

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FETAL SIĞIR SERUM ASETİLKOLİNESTERAZININ
TETRAMERİK YAPISINI ORGANİZE EDEN
POLİPROLİN PEPTİDLERİN KÜTLE SPEKTROMETRE
İLE ANALİZİ**

Uzm. Ecz. Kevser BİBEROĞLU

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2014**

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FETAL SIĞIR SERUM ASETİLKOLİNESTERAZININ
TETRAMERİK YAPISINI ORGANİZE EDEN
POLİPROLİN PEPTİDLERİN KÜTLE SPEKTROMETRE
İLE ANALİZİ**

Uzm. Ecz. Kevser BİBEROĞLU

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Özden TACAL**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Oksana Lockridge**

**ANKARA
2014**

Anabilim Dalı :Biyokimya
 Program :Biyokimya
 Tez Başlığı :Fetal Sığır Serum Asetilkolinesterazının Tetramerik Yapısını
 Organize Eden Poliprolin Peptidlerin Kütle Spektrometre ile
 Analizi
 Öğrenci Adı-Soyadı :Kevser Biberöđlu
 Savunma Sınavı Tarihi :13.10.2014

Bu alışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Kamer Kılıncı
 (TOBB ETÜ)
 Tez danışmanı: Prof. Dr. Özden Tacal
 (Hacettepe Üniversitesi)
 Üye: Prof. Dr. Hakan Akbulut
 (Ankara Üniversitesi)
 Üye: Doç. Dr. Yasemin Aksoy
 (Hacettepe Üniversitesi)
 Üye: Doç. Dr. Gülnihal Kulaksız Erkmen
 (Hacettepe Üniversitesi)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ersin FADILLIOĐLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren ve her zaman örnek aldığım sevgili hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Özden TACAL'a, bana hem evlerini hem de laboratuvarlarını açan, çalışmamda her türlü bilgi ve tecrübeleri ile katkıda bulunan Prof. Dr. Oksana LOCKRIDGE ve Prof. Dr. Lawrence M. SCHOPFER'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında beni hiç yalnız bırakmayan ve bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan başta canım anneciğim ve canım babacığim Emine-Basri BİBEROĞLU'na ve canım kardeşim Resul'a sonsuz teşekkürler. İyi ki varsınız...

Manevi hiçbir yardımı benden esirgemeyen ve her zaman yanımda olduğu için sevgili eşim Okan BİBEROĞLU'na ve varlığı ile bana güç veren canım oğlum Faik Yusuf'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

ÖZET

Biberoğlu, K. Fetal sığır serum asetilkolinesterazının tetramerik yapısını organize eden poliprolin peptidlerin kütle spektrometre ile analizi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, 2014. Fetal sığır serumunda bulunan asetilkolinesteraz (AChE), tetramerik yapıda bir enzimdir. İnsan ve at serumunda bulunan ve AChE ile ilişkili bir enzim olan bütirilkolinesterazın (BChE) tetramerik yapıya dönüşmesinde poliprolin peptidlerin rolü bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, çözümlenmiş, tetramerik AChE'nin yapısında tetramer yapıyı organize eden peptidlerin olup olmadığını incelemektir. Çalışmada öncelikle fetal sığır serum AChE'si, kaynatılarak denatüre edildi ve böylece non-kovalent bağlı peptidlerin AChE'dan salınmasına izin verildi. Peptidler, daha sonra ana proteinden filtrasyon ve HPLC yöntemleri kullanılarak saflaştırıldı. Salınan peptidlerin kütlesi ve amino asit dizisi, MALDI-TOF-TOF ve LTQ-Orbitrap kütle spektrometresi ile belirlendi. Çalışmanın sonunda 5 aile içerisinde sınıflandırılan ondört poliprolin peptid tanımlandı. Çalışılan peptidlerden en uzun peptidin, başka bir amino asit olmaksızın 25 tane ardışık prolin aminoasiti içerdiği bulundu. Diğer poliprolin peptidlerin yapısında ise bir adet farklı bir amino asitin bulunduğu gözlemlendi. Memeli proteom veritabanında yapılan araştırma sonucunda poliprolin peptidlerin, en azından 5 farklı prekürsör proteinden kaynaklandığı ve onların membrana-bağlı AChE'nin ColQ veya PRiMA'dan bağımsız olduğu bulundu. Günümüze kadar, AChE ve BChE, yapılarında tetramer yapıyı oluşturan poliprolin peptidleri içerdiği bilinen iki proteindir.

Anahtar kelimeler: Fetal sığır serum asetilkolinesterazı, poliprolin peptid, kütle spektrometresi, PAGE jel elektroforezi, tetramer organizasyonu

ABSTRACT

Biberoğlu, K. Determination of polyproline tetramer organizing peptides in fetal bovine serum acetylcholinesterase by mass spectrometry. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph. D. Thesis in Biochemistry, Ankara, 2014. Acetylcholinesterase (AChE) in the serum of fetal bovine is a tetrameric enzyme. The related enzyme, butyrylcholinesterase (BChE), in the sera of humans and horse requires polyproline peptides for assembly into tetramers. The goal of this study was to determine whether soluble tetrameric AChE includes tetramer organizing peptides in its structure. In this study, fetal bovine serum AChE was denatured by boiling to release non-covalently bound peptides. Released peptides were separated from bulk protein by filtration and by high performance liquid chromatography. Peptide mass and amino acid sequence of the released peptides were determined by MALDI-TOF-TOF and LTQ-Orbitrap mass spectrometry. Fourteen polyproline peptides, divided into 5 families, were identified. The longest peptide contained 25 consecutive prolines and no other amino acid. Other polyproline peptides included one nonproline amino acid. A search of the mammalian proteome database suggested that this assortment of polyproline peptides originated from at least 5 different precursor proteins, none of which were the ColQ or PRiMA of membrane-anchored AChE. To date, AChE and BChE are the only proteins known that include polyproline tetramer organizing peptides in their tetrameric structure.

Keywords: Fetal bovine serum acetylcholinesterase, polyproline peptide, mass spectrometry, PAGE gel electrophoresis, tetramer organization

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR SAYFASI	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolinesteraz Ailesi	3
2.1.1. Kolinesterazların Dokulardaki Dağılımları	4
2.2. Bütirilkolinesteraz	4
2.3. Asetilkolinesteraz	4
2.3.1. Asetilkolinesterazın Transkripsiyonu ve Membran Çapalama	6
2.3.2. Sentetik WAT ve PRAD Polipeptidlerin İlişkisi	7
2.3.3. AChE'in Polimorfizmi	8
2.3.4. AChE'in Biyosentezi	9
2.3.5. AChE'in Regülasyonu	10
2.3.6. AChE'in Aktif Merkez Yapısı	12
2.3.7. AChE'in Çözünür Formlarının Kökeni	15
2.3.8. AChE'in Lipid Raftlarla İlişkisi ve Fonksiyonel Sonuçları	16
2.3.9. AChE'in Aktiviteleri	18
2.4. AChE'in Nöropsikiyatrik Rolü: Alzheimer Hastalığı	22
2.4.1. Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanılan AChE İnhibitörleri	23
2.4.2. AChE'ı İnhibe Eden Toksinler	25
2.5. Prolinlerin Dağılımı, Sıklığı ve Poliprolinlerin İnsan Proteomundaki Dağılımı	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Gereçler	30
3.1.1. Kimyasallar	30

3.1.2. Aletler	30
3.2. Yöntemler	31
3.2.1. Asetilkolinesteraz Aktivitesinin Tayini	31
3.2.2. Tetramerik Yapıyı Oluşturan Peptidlerin HPLC ile Saflaştırılması	32
3.2.3. FBS AChE'ın Tetramer Yapıyı Oluşturan Peptidlerin Filtrasyon Yöntemi ile Ayrılması	32
3.2.4. MALDI-TOF-TOF Kütle Spektrometresi	33
3.2.5. LC/MSMS Orbitrap Kütle Spektrometresi	33
4. Bulgular	35
4.1. Tetramer Yapıyı Oluşturan Peptidlerin HPLC ile Saflaştırılması	35
4.2. MALDI TOF Kütle Analizi	36
4.3. MALDI TOF MSMS Analizi	46
4.3.1. Sodyum-kaynaklı Fragmentasyon	54
4.4. LTQ-Orbitrap MSMS Analizi	55
4.5. Prolince Zengin Peptidlerde Blast Taraması	66
5. TARTIŞMA	69
5.1. Çözünür ve Membran Bağlı Tetramerlerdeki Prolince-Zengin Peptidlerin Karşılaştırılması	69
5.2. Nonkovalent Bağlanma	70
5.3. Tetramer Yapının Oluşumu İçin İkinci Bir Genin Katkısı	70
5.4. FBS AChE'dan Salınan Prolince-Zengin Peptidler 25 Birime Varan Uzunluktadır	72
5.5. Proteaz Aktivitesinin Gerekliliği	73
5.6. AChE Tetramerlerinin Biraraya Gelmesi	74
6. Referanslar	77

SİMGELER ve KISALTMALAR

AChE	Asetilkolinesteraz
AD	Alzheimer hastalığı
ADAM	Disintegrin ve metalloproteinaz
AICD	APP hücre içi domain
Asp	Aspartik asit
APP	Amiloid prekürsör protein
BChE	Bütirilkolinesteraz
CLAMs	Kolinesteraz benzeri-adezyon molekülleri
α -CHCA	α -siyano-4-hidroksisinnamik asit
GPI	Glikofosfatidilinozitol
GRE	Glukokortikoid cevap elemanı
FBS	Fetal sığır serumu
MAPK	Mitojen-aktive protein kinaz
NGF	Sinir büyüme faktörü
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
PAS	Periferel anyonik bölge
PRAD	Proline zengin bölge
PRiMA	Proline zengin membran çapası
Trp	Triptofan
TTX	Tetradoksin
Tyr	Tirozin
WAT	Triptofan (W) Amfifilik Tetramerizasyonu

