BChE'nin 4-mu palmitat ve trioleik asidi hidroliz edebileceğini göstermektedir. PanL ve katalitik merkezi son yıllarda keşfedilen BTL'nin (114) aktif merkezinde katalitik üçlüsü, BChE'nin katalitik merkezindeki üçlü ile benzeşmektedir (4-6). Her üç enzim 4-mu palmitat ve TO reaksiyonunu katalizlemesine rağmen, substratları ürüne dönüştürme hızları farklılık göstermiştir.

Alzheimer hastalığında artan kolinesteraz aktivitesi hastalıkta gözlenen membran bozuklukları ile ilişkili olabilir. Alzheimer hastalığında belirgin olarak artan ChE, BChE'dir. Azalan membran lipitlerinde BChE'nin henüz belirlenmemiş bir rolü olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda saptanan TO ve palmitat hidroliz yetisi bu hastalıkta gözlenen membran kayıplarına BChE'nin katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca lipolitik aktivite membran lipitlerinin hidrolizi sonucu düşük seviyede lipit mediatör üretimi/salınımına da katkı sağlayabilir. Bu durum kolinerjik sinyal iletiminin modülasyonu üzerinde etki yaratabilir.

BChE'nin lipolitik aktivitesi oldukça farklı işlevleri olan bu enzimin neden bu denli farklı dokularda bulunduğu dair yeni açıklamalar sunulmasına olanak sağlamaktadır. Literatürde varolan ve daha önce BChE'nin abdominal/viseral yağlanma ile ilişkili parametreler olan korelasyonu gösterdiğimiz çalışmalarımızla beraber son bulgularımız

değerlendirildiğinde BChE'nin lipit metabolizmasında merkezi bir rolü olduğunu söyleyebiliriz. Açlık/tokluk hormonları olarak adlandırılan ghrelin/leptin dengesine BChE'nin hidroliz yetisi ile olan katkısı önceki çalışmada saptanan leptin seviyeleri ile olan pozitif korelasyon bulgularımızla desteklenmiştir (11, 108). Ayrıca daha önce saptadığımız ince barsak BChE'nin yerleşimi ve özellikleri (107), bu çalışmada tanımlanan lipit hidroliz yetisi BChE'nin barsakta lipit emilime bu özelliği ile katkıda bulunabileceğini düşündürür.

Bildiğimiz kadarıyla bu çalışmamız literatürdeki ilk çalışma olması açısından, büyük bir öneme sahiptir. Bu araştırma, BChE'nin lipit metabolizması ile olan ilişkisine, lipit hidroliz rolüne ve Alzheimer Hastalığı'ndaki lipit metabolizmasına ışık tutacaktır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bulgularımız BChE'nin 4-mu palmitat ve trioleik asidi hidroliz edebileceğini göstermektedir. Ancak BChE'nin lipit metabolizması ve lipit hidrolizindeki rolünü daha fazla aydınlatmak için, sonuçlarımızı destekleyecek başka deneyler yapılması gerekmektedir. Aşağıda yapılması gereken deneylerden bazıları kategorize edilmiştir.

Hidroliz ve kinetik çalışmalar için:

- Lipolitik aktivitesi gösterilen 4-mu palmitat ve TO'nun BChE ile substrat modelleme (docking) çalışmaları yapılabilir.
- BChE hidrolitik aktivitesi gösterilen 4-mu palmitat ve TO'nun yanında oleik asit kinetiği yapılabilir.
- Daha önce BChE ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz linoleik asit ve α -linolenik asit kinetiğine (hidrolitik ve inhibitör olarak) bakılabilir.
- Bu tezde yapılan deneylerden fosfatidilkolin, sfingomiyelin ve PLA₂ hidrolitik aktiviteleri tekrarlanabilir.
- Tüm bu çalışmalar doğal tip insan BChE plazmidi çoğaltılıp bundan elde edilen enzim ile tekrarlamak gerekebilir.
- Bunlara ek olarak, standart grafiği elde edilen ancak örneklerde girişim olduğu için analiz edilemeyen, 4-mu palmitatın HPLC-FLD ile analizi yeniden yapılabilir.