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 Asetilkolinesteraz (AChE) reaksiyonu	5
2.2 Asetilkolinesterazın moleküler formları	6
2.3 TcAChE'nin aktif bölge oyuğunun şematik gösterimi	12
2.4 TcAChE'nin üç boyutlu yapısının şeritler halinde gösterimi	13
2.5 Amiloid prekürsör proteinin (APP) sekretazlarla proteolitik işlenmesi ve PRİMA ile lipid raflara çapalanmış çözünür AChE-T formunun salınımında α -sekretazların olası rolünün şematik gösterimi	16
2.6 Nörotaktin ve kolinesteraz ailesi arasındaki benzerlikler	19
2.7 AD'da nörofibriler düğümler	22
2.8 AD'da amiloid plaklar	22
2.9 AChE'nin fosforilasyonu reaksiyonu	27
2.10 Prolin ve ilişkili homologların yapıları	28
3.1 AChE aktivitesinin Ellman yöntemi ile tayini	31
4.1 FBS AChE'deki peptidlerin HPLC ile saflaştırılması	35
4.2 HPLC çıktısı A13 (17-18. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	37
4.3 HPLC çıktısı A16 (20-21. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	37
4.4 HPLC çıktısı A17 (21-22. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	38
4.5 HPLC çıktısı A18 (22-23. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	38
4.6 HPLC çıktısı A20 (24-25. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	39
4.7 HPLC çıktısı 21 (25-26. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	39
4.8 HPLC çıktısı A22 (26-27. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	40
4.9 HPLC çıktısı A23 (27-28. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	40

4.10	HPLC çıktısı A24 (28-29. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	41
4.11	HPLC çıktısı B1 (29-30. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	41
4.12	HPLC çıktısı B3 (31-32. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	42
4.13	HPLC çıktısı B4 (32-33. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	42
4.14	HPLC çıktısı B5 (33-34. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	43
4.15	HPLC çıktısı B6 (34-35. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	43
4.16	HPLC çıktısı B11 (39-40. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	44
4.17	HPLC çıktısı B12 (40-41. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi	44
4.18	FBS AChE'dan kaynatılma ile salınan peptidlerin MALDI kütle spektrumu	45
4.19	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 1721.9 Da'luk PPPQP PPPPP PPPPP PP Na ⁺ peptidin MALDI MSMS spektrumu	47
4.20	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 1788.3 Da'luk 18-prolinli PPPPP PPPPP PPPPP PPP Na ⁺ peptidin MALDI MSMS spektrumu	48
4.21	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 1885.0 Da'luk 19-prolinli (PPP)PP PPPPP PPPPP PPPP Na ⁺ peptidin MALDI MSMS spektrumu	50
4.22	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 2069.1 Da'luk 20-prolinli PPPPP PPPPP PP(PPP PPPP S) Na ⁺ peptidin MALDI MSMS spektrumu	51

4.23	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 2347.1 Da'luk 24-prolinli (PP)PPP P(PP)PP P(PPPP P PPPP PPP) peptidin MALDI MSMS spektrumu	52
4.24	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 2445.2 Da'luk 25-prolinli (PP)PPP PPPPP PPPPP PPPPP PPPPP peptidin MALDI MSMS spektrumu	53
4.25	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (PPPPP) PPPPP PPPPP PP peptidin orbitrap MSMS spektrumu.	55
4.26	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (PPP)PP PPPPP P(PP) peptidin orbitrap MSMS spektrumu.	56
4.27	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (APPP)P PPPPP PP(PP) peptidin orbitrap MSMS spektrumu.	57
4.28	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (PPPP)P PPPPP PPPP peptidin orbitrap MSMS spektrumu.	58
4.29	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (PPPPP P)PPPP PPP (PP) peptidin orbitrap MSMS spektrumu.	59
4.30	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (APPPP P)PPPP (PP)(PPP P) peptidin orbitrap MSMS spektrumu.	60
4.31	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (PPPPP PP)PPP (PP)P(PP P) peptidin orbitrap MSMS spektrumu.	61
4.32	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (L/I/Hyp)PPPP) PPPPP P(PPP) (P P) peptidin orbitrap MSMS spektrumu	62
4.33	HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen PPPQ/KP PPPPP P(PPPP PP)Na ⁺ peptidin orbitrap MSMS spektrumu.	63
5.1	Fetal sığır AChE serumunun dört tane eş altbirimi, tetramerin merkezindeki bir poliprolin peptid ile etkileşim sonucu birbirleri ile bağlıdır	71
5.2	Tam uzunluktaki ColQ proteini varlığında AChE tetramerinin modeli	73

TABLOLAR

	Sayfa
2.1 Sentetik PRAD ve WAT'ın amino asit dizisi	8
4.1 HPLC elüentleri için MALDI TOF ile kütle analizi	36
4.2 FBS AChE'dan salınan peptidler	64
4.3 FBS AChE'dan salınan peptidler için BLAST taraması sonuçları	67
5.1 Çözünür ve membran bağlı tetramerik AChE ve BChE'da tetramer yapıyı oluşturan dizilerin karşılaştırılması	70

1. GİRİŞ

Omurgalı asetilkolinesterazı (AChE; EC 3.1.1.7), serin-esteraz protein ailesi içerisinde yer almaktadır (1). AChE'nin rolü, sinir-kas kavşağında post-sinaptik membranda asetilkolinin etkisini sonlandırmaktır. AChE, ayrıca birçok dokuda da mevcut olmasına rağmen bu dokulardaki enzimin fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir. AChE fetal sığır serumunda bol miktarda bulunurken yetişkin bir sığır serumunda ise fetal sığır serumunun yalnızca % 10'u kadar bulunmaktadır (2). AChE'nin tetramerik formları, sinir-kas kavşağında kollajen altbirimi (ColQ) aracılığı ile bazal laminaya bağlanırken (3); beyinde prolince zengin bir membran çapası ile (PRiMA) membranlara tutunmaktadır (4). Hem ColQ, hem de PRiMA, AChE monomerlerini tetramerlere dönüştüren bir prolince zengin bağlama bölgesi (PRAD) içermektedir. 15 birimlik PRAD peptid ile kompleks yapan 40 birimlik AChE tetramerizasyon bölgesinin kristal yapısında, poliprolin II'ye benzeyen bir antiparallel sol-el dönüşlü PRAD heliks etrafında paketlenmiş AChE'nin C-terminalinde, 4 tane korunmuş triptofan amfilik α -heliks yapısı görülmektedir (5). PRAD'ın en önemli özelliği ise; çok uzun, ardışık prolin birimlerine sahip olmasıdır. Daha önce yapılan bir çalışmada sentetik poliprolinlerin AChE monomerlerini tetramerik yapıya dönüştürdüğü gösterilmiştir (6).

AChE aynı zamanda çözünür formda da bulunabilir. Hücre kültüründe yapılan çalışmalar sonucunda; AChE'nin Col Q'daki prolince zengin fragment ile birlikte ekspresyonunun, AChE tetramerlerinin salınmasına neden olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan prolince zengin fragmentin yokluğunda yapılan hücre kültürü çalışmaları, sadece AChE monomerlerinin ve dimerlerinin salındığını göstermiştir (7). Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise, insan serumundaki tetramerik, çözünür bütirilkolinesterazın, diğer birçok proteine ek olarak lamellipodin proteinden kaynaklanan prolince-zengin peptidler aracılığı ile stabilize edildiği rapor edilmiştir (8). Tüm bu bilgiler ışığında, çözünür kolinesterazlar için tetramerik yapıyı oluşturan peptidlerin, membran-bağlı formlardan farklı olduğu ve aynı zamanda ortak bir poliprolin motifini paylaştığı düşünüldü. Bununla birlikte doğal olarak bulunan, çözünür AChE'daki prolince zengin peptidler, şimdiye kadar tanımlanmamıştır.

Önerilen tez çalışmasında amaç, çözüner AChE'in tetramerik yapısını oluşturan poliprolin peptidlerin varlığını incelemek; bu peptidlerin kimliğini kütle spektrometresi ile belirlemektir. Çalışmanın, asetilkolinesterazın yapısına ve yapıdan hareketle dokulardaki AChE'in fonksiyonuna ilişkin bilgilere katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOLİNESTERAZ AİLESİ

Kolinesterazlar, α/β -hidrolaz katlanmasına sahip süperaile içinde esteraz/lipaz protein sınıfına ait serin hidrolazlardır (9). Kolinesterazların varlığı ilk olarak 1914'te Henry Dale tarafından ileri sürülmüş (10); 1937'de Marnay ve Nachmansohn tarafından nöromusküler geçitte, Torpedo'nun elektrik organında ve Electrophorus'ta yüksek konsantrasyonda asetilkolinesteraz olduğu saptanmıştır (11). Kolinesterazlar, en hızlı enzimler olarak bilinmektedir, asetilkolinin asetilkolinesteraz tarafından hidrolizi maksimum teorik limite hemen hemen yaklaşmaktadır. Kolinesterazlar çok zengin moleküler polimorfizme sahip olup; çözünür, membran bağlı ve bazal laminaya çapalı formlara sahiptir. Kolinesterazların in vivo ekspresyonları ve çoklu moleküler formlarının dağılımı mükemmel bir gelişimsel ve hücrel farklılaşma indeksi oluşturmaktadır. Hayvan kolinesterazları yaygın dağılımlı enzimlerdir. Kolinerjik ve nonkolinerjik dokularda olduğu kadar plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunurlar (12).

Kolinesterazlar, substrat özgüllüklerindeki farklılıklar, yüksek substrat konsantrasyonundaki davranışları ve inhibitör duyarlılıklarına göre 2 sınıfa ayrılır: Asetilkolinesteraz (AChE; asetilkolin asetil hidrolaz, E.C. 3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (BChE, açilkolin açil hidrolaz, E.C.3.1.1.8). AChE, "gerçek kolinesteraz"; BChE ise, "psödokolinesteraz" veya nonspesifik kolinesteraz olarak da bilinmektedir. İnsan kromozomu 7 (AChE) ve 3'de (BChE) bulunan iki farklı genin ürünleri olmasına rağmen glikoprotein yapısındaki iki enzim, % 70-72 oranında amino asit dizi benzerliğine sahiptir (12,13).

AChE, asetilkolini diğer kolin esterlerinden daha hızlı hidroliz ederken BChE substrat olarak bütirilkolini asetilkoline tercih eder. AChE ile BChE'ı birbirinden farklı kılan diğer bir özellik de, yüksek substrat konsantrasyonu varlığında AChE'in inhibe olması, BChE'in ise aktive olmasıdır. Ayrıca, AChE, BW284C51 (1,5-bis (4-alildimetilaminopropil) pentan-3-on dibromür) ile BChE da bambuterol, etopropazin (10-(2-dietilaminopropil)fenotiyazid) ve iso-OMPA (izotetra monoizopropil pirofosfat tetramid) ile selektif olarak inhibe edilmektedir (12).

2.1.1. Kolinesterazların Dokulardaki Dağılımları

Kolinesterazların dokulardaki dağılımları da birbirinden farklıdır. AChE, beyin, kas ve eritrosit membranında bol miktarda bulunur. BChE ise karaciğer, barsak, kalp, böbrek ve akciğerde daha yüksek aktiviteye sahiptir (12). Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin % 80'inden AChE'nin, geriye kalan % 20'sinden BChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir (14).

2.2. Bütirikolinesteraz

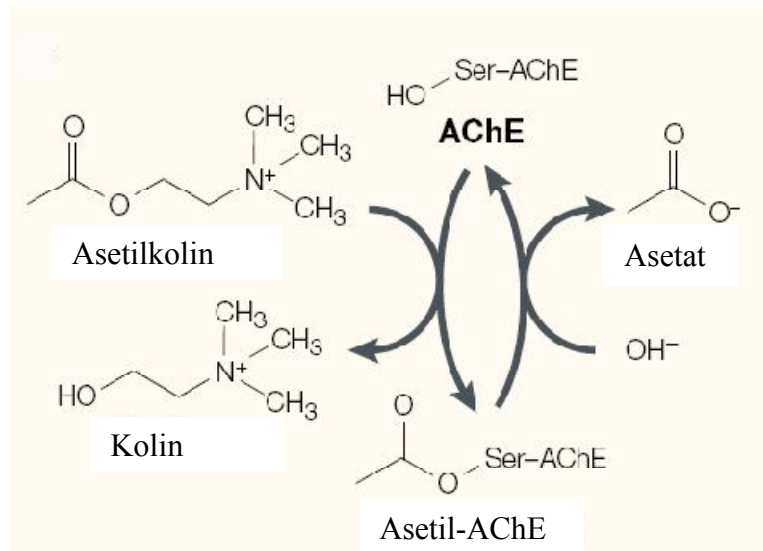
Bütirikolinesteraz (BChE, EC. 3.1.1.8), bir serin hidrolaz olup çok iyi bir detoksifikant olması nedeniyle farmakolojik ve toksikolojik açıdan önemli bir enzimdir. Bu özellik, BChE'nin süksinilkolin, aspirin, kokain, eroin ve organofosfatlar gibi ester yapılı bileşikleri parçalayabilmesinden kaynaklanmaktadır (12,15). BChE tetramerik bir glikoproteindir. Dört alt birim, nonkovalent hidrofobik etkileşimler ve disülfid bağları ile bir arada tutulur. Tetramerik organizasyon için zincirler arası disülfid bağları gerekli değildir; bu bağların indirgenmesinin veya indirgenip alkillenmesinin yapıyı değiştirmedeği gözlenmiştir (16-18). BChE'nin her monomerinde bir aktif bölge bulunur. Tetramer, 340000 Da molekül ağırlığındadır. Bu ağırlığın % 23.9'unu karbohidratlar oluşturmakta olup, her glikozillenmiş altbirimin kütlesi 85534 Da'dur. AChE'nin kolinerjik sistemdeki rolü oldukça iyi bilinmesine rağmen, BChE'nin şimdiye kadar rolü yeterince aydınlatılamamıştır. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar, asetilkolin düzeyinin regülasyonunda, Alzheimer hastalığının gelişmesi ve ilerlemesinde, AChE ile birlikte BChE'nin de rol oynadığını göstermektedir (19).

2.3. Asetilkolinesteraz

Asetilkolin-aracılı sinir iletimi, sinir sisteminin fonksiyonu için esastır. Asetilkolinin beklenmedik blokajı ölümcül olup kademeli kaybı ise Alzheimer, multisistem atrofi ve diğer hastalıklarda idrak, otonomik ve kas-sinir fonksiyonlarında ilerleyen bozulma ile ilişkilidir. Asetilkolinesterazın (AChE) temel rolü, kolinerjik sinapslarda nörotransmitter asetilkolinin hızlı hidrolizi ile sinyal iletimini sonlandırmaktır (Şekil 2.1) (20,21). AChE, bu temel fonksiyonunun yanısıra aynı zamanda birçok non-katalitik ve klasik olmayan fonksiyonlar da

sergilemektedir. Örneğin, ekzojen AChE'in, nörit büyümesini arttırdığı gösterilmiştir (22,23). Kolinerjik sistem, genel olarak embriyonik sinir sisteminde hem AChE'in hem de BChE'in yüksek düzeyleri ile ilişkili olan embriyonik kök hücrelerin proliferasyonunda ve farklılaşmasında rol oynamaktadır (24). Kolinerjik sistem, aynı zamanda çeşitli hematopoetik hücrelerin migrasyonunda, proliferasyonunda ve farklılaşmasında da çeşitli rollere sahiptir (25).

Özgün biyokimyasal özellikleri ve fizyolojik önemi nedeniyle, AChE detaylı yapı-fonksiyon analizleri için ilginç bir hedef enzim haline gelmiştir. Geniş bir doku dağılımına sahip olan AChE, daha çok membran-bağlı bir enzim olup (26) ilk defa elektrikli yılan balığı dokusundan saflaştırılmıştır (27).



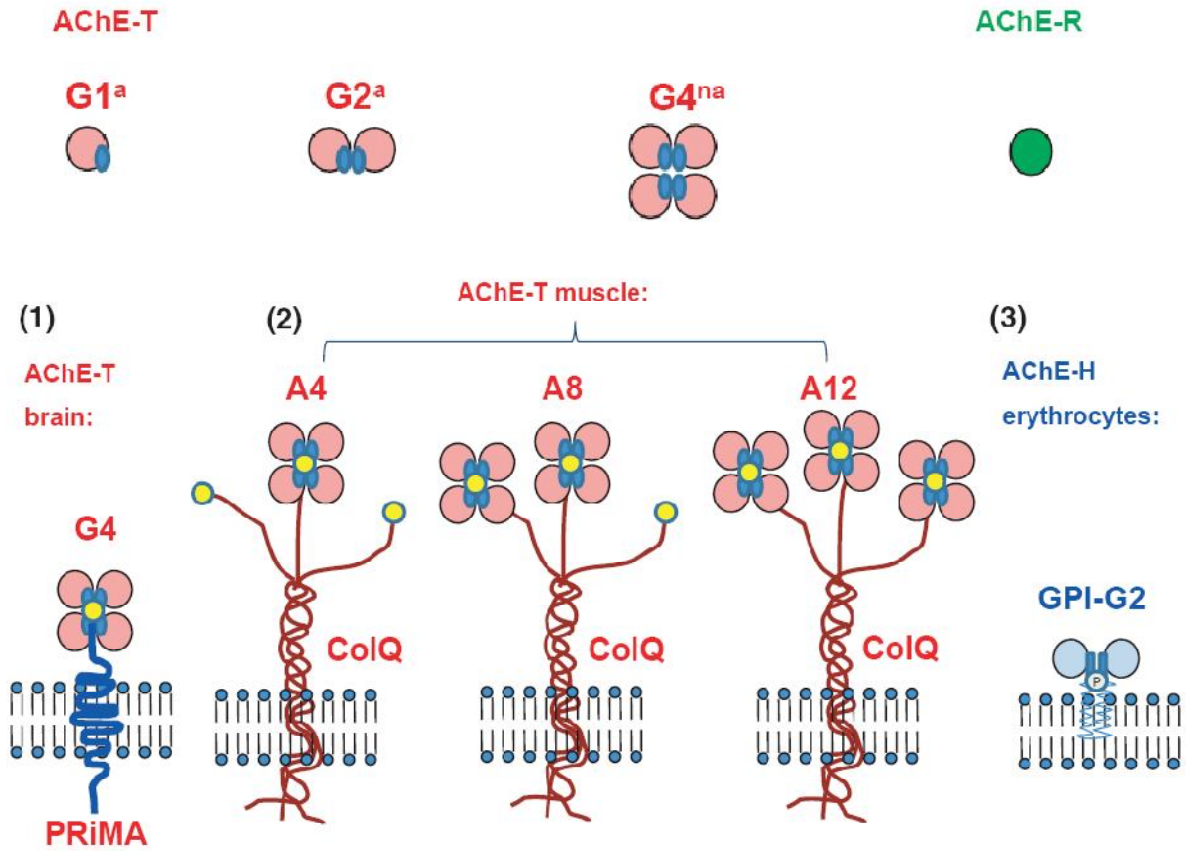
Şekil 2.1. Asetilkolinesteraz (AChE) reaksiyonu (21).