Lipit metabolizması çalışmaları için:

- İn vivo çalışmalar için, yağ metabolizması ile ilişkili adipoz doku hücrelerinde BChE ekspresyon düzeyleri değiştirilerek (transfeksiyon ile arttırılarak veya nakavt ile ekspresyonu susturularak) yağ metabolizmasındaki özellikle yağ miktarındaki değişikliklere bakılabilir.
- Lipoprotein metabolizmasındaki BChE'nin etkisi, özellikle bu yollarda yer alan enzimler ve Apolipoprotein C-3 gibi proteinlerin BChE ilişkisi aydınlatılabilir.

Kolinerjik sistem ve sinir sistemi çalışmaları için:

- Kolinesterazların fosfolipit ve kolin metabolizması arasındaki korelasyonunu araştırılabilir. Bunun için kolinesterazlar ve fosfolipit metabolizması (kolin kinaz, açil transferaz ve PLA₂ gibi) enzimleri AD hastaları veya AD ilişkili hücre-fare modellerinde çalışılabilir.
- Yağ dokusundan zengin olan sinir hücrelerinde kolinerjik aktiviteye ek olarak bu lipolitik aktivitenin etkisi incelenebilir (Glia ve nöronlarda ayrı ayrı ve ko-kültür ortamında).
- Son yıllarda keşfedilen 18-22 karbon zincirli doymamış yağ asitleri kolin analoglarının hidrolitik etkisine bakılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, Quinn B. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiology of disease*. 2002;9(1):88-93.
2. Rodrigues SR, Caldeira C, Castro BB, Gonçalves F, Nunes B, Antunes SC. Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2011;99(2):181-8.
3. Nomura DK, Casida JE. Lipases and their inhibitors in health and disease. *Chemico-biological interactions*. 2016;259:211-22.
4. Winkler F, d'Arcy A, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*. 1990;343(6260):771-4.
5. Nguyen PTV, Huynh HA, Truong DV, Tran T-D, Vo C-VT. Exploring Aurone Derivatives as Potential Human Pancreatic Lipase Inhibitors through Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *Molecules*. 2020;25(20):4657.
6. Soreq H, Podoly E, Gok M. Cholinesterases. In: Offermanns S, Rosenthal W, editors. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 1-8.
7. Kutty K, Huang S, Kean K. Pseudocholinesterase in obesity: hypercaloric diet induced changes in experimental obese mice. *Experientia*. 1981;37(11):1141-2.
8. Van Lith H, Meijer G, Haller M, Beynen A. Serum pseudocholinesterase activity in rabbits fed simvastatin. *Biochemical pharmacology*. 1991;41(3):460-1.
9. Li B, Duysen EG, Lockridge O. The butyrylcholinesterase knockout mouse is obese on a high-fat diet. *Chemico-biological interactions*. 2008;175(1):88-91.
10. Chen VP, Gao Y, Geng L, Stout MB, Jensen MD, Brimijoin S. Butyrylcholinesterase deficiency promotes adipose tissue growth and hepatic lipid accumulation in male mice on high-fat diet. *Endocrinology*. 2016;157(8):3086-95.
11. Bulut S, Bodur E, Colak R, Turnagol H. Effects of conjugated linoleic acid supplementation and exercise on post-heparin lipoprotein lipase, butyrylcholinesterase, blood lipid profile and glucose metabolism in young men. *Chemico-biological interactions*. 2013;203(1):323-9.
12. Gok M, Zeybek ND, Bodur E. Butyrylcholinesterase expression is regulated by fatty acids in HepG2 cells. *Chemico-biological interactions*. 2016;259:276-81.