AChE, eritrosit yüzeyi dahil bir çok hücrede eksprese edilmektedir. Eritrositlerde eksprese edilmesi nedeniyle enzim, eskiden bazı kaynaklarca kan kolinesterazı olarak adlandırılmaktaydı. *Torpedo* AChE'ı 543 amino asitten ve 40 amino asit içeren değişken C-terminal peptidten oluşmaktadır (28). AChE molekülü 70-80 kDa'luk altbirimlerin homotetramerik kombinasyonu sonucu oluşur. Ancak bunun yanında trimerik, dimerik ve monomerik formlarının olduğu da bilinmekte, çözünür formda da eksprese edilebilmektedir (29). Fetal sığır serumu (FBS) özellikle çözünür AChE kaynağı bakımından zengindir. FBS AChE, 340000 Da moleküler

ağırlığında globüler, simetrik ve tetramerik bir yapıya sahiptir. Dört alt birim, dimerlerin dimeri olarak birbiri ile ilişkilidir. İki çift disülfid ile çapraz bağlı monomerler ise hidrofobik etkileşimlerle birarada tutulmaktadır (30).

2.3.1. Asetilkolinesterazın Transkripsiyonu ve Membran Çapalama

AChE'nin farklı fonksiyonlara sahip olması, büyük ölçüde AChE geninin farklı transkriptleri nedeniyle, enzimin çoklu moleküler formlara sahip olmasından kaynaklanmaktadır. AChE geninin “alternatif splicing” işlemine bağlı olarak enzim, birçok farklı moleküler formda bulunmakta (Şekil 2.2), bu çeşitlilik, çözünür ‘read-through’ form (AChE_R) ve bunların farklı tiplerdeki membran çapalarla ilişkili membrana bağlı formlarını oluşturmaktadır (31). “Read-through” olarak adlandırılmasının nedeni, bazı katalitik domainlerin C-terminalini kodlayan transkriptlerin katlanmamış olarak kalmasındandır. Bu tip transkriptler, Torpedo'nun elektrik organında (32) ve fare dokularında (33) bulunmaktadır.



Şekil 2.2. Asetilkolinesterazın moleküler formları (31).

Memeli sinir sisteminde ve kaslardaki AChE'in en yaygın transkripti, "tailed" kuyruklu kelimesinden gelen AChE_T'dir. Bu AChE izoformu, 40 amino asitten oluşan T peptid adı verilen bir C-terminal peptidin varlığı ile karakterizedir. T peptid aracılığı ile AChE_T alt birimleri arasındaki disülfid bağlanma, enzimin amfipatik homodimerlerini ve homotetramerlerini oluşturmaktadır. Bir α -heliks olarak organize edilen T peptid, aynı zamanda AChE komplekslerinin, kas-sinir kavşaklarında ColQ ya da beyinde PRİMA gibi spesifik membrana bağlı proteinlerin hidrofobik, prolince zengin altbirimlerine bağlanmasına izin vermektedir (34). Bu nedenle merkezi sinir sistemindeki AChE'in çoğu PRİMA'ya bağlı tetramerik AChE_T formunda (G₄) bulunmakta, AChE'in PRİMA ile etkileşiminin daha büyük bir multiprotein kompleksini oluşturduğu ileri sürülmektedir (35). C-terminal T-peptidleri tüm omurgalı sınıflarında bulunmaktadır ve katalitik bölgelere göre daha iyi korunmuştur (36) (Şekil 2.2).

"H" transkriptleri ise C-terminalinde GPI (glikofosfotidilinozitol) sinyali eklenmiş ve 'H' (hidrofobik) olarak adlandırılan peptidleri eksprese etmektedir. Bunlar birçok omurgasızlarda ve böcekte bulunmakta ve GPI-çapalı AChE'ı kodlamaktadır (37-39).

Diğer bir AChE varyantı da "S" olarak ('secreted, salgılanan) isimlendirilir ve Bungarus multicinctus türündeki yılanın zehir bezlerinden salgılanmaktadır. Tükrük bezlerinden türeyen bu salgı bezleri monomerik AChE formunu üretmektedir (40).

2.3.2. Sentetik WAT ve PRAD Polipeptidlerinin İlişkisi

AChE_T monomerleri, sentetik poliprolinlerin veya PRAD'ın varlığında disülfid bağı gerektirmeksizin stabil bir tetramer yapı oluşturur. Bu etkileşim, bir amfipatik heliks oluşturan sıkıca korunmuş AChE_T'nin C-terminal t peptidini gerektirir ve WAT olarak da isimlendirilir ('Triptofan (W) Amfifilik Tetramerizasyonu'). Çünkü üç tane sıkıca korunan ve eşit aralıklarla yerleşmiş Trp birimleri bulunur. WAT, ister tek başına ister heterolog bir proteinin C-terminali ile birleşmiş olsun, PRAD içeren ColQ'nun N-terminal fragmenti ile tetramerleri oluşturabilir. Bu nedenle dört AChE_T altbiriminin bir ColQ zinciri ile bir araya gelmesi, WAT ve PRAD dizileri arasındaki etkileşime dayanmaktadır.

PRAD, insan ColQ'da 72-86. birimlere tekabül eden 15 amino asit içerir ve bunlardan 8 tanesi prolin olup omurgalılarda çok sıkı korunmuştur. Sentetik insan WAT da, AChE_T transkriptinin 40 C-terminal birimlerine (insanda 544-583, *Torpedo*'da 536-575) karşılık gelmektedir (Tablo 2.1) (5).

Tablo 2.1. Sentetik PRAD ve WAT'ın amino asit dizisi (5).

Peptid	Amino asit dizisi
PRAD	LLTPPPPPLFPPPF
WAT	DTLDEAERQWKAEFHRWSSYMVHWKNQFDHYSKQDRCSL

2.3.3. AChE'in Polimorfizmi

İnsan ve fare genomik AChE dizileri arasındaki benzerlik ve neredeyse aynı olan kristal yapılar, enzimin fonksiyon göstermesinde her bir bölgesinin bile önemli olduğuna işaret etmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar sonucunda AChE'in birçok bölgesinde polimorfik yaygınlığın bulunması ile, AChE'daki nükleotit polimorfizminin çok nadir olduğu düşüncesi ortadan kalkmıştır (21,41). Üç tane tanımlanmış AChE polimorfizminin klinik öneme sahip olduğu gösterilmiştir: a. glukokortikoid cevap elemanı (GRE) ile etkileşimi etkileyen AChE'in distal promoter'ındaki polimorfizm (42), b. promoter bölgesinde bulunan hepatosit nükleer faktör 3 (HNF3)-bağlanma bölgesindeki 4-bp delesyon (42) ve c. His332Asn substitüsyonu üreten tek bir nükleotit polimorfizmi (SNP)'dir (43,44). Ayrıca AChE/paraoksonaz (PON1) bölgesindeki spesifik, fakat nadir olan polimorfizmlerin AChE inhibitörlerine karşı aşırı duyarlılığın (42), insektisidlerce-indüklenmiş Parkinson hastalığı (45) ve kişiye özgü anksiyete ile (46) korelasyon gösterdiği bulunmuştur. GRE ve HNF3-bağlanma bölgesi polimorfizmlerini taşıyan bireylerde, artan bir AChE ekspresyonu ve AChE inhibitörlerine karşı aşırı duyarlılık gösterdikleri saptanmıştır (42). Daha sonra yapılan bir çalışmada ise; HNF3-bağlanma bölgesi polimorfizmleri ve PON1 aktivitesi arasında daha kompleks bir etkileşimin varlığı gösterilmiştir (47). Bu polimorfizimleri taşıyan bireylere benzer olarak, aşırı AChE-S eksprese eden TgS transgenik farelerin de AChE inhibitörlerine karşı hipersensitivite gösterdiği bulunmuştur (42).

PON1 enzimi, AChE'nin güçlü inhibitörleri olan ve insektisidlerce indüklenmiş Parkinson hastalığında rol oynayan organofosfatları degrade etmektedir (48,49). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, AChE/paraoksonaz (PON1) bölgesindeki polimorfizmler ve insektisid-indüklü Parkinson hastalığı arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, HNF3-bağlanma bölgesindeki promoter delesyonu ve patoloji arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır. Bununla birlikte AChE ve PON1 gen polimorfizmleri birlikte düşünüldüğünde, daha düşük AChE ve PON1 aktivitesi gösteren insektisid-indüklü Parkinson hastalarında zayıf allellerin aşırı görüldüğü gözlenmiştir (45).

2.3.4. AChE'in Biyosentezi

AChE polipeptidleri, bir N-terminal sinyal peptidi (50) ile birlikte granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenmekte, burada glikozilasyona uğradıktan sonra, dimerler veya tetramerler olarak biraraya gelmektedir (51). Multimer olmayan birimler ise; globüler monomerler olarak kalır ve henüz açıklanamayan post-translasyonel modifikasyonlarla inaktif halde kalmaktadır. C-peptidindeki bir alıkonma sinyali, monomerlerin sitoplazmada tutulmasını sağlamakta, (52) bunların çoğu burada hızla degrade olmaktadır (53). Oligomerik formlar, kompleks şekerlerini oluşturmak için golgi aparatına geçmekte (54) ve daha sonra ColQ veya PRiMA ile birleşmektedir (55).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, asimetric heteromerik birleşmenin ER'de meydana geldiğini ileri sürmektedir (56). Kas fibrillerinde, yeni oluşmuş ColQ-AChE hücre içinde proteoglikan perlekanla birleşir ve daha sonra diğer komponentlerle birlikte lokalize olduğu sinir-kas kavşağına gitmektedir (55). AChE'nin MSS'ne hedeflenmesinde PRiMA'nın oynadığı rol ise henüz bilinmemektedir. PRiMA, her yerde sıklıkla eksprese olmasına rağmen, sadece MSS'deki sinapslarda AChE ile etkileşmektedir. Globüler monomerler çok çeşitli hücre tiplerinden sekrete edilebilmektedir (57). Ancak sekrete edilen enzimlerin çoğu çapalanmış bir proteine bağlıdır, monomerik altbirimler, eğer bu birimlerce biraraya toplanmamışlarsa, degradasyona uğramaktadırlar. Kas AChE-S, sonuç olarak sentezinden ~ 2.5 saat sonra hücrelerin yüzeyinde belirmekte ve yarılanma ömrü ~ 50 saat olduğu bildirilmektedir (51).

2.3.5. AChE'in Regülasyonu

Birçok çalışma, AChE izoform paterninin, sinaptik aktivitenin derecesi ve özelliğinin yanında, kolinerjik iletimle ilişkili olmayan diğer bazı uyarılar ile düzenlendiğini belirtmektedir. Memeli iskelet kasında sinir iletiminin ve spontan kasılmanın tetrodotoksin (TTX) ile bloke edilmesinin, AChE aktivitesinde ve hücre yüzeyindeki asimetrik formların oluşmasında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (58-60). Bu duruma G1 ve G2 izoformlarında herhangi bir değişiklik olmaksızın (61), G4'ün geçici artışı eşlik etmektedir (62). Aynı zamanda, membran depolarizasyonunda meydana gelen bir eksiklik, ColQ ekspresyonunu da negatif olarak etkilemektedir (63). Böylece sırayla, heterotetramerin oluşum hızı ve salınımı azalmakta, bu durum, hücre içindeki G4 düzeyini arttırmaktadır. G1 ve G2 düzeyleri ise, TTX ile bloke olmayan spontan asetilkolinin salınması ile korunmaktadır (61). Sinir iletimi blokajının down regülatör etkileri, nörojenik protein benzeri maddelerin uygulanmasıyla (61), direkt elektrik uyarımı ile (58), Na⁺ kanal agonistlerinin uygulanması (64) ve sitoplazmik Ca²⁺ artışı ile şaşırtıcı bir şekilde tersine çevrilmektedir (65).

Hızlı ve yavaş kaslar, sırasıyla sadece A12 ile A12, ve A8 ile A4 AChE formlarına sahiptir. Farklı AChE bileşimleri, bu kasların çapraz innervasyonu ile ya da bu kaslar üzerindeki uyarı modunun değiştirilmesi ile düzenlenebilir (66). Yürüyüş bandı egzersizlerinin hızlı seyirme kaslarındaki G4 formlarını belirgin düzeyde arttırdığı gözlenmiştir (67). Bu durum, spor yapıldığında hızlı kasların yavaş olanlara göre daha fazla etkilendiğine işaret etmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, otoimmün myastenia gravis oluşturulan sıçanların kaslarında AChE-R'nin aşırı eksprese olduğu ancak AChE-S'in herhangi bir değişikliğe uğramadığı gözlenmiştir. Bu sıçanlarda, AChE-R mRNA transkriptlerinin antisens oligonükleotitlerle yıkılması, kasın hareket potansiyelini, fiziksel kuvveti ve kilo almayı kolaylaştırmıştır (68). Antisens uygulanan maymunlarda ise; AChE-R mRNA düzeyi omurilikteki nöronlarda azalmış ancak hareketlerde herhangi bir değişiklik olmamıştır (69).

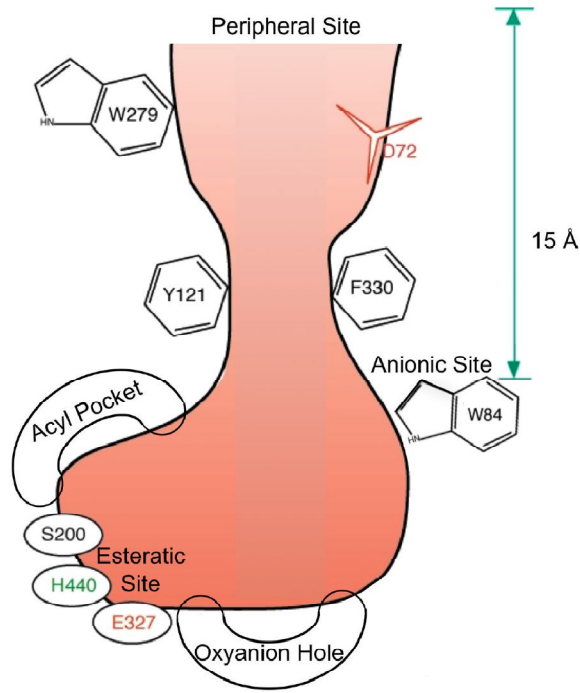
MSS'indeki AChE'nin bileşimi, çeşitli hücrel ve fizyolojik uyarılar altında dinamik değişikliklere maruz kalmaktadır. Birçok organizmada embryogenez esnasında, AChE'nin kademeli artışına G1 izoformundan G4 izoformuna doğru bir kaymanın eşlik ettiği rapor edilmiştir (70,71). Kolinergik iletim kaybı ile karakterize Alzheimer hastalığında ise; tam tersi olarak azalmış AChE aktivitesine, omurilik sıvısı ve çeşitli beyin hücrelerinde artan monomer düzeyleri eşlik eder. Bu değişikliklerin hastalığın şiddeti ile korele olması, fizyolojik ilişkiyi göstermektedir (72,73).

Alzheimer hastalarının birçoğunun beyinde tetramerik AChE kaybı gözlenmiştir (74,75). Bununla birlikte asimetric ve G1 formlarının düzeylerinin arttığı (76) ve beyin çeşitli bölgelerinde G4 ve G1 arasındaki oranının büyük miktarda azaldığı bulunmuştur (72). Anti-AChE'lar ile muamele edilen AD hastalarında ise, G1 izoformunda meydana gelen artışın AChE-R formunu artırdığı gösterilmiştir (73).

Sağlıklı memelilerde AChE-R, çeşitli stres etkenlerine maruz kalan hayvanların korteks, hipokampus, striatum ve beyinciğinde belirgin düzeyde artar. Bu durum, stres esnasında oluşan splicing factor SC35'in artışına bağlıdır. Benzer başka bir AChE-R artışı ise; kortikosteron ile tedavi esnasında, organofosfat zehirlenmesinde ve karbamat türevi piridostigmin ve fizostigmin tarafından meydana getirilen AChE'nin inhibisyonu ile meydana gelmektedir.

2.3.6. AChE'in Aktif Merkez Yapısı

TcAChE ve diğer AChE'lerin en önemli yapısal özelliği, dar, ~ 20 Å derinliğinde ve enzimin yarısından fazlasına penetre olan bir aktif bölge oyuğuna sahip olmasıdır (Şekil 2.3) (77).



Şekil 2.3. *TcAChE*'in aktif bölge oyuğunun şematik gösterimi. Oyuğun tabanı bir çok alt bölge ile karakterize edilmiştir: Asetilkolinin kolin grubunun etkileştiği anyonik bölge; katalitik üçlünün üç birimini içeren esteratik bölge; oksianyon deliği ve substrat spesifitesini sunan açıl bağlama cebi. Periferal anyonik bölge (PAS), aktif bölgenin ~ 15 Å yukarısında, oyuğun ağzına yakın bir yerde bulunmaktadır (77).

Aktif bölge oyuğu olarak isimlendirilmesinin nedeni AChE katalitik üçlünün en alt kısma yakın olmasındandır. AChE'in aktif bölge oyuğunu sınırlayan, on dört aromatik amino asit bulunmaktadır (Şekil 2.4). Bu birimler ve komşu dizileri farklı türlerdeki AChE'larda çok iyi korunmuştur. Bu oyuk, en yukarıda D285 ve E273, orta kısımdan biraz aşağıda Y334'e hidrojen bağı ile bağlı D72 ve tabanın yakınında E199 gibi sadece birkaç asidik amino asit içermektedir (77).



Şekil 2.4. *TcAChE*'in üç boyutlu yapısının şeritler halinde gösterimi. 14 korunmuş aromatik amino asit pembe çubuklar ve nokta yüzeyler olarak gösterilmiştir. Substrat modeli olarak gösterilen ACh, aktif bölgeye bağlanmış olup aktif bölge oyuğunun dibinde top ve çubuk formatında gösterilmiştir (77).

Aktif bölge oyuğunda 5 alt bölge tarif edilmiştir (78):

- | | |
|----------------------------------|--------------------------|
| 1) Periferal anyonik bölge (PAS) | 2) Kolin bağlama bölgesi |
| 3) Oksi-anyon deliği | 4) Açıl bağlama cebi |
| 5) Katalitik üçlü | |

Yakın zamanda yapılan kinetik çalışmalar, AChE'in aktif bölgesinin 'esteratik' ve 'anyonik' olmak üzere iki alt ünite içerdiğini göstermiştir. Esteratik alt bölgenin diğer serin hidrolazların katalitik alt bölgesine benzediğine inanılmaktadır (20,79,80).

Anyonik alt bölge, asetilkolinin kolin kısmının yüklü kuaterner grubu ile etkileşir. Bu bölgenin, edrophonium (81) ve N-metilakridinium (82) gibi kompetitif inhibitörlerle ve organofosfatlarla inhibe olmuş AChE'in reaktivatörü gibi davranan kuaterner oksimler için, bağlanma bölgesi olduğu düşünülmektedir (80).