13. Schopfer LM, Lockridge O, Brimijoin S. Pure human butyrylcholinesterase hydrolyzes octanoyl ghrelin to desacyl ghrelin. *General and comparative endocrinology*. 2015;224:61-8.
14. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001;2(4):294-302.
15. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & therapeutics*. 2015;148:34-46.
16. Lockridge O, Norgren Jr RB, Johnson RC, Blake TA. Naturally occurring genetic variants of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and their potential impact on the risk of toxicity from cholinesterase inhibitors. *Chemical research in toxicology*. 2016;29(9):1381-92.
17. Silman I. The multiple biological roles of the cholinesterases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2020.
18. Hall ZW. Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. *Journal of neurobiology*. 1973;4(4):343-61.
19. Perrier AL, Massoulié J, Krejci E. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*. 2002;33(2):275-85.
20. Chen VP, Xie HQ, Chan WK, Leung KW, Chan GK, Choi RC, et al. The PRiMA-linked cholinesterase tetramers are assembled from homodimers hybrid molecules composed of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase dimers are up-regulated during development of chicken brain. *Journal of biological chemistry*. 2010;285(35):27265-78.
21. Dudai Y, Herzberg M, Silman I. Molecular structures of acetylcholinesterase from electric organ tissue of the electric eel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973;70(9):2473-6.
22. Massoulié J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*. 2002;11(3):130-43.
23. Chen VP, Luk WK, Chan WK, Leung KW, Guo AJ, Chan GK, et al. Molecular assembly and biosynthesis of acetylcholinesterase in brain and muscle: the roles of t-peptide, FHB domain, and N-linked glycosylation. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2011;4:36.

24. Schopfer LM, Lockridge O. Tetramer-organizing polyproline-rich peptides differ in CHO cell-expressed and plasma-derived human butyrylcholinesterase tetramers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2016;1864(6):706-14.
25. Leung MR, van Bezouwen LS, Schopfer LM, Sussman JL, Silman I, Lockridge O, et al. Cryo-EM structure of the native butyrylcholinesterase tetramer reveals a dimer of dimers stabilized by a superhelical assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(52):13270-5.
26. Boyko KM, Baymukhametov TN, Chesnokov YM, Hons M, Lushchekina SV, Konarev PV, et al. 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD. *Biochimie*. 2019;156:196-205.
27. Soreq H. Checks and balances on cholinergic signaling in brain and body function. *Trends in neurosciences*. 2015;38(7):448-58.
28. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(2):549-57.
29. Sussman JL, Harel M, Frolov F, Oefner C, Goldman A, Toker L, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 1991;253(5022):872-9.
30. Harel M, Sussman J, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulie J, et al. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(22):10827-31.
31. Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003;4(2):131-8.
32. Vellom DC, Radic Z, Li Y, Pickering NA, Camp S, Taylor P. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*. 1993;32(1):12-7.
33. Masson P, Xie W, Froment M-T, Levitsky V, Fortier P-L, Albaret C, et al. Interaction between the peripheral site residues of human butyrylcholinesterase, D70 and Y332, in binding and hydrolysis of substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1999;1433(1-2):281-93.

34. Dale HH. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1914;6(2):147-90.
35. Loewi O. Uber humorale Ubertragbarkeit der Herznervenwirkung. XI. Uber den Mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin. *Pflug Arch Ges Physiol*. 1926;214:689-96.
36. Jope RS. High affinity choline transport and acetylCoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. *Brain Research Reviews*. 1979;1(3):313-44.
37. Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annual review of neuroscience*. 1993;16(1):403-43.
38. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*. 2009;89(1):73-120.
39. de Azua IR, Gautam D, Jain S, Guettier J-M, Wess J. Critical metabolic roles of β -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors. *Life sciences*. 2012;91(21-22):986-91.
40. Simon J, Atweh S, Kuhar M. Sodium-dependent high affinity choline uptake: a regulatory step in the synthesis of acetylcholine. *Journal of neurochemistry*. 1976;26(5):909-22.
41. Rosenberry TL, Brazzolotto X, Macdonald IR, Wandhammer M, Trovaslet-Leroy M, Darvesh S, et al. Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study. *Molecules*. 2017;22(12):2098.
42. Mesulam M-M, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen E, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *neuroscience*. 2002;110(4):627-39.
43. Manoharan I, Boopathy R, Darvesh S, Lockridge O. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clinica chimica acta*. 2007;378(1-2):128-35.
44. Krupka R. Indophenyl acetate and acetylcholinesterase: Binding of a non-specific substrate on the margin of the active center. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*. 1975;410(1):120-9.