Anyonik substrat bağlanma bölgesi, az miktarda (-) yüklü ve çok sayıda aromatik amino asitleri içermektedir (77).

Periferal anyonik bölge (β -anyonik bölge) enzimin yüzeyine yakın, oyuğun hemen ağzında bulunur. AChE'in periferal anyonik bölgedeki en önemli birimleri Tyr70, Asp 72, Tyr 121, Trp 279 ve Tyr 334'dür (83). Bu bölge, kuaterner amonyum grubu içeren kolin esterleri gibi pozitif yüklü substratların ilk bağlanmasından, aktif bölge oyuğuna doğru yönlendirilmesinden ve katyonik ligandların bağlanmasından sorumludur (84). Aromatik bölge, ilmikler içerir ve iyi bir konformasyonel esnekliğe sahiptir. Bu bölge birçok toksinin ve umut verici ilaçların hedef bölgesidir. Periferal anyonik bölgenin aynı zamanda, Alzheimer hastalığının gelişiminde muhtemelen önemli bir role sahip olduğu da düşünülmektedir. Amiloid β peptid, periferal anyonik bölge ile etkileşime girerek amiloid plakların oluşumuna neden olmakta ve sonuçta kolinerjik nöronlarda hasar meydana gelmektedir (85).

Kolin bağlama bölgesi ise önceleri anyonik bölge olarak bilinirdi fakat şimdi bu bölgenin, kuaterner amonyum grubunun bağlanmasından sorumlu negatif yüklü birim içermediği bilinmektedir (84). Aromatik birimler substratın stabilizasyonunda önemli rol oynamakta, kolin grubu, oyuğun ortasına yakın bir yerde lokalize olan F330 ve biraz aşağısında olan W84 ile stabilize edilmektedir (86).

Kolin bölgesinin hemen yanında G118, G119 ve A201'i içeren **oksianyon deliği** bulmakta ve bu bölge substrat ile etkileşerek substratın dikey pozisyondan yatay pozisyona geçmesini sağlamaktadır (87).

Substrat yatay olarak döndürüldüğünde substratın açıl kısmı **açıl bağlanma cebine** bağlanmaktadır. AChE'in açıl bağlanma cebindeki fenil halkaları (F295 ve F297) substratın serbestliğini kısıtlamakta ve asetilkolin gibi kısa açıl grubu içeren substratların katalizine izin vermektedir (88,89).

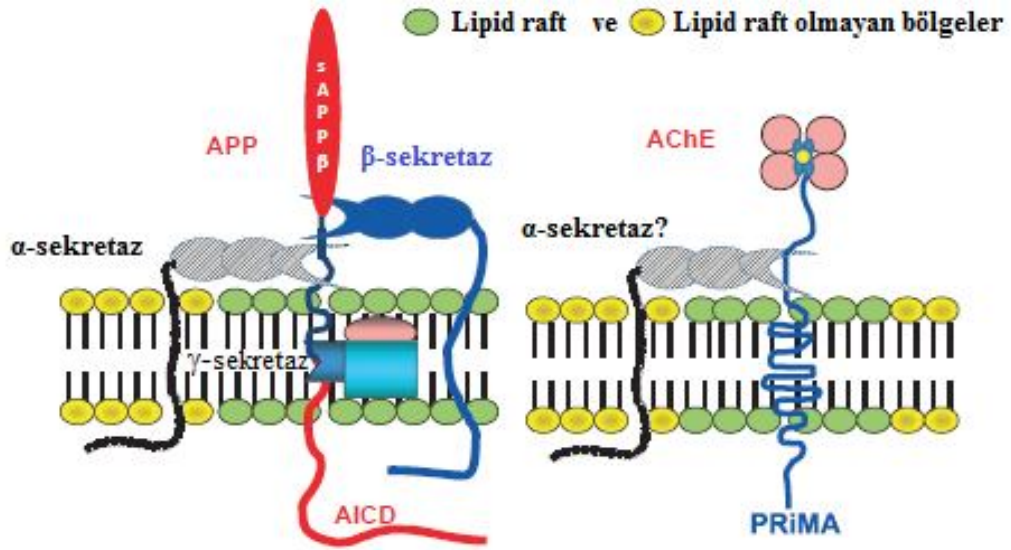
Oksianyon deliği ve açıl bağlama cebi arasında stabilize edilen substrat, aktif merkezin esteratik bölgesinde bulunan S200, E327 ve H440'dan oluşan katalitik üçlü ile hidroliz için hazır duruma gelmektedir (84).

2.3.7. AChE'in Çözünür Formlarının Kökeni

AChE'in beyinde membranla-ilişkili formlarına ek olarak, çözünür formları da mevcuttur. AChE'in çözünür "read-through" formu, nadir bir transkript varyant olup, ekspresyonu strese cevap olarak artmaktadır (90). Ayrıca, MSS'indeki membran-bağlı AChE, elektriksel, farmakolojik veya davranışsal uyarıma bağlı olarak hem in vitro hem de in vivo koşullarda, hidrofilik ve çözünür form olarak salınmaktadır (91). Bu sekresyonun mekanizması ve fonksiyonu tam olarak aydınlatılmamıştır, ancak bu durumun, AChE'in non-kolinerjik ve non-katalitik rolleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (92).

AChE aynı zamanda eksitotoksik uyarı, hipoksi veya A β 'ya maruz kalma gibi patolojik durumlarda membranlardan salınmakta ve/veya internalize olmaktadır (93,94). Ancak bu durumun koruyucu veya patolojik bir mekanizma olup olmadığı ise hala bilinmemektedir. AChE sekresyonunun kalsiyum iyonlarına bağlı olması, enzim sekresyonunun fizyolojik ve ekzositoza bağımlı olduğunu düşündürmektedir (95).

Tersinir ve tersinmez inhibitörler kullanılarak hücre hatlarından AChE'in karbakol-indüklü ekzositozu açık bir şekilde gösterilmiştir (96). Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada ise karbakol ile uyarılmış AChE salınımının, diğer membran proteinlerinin (α -sekretaz ve nonamiloidojenik amiloid prekürsör protein (APP) gibi) salınım mekanizmasına çok benzediği rapor edilmiştir (97). Bu salınımın, batimastat gibi tipik α -sekretaz inhibitörleri ile inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu nedenle, α -sekretaz-benzeri aktivite, sadece A β üretimini değil, aynı zamanda önbeyindeki kolinerjik nöronların hücre membranında toksik AChE-A β komplekslerinin birikmesini de inhibe etmektedir. Bugüne kadar AChE'in membrandan salınım mekanizması çok az ilgi görmesine rağmen, APP'de olduğu gibi bir veya daha fazla metalloproteinaz ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) ailesinin bu olayda yer aldığı düşünülmektedir. (Şekil 2.5) (98).



Şekil 2.5. Amiloid prekürsör proteininin (APP) sekretazlarla proteolitik işlenmesi ve PRİMA ile lipid raflara çapalanmış çözünür AChE-T formunun salınımında α -sekretazların olası rolünün şematik gösterimi. APP'nin β - ve γ -sekretazlar ile kesimi ile ekstraselüler APP fragmenti sAPP β , amiloid β -peptid ($A\beta$, siyah ile gösterilmiş) ve bir transkripsiyonel regülatör olarak rol oynayan APP hücre içi domain (AICD) (99) meydana gelir. α -sekretaz ile kesim, $A\beta$ 'nin oluşumunu önler ve sAPP α , p3 (gösterilmemiştir) ve AICD oluşur. α -sekretaz-benzeri metallopeptidazların da aynı zamanda AChE'ı PRİMA bölgesinden kestiği kanıtlanmıştır (97). β -sekretazlar tarafından gerçekleştirilen APP kesimi gibi bu olayın, muhtemelen lipid raflarda meydana geldiği düşünülmektedir.

2.3.8. AChE'in Lipid Raftlarla İlişkisi ve Fonksiyonel Sonuçları

Lipid raftlar, kolesterol ve sfingolipidlerce zengin membran kompartmanları olup, hücre sinyalizasyonunda ve Alzheimer hastalığındaki $A\beta$ oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (100). Örneğin, APP β -sekretazın, GPI-çapasına bağlanma ile lipid raflara hedeflenmesi, $A\beta$ üretiminde önemli bir artışa neden olmakta (101) ve amiloidojenik yolun anahtar proteinleri post-translasyonel modifikasyonlar aracılığı ile lipid raftlardaki lokalizasyonu kolaylaştırmaktadır (102). APP'nin proteolitik işlenmesinde, bir amiloidojenik yolun veya nonamiloidojenik yolun takip edilip edilmemesi kısmen lipid rafları etkileyen faktörler (kolesterol düzeyindeki dalgalanmalar, hipoksi ve oksidatif stres vb) tarafından belirlenmektedir (100-103).

Memeli eritrositlerinde bulunan AChE formlarından biri olan AChE-H, hidrofobik karakterlidir ve GPI-çapaya sahip olduğundan dolayı özellikle lipid

raftlarda lokalize olmaktadır (104). Bu durum, memeli beynindeki AChE'nin en azından bir kısmının da bazı nöral fonksiyonlar için raft lokalizasyonuna gereksinim duyabileceğini düşündürmektedir. Çünkü AChE_T membrana bağlanma bölgesine sahip değildir ve sadece PRİMA aracılığı ile membrana lokalize olmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, bu hipotezi doğrulamakta (105) ve nöronal AChE'nin önemli bir kısmının raftlarda lokalize olduğunu göstermektedir. PRİMA, APP gibi bir tip I transmembran proteinidir ve AChE_T'nin membran çapası olarak işlev görmektedir. PRİMA'nın raftlardaki lokalizasyonunun, transmembran ve sitoplazmik bölgelerini çevreleyen bir 13-birimlik kolesterol-bağlayan motif aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Hem kolesterolün azalması, hem de kolesterol-bağlayan motifin mutasyona uğraması, PRİMA'nın raft ile olan ilişkisini azaltmaktadır. Ayrıca, son zamanlarda yapılan bir çalışmada, bir sitoplazmik sistemin palmitilasyonunun da, raft ile etkileşime yardım edebileceği rapor edilmiştir (105). İmmünohistokimyasal bir yaklaşım kullanılarak yapılan ayrı bir çalışmada (106), AChE'nin ve PRİMA'nın plazma membranına olan güçlü kolokalizasyonunun somata, dendritler ve kolinerjik nöronların aksonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak, PRİMA immünoreaktivitesi, komşu GABAerjik nöronlarda veya dopaminerjik nöronlarda tespit edilememiştir. PRİMA ekspresyonu, AChE ile paralel olarak beyin gelişimi esnasında artmaktadır ancak bugüne kadar yaşlanma ve nörodejenerasyonun PRİMA üzerindeki herhangi bir etkisi gösterilmemiştir. Mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) sinyalizasyon yolağının, hem PRİMA hem de AChE'nin ko-ekspresyonunun düzenlenmesinde anahtar role sahip olduğu düşünülmektedir (107). Bu yolak, sinir büyüme faktörü (NGF), beyin-kökenli nörotrofik faktör ve nöral hücre-adezyon molekülleri gibi çok çeşitli büyüme faktörleri tarafından regüle edilmektedir. AChE'nin GPI-çapalı formunun yüksek düzeyde eksprese edildiği başka bir bölge ise, PRİMA ekspresyonunun ve PRİMA içeren AChE tetramerlerinin kaybının olduğu distrofik kaslardaki sarkolemmalardır. Distrofik kaslardaki AChE-H'nin artışı, wild-tip dokulara göre lipid raftların yoğunluğunda dikkat çekici bir artış ile korelasyon göstermektedir (108).

2.3.9. AChE'in Aktiviteleri

AChE'in birden fazla, birbiri ile ilişkili olmayan biyolojik fonksiyonlara sahip olması fikri çok açık olmamakla birlikte, gerçekte kolaylıkla kabul edilememiştir. Ancak, sitokimyasal bulgular, çok erken embriyogenez, embriyonik nörit büyümesi, kas gelişimi esnasında ve sinaptogenez öncesinde AChE ekspresyonunun düzenlendiğini kanıtlamıştır. Buna ek olarak, enzim yetişkin non-kolinergik nöronlarda, hematopoetik, osteogenik ve çeşitli neoplastik hücrelerde de bulunmuştur (109-111).

Çözünür, sekrete olan AChE'in monomerik formları ile ilgili daha önce yapılan çalışmalar (112), enzimin ayrıca non-enzimatik fonksiyonlara da sahip olduğu fikrini desteklemektedir.

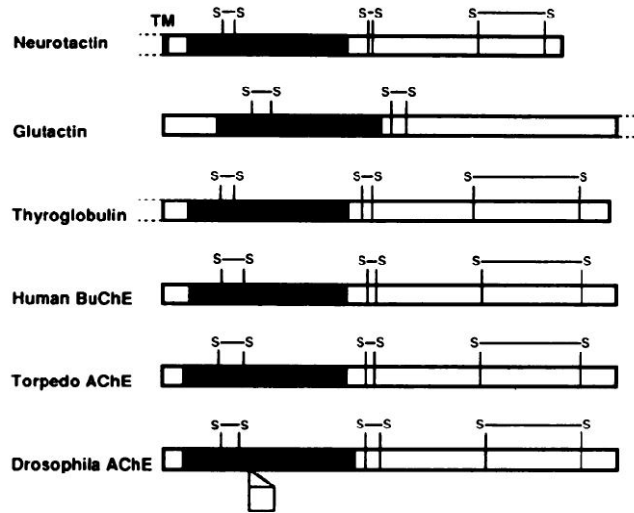
Nörit oluşumu

AChE'in hidrolitik kapasitesinden farklı olarak tanımlanan ilk klasik olmayan aktivitesi, nörit oluşumundaki rolüdür. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalar sonucunda saflaştırılmış ekzojen AChE'nin, tavuk sinir hücrelerinde nörit büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte çeşitli aktif-bölge inhibitörleri, nörit büyümesini azaltmada başarısız olurken, bir periferik bölge inhibitörünün nörit oluşumunu bloke ettiği bulunmuştur. Ayrıca nöroblastoma, feokromositoma hücrelerinde (PC12) ve primer dorsal kök ganglion nöronlarında AChE veya antisens AChE cRNA-kodlayan vektörlerle yapılan transfeksiyon çalışmalarının sonuçları, AChE'nin nörit oluşumundaki rolünü desteklemektedir. Benzer şekilde, insan AChE-S'i eksprese eden *Xenopus* motor nöronlarının da artan nörit büyüme hızına sahip olduğu gösterilmiştir (21).

Hücre Adezyonu

Hücre adezyon molekülleri, AChE ile dikkat çekici bir dizi homolojisi gösteren ekstraselüler bir bölgeye sahiptir. Bu moleküller üzerinde yapılan çalışmalar, AChE'in non-enzimatik fonksiyonlarına açıklık kazandırmaktadır.

Kolinesteraz benzeri adezyon moleküllerinden oluşan 5 farklı protein tanımlanmıştır: tiroglobulin, glutaktin, nörotaktin, gliotaktin ve nöroligin (Şekil 2.6) (113).



Şekil 2.6. Nörotaktin ve kolinesteraz ailesi arasındaki benzerlikler. Nörotaktinin ekstraselüler bölgesinin (transmembran domain (TM)); Glutaktinin N-terminal bölgesinin; tiroglobulinin C-terminal bölgesinin; üç kolinesterazın şemantik diagramları (113).

AChE ve kolinesteraz benzeri-adezyon molekülleri (CLAMs) arasındaki en önemli yapısal benzerlikler aşağıda özetlenmiştir:

- 1) AChE dizisi ve CLAMs'ların ekstraselüler bölgeleri arasında % 25-32 amino asit benzerliği mevcuttur.
- 2) Benzer üç boyutlu yapı ve ortak fonksiyonel özellik gösterirler.
- 3) Katalitik oyuğun girişinde veya homolog bölgede negatif yüklü bir dairesel bir motif içeren alışılmamış bir yüzey yük dağılımı içerirler.
- 4) Ca^{+2} bağlayan ve heterolog hücre birleşmesinde bir role sahip bir EF-el motifi bulunmaktadır.
- 5) Tüm CLAMs'larda korunmuş olan AChE katalitik bölgenin dört heliks demeti aracılığı ile altbirimlerin dimerizasyonu ve tetramerizasyonu sözkonusudur.

Tüm CLAMs'lar içinde nörotaktin, gliotaktin ve nöroliginin fizyolojik rolleri daha iyi anlaşılmış olup, AChE'nin varsayılan non-katalitik fonksiyonlarına çok benzerdir. Nörotaktin, kolinesteraz-benzeri bölge aracılığıyla sekrete protein amalgam ile etkileşmekte, böylece heterofilik hücre agregasyonunu teşvik etmektedir. Nörotaktinin ekstraselüler bölgesinin homolog AChE bölgesi ile yer değiştirildiği şimerik moleküllerde, sağlam molekülün adheziv özellikleri korunmaktadır. Ayrıca AChE'nin aşırı eksprese edildiği koşullar altında, AChE'nin nörotaktin ligandları ile yarışabildiği ve böylece nörotaktinin büyümeyi indükleyici fonksiyonlarını durdurabileceği düşünülmüştür. Bu durum, özellikle AChE-S'e göre lokalizasyonda daha az sınırlamaya maruz olan çözünür varyant AChE-R ile ilişkilidir. Gliotaktin, periferal gliada eksprese edilir ve kan-sinir bariyerinin oluşumuna katılır. Mutant gliotaktine sahip *Drosophila* embriyoları, motor aksonlarının eksik izolasyonu sonucu neredeyse paralize durumdadır. Nöroliginler, nöreksin transmembran reseptörleri ile etkileşen bir protein ailesini oluşturmaktadır. Nöroligin ailesinin üyeleri, nöroksinlerle etkileşerek sinaps oluşumuna katılır, uyarıcı ve inhibe edici sinapslar arasındaki dengeyi kontrol eder. Ayrıca, kolinesteraz benzeri-adezyon molekülleri (CLAMs), hücre dışındaki partnerleri ile etkileşime girerek kolinesterazlarla yarışabilirler. Sonuç olarak, nöromodülatör aktivitesi açısından bu iki tip protein arasında olası bir karşılıklı bir ilişkinin olduğunu düşünülmektedir (113,114).

Sinaptogenez

AChE'nin katalitik özelliklerine bağlı olan, enzimin sinaps oluşumundaki rolü, mikroenjeksiyon yapılan bir kurbağa yavrusunda (*Xenopus*) gözlenmiştir. Ancak non-katalitik bir diğer transmembran proteini olan ve AChE'a homolog ekstraselüler bir bölgeye ve bir karboksi-terminal sitoplazmik kuyruğa sahip olan nöroligin için de aynı zamanda bir sinaptojenik aktivite gösterilmiştir. Nöroligin, nöronal olmayan hücrelerde eksprese edildiğinde, sinaptik vezikül kümelenmesini ve komşu aksonlarda presinaptik farklılaşmayı indüklemektedir. Bu olay, AChE'a aynı zamanda bağlandığı tahmin edilen ve nöroliginin bir bağlanma partneri olan β -nöreksinin ekstraselüler bölgesinin eklenmesi ile önlenmiştir. Yetişkin beyin sinapslarında nöroligin varlığının immünohistokimyasal kanıtlarla gösterilmesiyle,

sinaps gelişiminde ve yeniden düzenlenmesinde nöroliginin gerekli olduğu gösterilmiştir. AChE'in da eğer bu olayda gerçek bir rolü varsa, daha direkt bir yol ile test edilmesi gerekmektedir (21).