45. Pohanka M, Hrabínová M, Kuca K, Simonato J-P. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(4):2631-40.
46. Rosenberry TL, Bernhard SA. Catalysis by acetylcholinesterase. Synergistic effects of inhibitors during the hydrolysis of acetic acid esters. *Biochemistry*. 1972;11(23):4308-21.
47. Stojan J, Ladurantie C, Siadat OR, Paquereau L, Fournier D. Evidence for subdomain flexibility in *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase. *Biochemistry*. 2008;47(20):5599-607.
48. Masson P, Adkins S, Gouet P, Lockridge O. Recombinant human butyrylcholinesterase G390V, the fluoride-2 variant, expressed in Chinese hamster ovary cells, is a low affinity variant. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(19):14329-41.
49. Masson P, Froment MT, Gillon E, Nachon F, Lockridge O, Schopfer LM. Kinetic analysis of effector modulation of butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of acetanilides and homologous esters. *The FEBS Journal*. 2008;275(10):2617-31.
50. Zemach L, Segal D, Shalitin Y. The interaction of amiloride with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *FEBS letters*. 1990;263(1):166-8.
51. Desire B, Saint-Andre S. Accelerating effect of heterocyclic quaternary ammonium salts on neutral ester hydrolysis by acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase (author's transl). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1981;659(2):267-82.
52. Durán R, Cerveñansky C, Karlsson E. Effect of fasciculin on hydrolysis of neutral and choline esters by butyrylcholinesterase, cobra venom and chicken acetylcholinesterases. *Toxicon*. 1996;34(8):959-63.
53. Masson P, Froment M-T, Fortier P-L, Visicchio J-E, Bartels CF, Lockridge O. Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1998;1387(1-2):41-52.
54. GEORGE ST, BALASUBRAMANIAN AS. The aryl acylamidases and their relationship to cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver. *European Journal of Biochemistry*. 1981;121(1):177-86.

55. Lynch TJ, Mattes CE, Singh A, Bradley RM, Brady RO, Dretchen KL. Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase. *Toxicology and applied pharmacology*. 1997;145(2):363-71.
56. Lockridge O, Mottershaw-Jackson N, Eckerson HW, La Du BN. Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1980;215(1):1-8.
57. Williams A, Zhou S, Zhan C-G. Discovery of potent and selective butyrylcholinesterase inhibitors through the use of pharmacophore-based screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2019;29(24):126754.
58. Kalow W, Staron N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1957;35(12):1305-20.
59. Jain R, Kutty KM, Huang S-N, Kean K. Pseudocholinesterase/high-density lipoprotein cholesterol ratio in serum of normal persons and of hyperlipoproteinemics. *Clinical chemistry*. 1983;29(6):1031-3.
60. Chautard-Freire-Maia E, Primo-Parmo S, Picheth G, Lourenço M, Vieira M. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Human heredity*. 1991;41(5):330-9.
61. Alcantara VM, Rodrigues LC, Oliveira LC, Chautard-Freire-Maia EA. Association of the CHE2 locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. *Human biology*. 2001:587-95.
62. Hashim Y, Shepherd D, Wiltshire S, Holman R, Levy J, Clark A, et al. Butyrylcholinesterase K variant on chromosome 3 q is associated with Type II diabetes in white Caucasian subjects. *Diabetologia*. 2001;44(12):2227-30.
63. Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Entezami H, Kharrazi H, Bahrhemand F, Tavilani H, et al. Butyrylcholinesterase K variants increase the risk of coronary artery disease in the population of western Iran. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2008;68(2):123-9.
64. Lima JK, Leite N, Turek LV, Souza RLR, da Silva Timossi L, Osiecki ACV, et al. 1914G variant of BCHE gene associated with enzyme activity, obesity and triglyceride levels. *Gene*. 2013;532(1):24-6.
65. Sklan EH, Lowenthal A, Korner M, Ritov Ya, Landers DM, Rankinen T, et al. Acetylcholinesterase/paraoxonase genotype and expression predict anxiety

- scores in Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics study. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101(15):5512-7.
66. Podoly E, Shalev DE, Shenhar-Tsarfaty S, Bennett ER, Assayag EB, Wilgus H, et al. The Butyrylcholinesterase K Variant Confers Structurally Derived Risks for Alzheimer Pathology♦. *Journal of biological chemistry*. 2009;284(25):17170-9.
 67. Shaked I, Meerson A, Wolf Y, Avni R, Greenberg D, Gilboa-Geffen A, et al. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity*. 2009;31(6):965-73.
 68. Assayag EB, Shenhar-Tsarfaty S, Ofek K, Soreq L, Bova I, Shopin L, et al. Serum cholinesterase activities distinguish between stroke patients and controls and predict 12-month mortality. *Molecular medicine*. 2010;16(7-8):278-86.
 69. Shenhar-Tsarfaty S, Assayag EB, Bova I, Shopin L, Fried M, Berliner S, et al. Interleukin-6 as an early predictor for one-year survival following an ischaemic stroke/transient ischaemic attack. *International Journal of Stroke*. 2010;5(1):16-20.
 70. Shenhar-Tsarfaty S, Bruck T, Bennett ER, Bravman T, Assayag EB, Waiskopf N, et al. Butyrylcholinesterase interactions with amylin may protect pancreatic cells in metabolic syndrome. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(8):1747-56.
 71. Goliash G, Kleber ME, Richter B, Plischke M, Hoke M, Haschemi A, et al. Routinely available biomarkers improve prediction of long-term mortality in stable coronary artery disease: the Vienna and Ludwigshafen Coronary Artery Disease (VILCAD) risk score. *European heart journal*. 2012;33(18):2282-9.
 72. Maharshak N, Shenhar-Tsarfaty S, Aroyo N, Orpaz N, Guberman I, Canaani J, et al. MicroRNA-132 modulates cholinergic signaling and inflammation in human inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(7):1346-53.
 73. Shenhar-Tsarfaty S, Berliner S, Bornstein NM, Soreq H. Cholinesterases as biomarkers for parasympathetic dysfunction and inflammation-related disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2014;53(3):298-305.
 74. Alcântara V, Oliveira L, Réa R, Suplicy H, Chautard-Freire-Maia E. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. *International journal of obesity*. 2003;27(12):1557-64.

75. Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clinical biochemistry*. 2005;38(9):799-805.
76. Iwasaki T, Yoneda M, Nakajima A, Terauchi Y. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Internal Medicine*. 2007;46(19):1633-9.
77. Alcantara V, Chautard-Freire-Maia E, Scartezini M, Cerci M, Braun-Prado K, Picheth G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2002;62(5):399-404.
78. Antopol W, Tuchman L, Schifrin A, Sobotka H. Choline-Esterase Activity of Human Sera, with Special Reference to Hyperthyroidism. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1937;36(1):46-50.
79. Abbott C, Mackness M, Kumar S, Olukoga A, Gordon C, Arrol S, et al. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. *Clinical science*. 1993;85(1):77-81.
80. Pavković E, Simeon V, Reiner E, Sučić M, Lipovac V. Serum paraoxonase and cholinesterase activities in individuals with lipid and glucose metabolism disorders. *Chemico-biological interactions*. 1993;87(1-3):179-82.
81. Guimarães LO, Andrade FAd, Bono GF, Setoguchi TE, Brandão MB, Chautard-Freire-Maia EA, et al. Gestational diabetes mellitus (GDM) decreases butyrylcholinesterase (BChE) activity and changes its relationship with lipids. *Genetics and Molecular Biology*. 2014;37(1):1-6.
82. Brimijoin S, Gao Y, Geng L, Chen VP. Treating cocaine addiction, obesity, and emotional disorders by viral gene transfer of butyrylcholinesterase. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:112.
83. Chen VP, Gao Y, Geng L, Parks RJ, Pang Y-P, Brimijoin S. Plasma butyrylcholinesterase regulates ghrelin to control aggression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(7):2251-6.
84. Santarpia L, Grandone I, Contaldo F, Pisanisi F. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2013;4(1):31-9.
85. Benyamin B, Middelberg RP, Lind PA, Valle AM, Gordon S, Nyholt DR, et al. GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects

- within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. *Human molecular genetics*. 2011;20(22):4504-14.
86. Edwards JA, Brimijoin S. Effects of hypophysectomy on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the rat. *Biochemical Pharmacology*. 1983;32(7):1183-9.
 87. Bodur E. Human serum butyrylcholinesterase interactions with cisplatin and cyclophosphamide. *Biochimie*. 2010;92(8):979-84.
 88. Ellman GL, Courtney KD, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*. 1961;7(2):88-95.
 89. George P, Abernethy M. Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clinical chemistry*. 1983;29(2):365-8.
 90. Ornstein L. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1964;121(2):321-49.
 91. Cannon-Carlson S, Tang J. Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels. *Anal Biochem*. 1997;246(1):146-8.
 92. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987;8(2):93-9.
 93. Karnovsky MJ, Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1964;12(3):219-21.
 94. Hamilton J, Jones I, Srivastava R, Galloway P. A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2. *Clinica chimica acta*. 2012;413(15-16):1207-10.
 95. Sharon N, Lis H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*. 1989;246(4927):227-34.
 96. Tornel PL, Sáez-Valero J, Vidal CJ. Ricinus communis agglutinin I reacting and non-reacting butyrylcholinesterase in human cerebrospinal fluid. *Neuroscience letters*. 1992;145(1):59-62.
 97. Murakami M, Kudo I. Phospholipase A2. *The journal of biochemistry*. 2002;131(3):285-92.
 98. Holopainen JM, Subramanian M, Kinnunen PK. Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry*. 1998;37(50):17562-70.

99. Merrill Jr AH, Jones DD. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1990;1044(1):1-12.
100. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1959;37(8):911-7.
101. Zimmerman CL, Ratna S, Leboeuf E, Pang KS. High-performance liquid chromatographic method for the direct determination of 4-methylumbelliferone and its glucuronide and sulfate conjugates: Application to studies in the single-pass in situ perfused rat intestine—liver preparation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1991;563(1):83-94.
102. Zhang J-H, Roddy TP, Ho P-I, Horvath CR, Vickers C, Stout S, et al. Assay development and screening of human DGAT1 inhibitors with an LC/MS-based assay: application of mass spectrometry for large-scale primary screening. *Journal of biomolecular screening*. 2010;15(6):695-702.
103. Smith Pe, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano M, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
104. Çokuğraş AN. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem*. 2003;28(2):54-61.
105. Lowe ME. STRUCTURE AND FUNCTION OF PANCREATIC LIPASE AND COLIPASE. *Annual Review of Nutrition*. 1997;17(1):141-58.
106. L'Hermite A, Sine J, Colas B. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in epithelial cells of rat intestine. *European journal of histochemistry: EJH*. 1996;40(4):299.
107. Yıldız Ö, Bodur E, Çokuğraş AN, Özer N. Partial purification and characterization of soluble isoform of butyrylcholinesterase from rat intestine. *The Protein Journal*. 2004;23(2):143-51.
108. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent M. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews*. 2007;8(1):21-34.
109. Zarei I, Oppel RC, Borresen EC, Brown RJ, Ryan EP. Modulation of plasma and urine metabolome in colorectal cancer survivors consuming rice bran. *Integrative food, nutrition and metabolism*. 2019;6(3).

110. Akimov MG, Kudryavtsev DS, Kryukova EV, Fomina-Ageeva EV, Zakharov SS, Gretskaia NM, et al. Arachidonoylcholine and other unsaturated long-chain acylcholines are endogenous modulators of the acetylcholine signaling system. *Biomolecules*. 2020;10(2):283.
111. Kanfer J, Pettegrew J, Moossy J, McCartney D. Alterations of selected enzymes of phospholipid metabolism in Alzheimer's disease brain tissue as compared to non-Alzheimer's demented controls. *Neurochemical research*. 1993;18(3):331-4.
112. Prasad MR, Lovell MA, Yatin M, Dhillon H, Markesbery WR. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochemical research*. 1998;23(1):81-8.
113. Lane RM, He Y. Butyrylcholinesterase genotype and gender influence Alzheimer's disease phenotype. *Alzheimer's & Dementia*. 2013;9(2):e17-e73.
114. Korneeva O, Popova T, Kapranchikov V, Motina E. Identification of catalytically active groups of wheat (*Triticum aestivum*) germ lipase. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008;44(4):349-55.