Amiloid fibril birikimi

AChE'in, amiloid fibril birikimini teşvik ettiği rapor edilmiştir (85). Ayrıca bu aktivitenin enzimin periferik-bölge inhibitörü olan propidyum tarafından bloke edilirken, bir aktif-bölge inhibitörü olan edrofonyum tarafından bloke edilemediği de gösterilmiştir. AChE aktivitesi ile amiloid plak arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere yapılan histokimyasal çalışmalar sonucunda, AChE-amiloid- β kompleksinin, düşük pH'ya dirençli bir AChE aktivitesine sahip olduğu, enzimin karakteristik bir özelliği olan substrat inhibisyonundan yoksun olduğu ve anti-AChE'lara karşı azalan bir sensitivite gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmalarda bağlanma ve amiloid fibril oluşumunu teşvik etmek için yüksek konsantrasyonlarda AChE kullanılmıştır. Ayrıca, in vitro koşullarda sadece AChE'in amiloid fibrillere bağlandığı, in vivo koşullarda ise hem AChE'in hem de BChE'in, amiloid fibrillere bağlanabildiği gösterilmiştir (115).

Hematopoez ve trombopoez

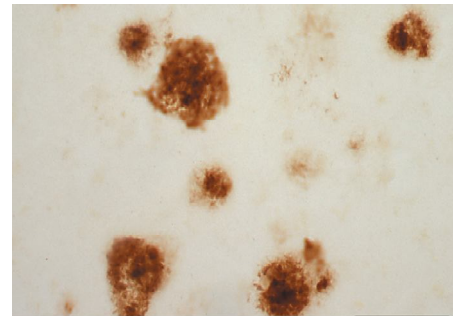
Son yıllarda yapılan çalışmalarda, hemaglutinin ile uyarılmış lenfosit aktivasyonu esnasında AChE'in transkripsiyonel olarak aktive olduğu gösterilmiştir. İnhibisyon çalışmaları, bu olayda hem katalitik hem de non-klasik özelliklerin yer aldığını göstermektedir (116). Antisens oligodeoksinükleotitlerle muameleden sonra AChE'in geçici olarak bastırılması ve ardından aşırı üretiminin fare kemik iliği hücre kültüründe miyeloid proliferasyonunu indüklediği gözlenmiştir (117). Bu bulgu, AChE inhibitörlerinin, AChE üretimini aşırı indüklemesi nedeniyle pestisid kullanıcıları arasında artan lösemi riskini de açıklamaktadır (118).

Bir diğer konu ise, AChE'in tek başına tümör oluşumuna neden olup olmadığıdır. AChE geni, sıklıkla lösemi hastalarında amplifiye olur, mutasyona ya da delesyona uğramaktadır. Bu durum, AChE'in miyeloid proliferasyonunda rol oynadığı düşüncesini desteklemektedir.

Ancak, bugüne kadar bu etkiyi açıklayan hiçbir mekanizma ileri sürülmemiştir ve bu mekanizmanın direkt olarak enzim aktivitesi ile ilişkili olup olmadığı da bilinmemektedir (119).

2.4. AChE'in Nöropsikiyatrik Rolü: Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AD), yaygın olarak gözlenen nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalık, nadiren 60 yaşından önce başlar, yaygınlığı ve sıklığı yaşın ilerlemesiyle artar. Hastalıkta ilerlemiş hafıza kaybı ve idrak fonksiyonlarındaki gerileme, klinik olarak ortaya konmuştur. Ciddi kortikal fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak, hastada bunama, konuşma kaybı, hareketsizlik ve zayıflama görülür. Pnömoni ya da idrar yolları enfeksiyonları, yaygın ölüm nedenlerindedir. Etyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır ve mental becerilerin iyileştirilmesinde efektif bir tedavi yöntemi yoktur. AD, nörofibriler yumaklar ve amiloid plak birikimi ile karakterizedir (Şekil 2.7 ve Şekil 2.8) (120). Nörofibriler yumakların oluşumu, tau proteinin hiperfosforilasyonu nedeniyledir. Sağlıklı bireylerde tau proteini, hücre iskeletinin bütünlüğünün korunmasında ve mikrotübüllerin stabilizasyonunda rol oynamaktadır. Tau proteinin nasıl hiperfosforile olduğu henüz tam olarak belli değildir. Ancak bu hiperfosforilasyon, sadece Alzheimer hastalığına has değildir; farklı tip demanslarda, hatta Parkinson hastalığının patolojisinde bile ortaya çıkmaktadır (29).



Şekil 2.7. AD'da nörofibriler düğümler (121) **Şekil.2.8.** AD'da, amiloid plaklar (121)

Amiloid plaklar ise, AD'nın ikinci nöropatolojik özelliğidir. Organizmada amiloid prekürsör proteinin (APP) proteolitik olarak işlenmesi sırasında oluşmaktadır. APP, sekretazlar adı verilen bir grup enzim ile kesilerek farklı

uzunluklarda fragmentler meydana getirmektedir. APP'nin α -sekretaz enzimi ile kesilmesi sonucunda oluşan ürünler toksik değildir. En toksik fragment, 42 amino asitten meydana gelen ve amiloid plakların oluşumunda rol oynayan, A β 42'dir. A β 42, APP'nin β ve γ -sekretaz enzimleri ile kesilmesi sonucunda oluşmaktadır. Alzheimer hastalığında kolinerjik sistem de, büyük oranda etkilenmektedir. Hastalığın gelişimi sırasında gözlenen sinaptik kayıp, özellikle önbeyin, korteks ve hipokampusta bulunan ve kolinerjik nöronal markerlar olan kolinasetiltransferaz (ChAT) ve asetilkolinesteraz aktivitesinde bir azalma ile ilişkilidir. AD'nda, hastalığın ilerlemesi ile AChE'nin miktarı azalırken, BChE ise önemli oranda bir artış göstermektedir (115). Kanıtlar, kolinesterazların amiloid plak oluşumuyla ilgili olduğunu göstermektedir. Hem AChE, hem de BChE'nin plak oluşumundaki en önemli olay olan β -amiloid peptidin birikimini artırdığı ve AChE ve BChE inhibisyonu ile β -amiloid proteinlerin toksik etkilerinin azaldığı görülmüştür [13]. Ayrıca AChE'nin periferik anyonik bölge aracılığıyla amiloidojenik olmayan A β 'ya bağlandığı ve konformasyonel değişimi indükleyerek amiloidojenik forma dönüşümü sağlayan bir şaperon gibi etki ettiği ileri sürülmüştür (85).

AD'nin moleküler patogenezinin anlaşılması ve etkili farmakolojik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için çok yoğun çaba harcanmakla birlikte, şu anda kullanılan başlıca terapötik yaklaşım, kolinesteraz inhibitörlerinin kullanımı ile kolinerjik fonksiyonun düzeltilmesi ve böylece beyindeki asetilkolin düzeylerinin artırılmasıdır (29).

2.4.1. Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanılan AChE İnhibitörleri

Kolinesteraz inhibitörleri, kolinerjik sistemi aktive etmeleri nedeniyle AD'nin tedavisinde ümit vermektedir. Günümüzde, AD'nin tedavisinde kullanılan ilaçlar donepezil, galantamin, rivastigmin ve memantindir (122). Bu ilaçlardan, memantin, N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörlerinin non-kompetitif antagonistidir (123). Diğer üç ilaç; donepezil, galantamin ve rivastigmin ise kolinesterazların inhibitörleridir (122).

Donepezil (Aricept, Adonep, Yasnal), hem AChE hem de BChE'nin geri dönüşümlü inhibitörüdür. AChE'ye olan afinitesi, BChE'ye olan afinitesinden ~ 1000

kat daha yüksektir. Vücutta plazma proteinlerle taşınır ve $t_{1/2}$ 'si ~ 3 gündür. Vücuttan kısmi olarak atılır, sitokrom P450 3A4 ve 2D6 izoenzimleri ile de kısmen metabolize edilmektedir (124,125).

Galantamin (Nivalin), $t_{1/2}$ 'si ~ 10 saat olan güçlü bir ilaçtır. Donezepil gibi, sitokrom P450 3A4 ve 2D6 izoenzimleri ile metabolize edilir (126). Hem α hem de periferik anyonik bölge ile etkileşime girerek AChE'nin non-kompetitif inhibitörü olarak etki eder. Galantamin, AChE ile etkileşiminin yanısıra, AChE reseptörlerini de allosterik olarak regüle etmektedir (127,128).

Rivastigmin (Exelon, Prometax, Ristidic, Vastigmex, Evertas), hem AChE'yi hem de BChE'yi inhibe eden bir karbamattır. Galantamin ve donezepil gibi karaciğerde detoksifiye edilmez, bunun yerine bir gün içinde böbreklerden elimine olur ve BChE ile temizlenmektedir (129).

Huperzin, AD'nın tedavisinde kullanılan diğer bir ilaçtır. Huperzin, A ve B olmak üzere iki ana formda bulunmaktadır. Huperzin A, tedavide Huperzin B'den daha etkili olduğundan, A varyantı daha çok farmakolojik amaçlar için kullanılmaktadır. Huperzin A, NMDA reseptörünün güçlü bir antagonisti olup, AChE'yi non-kompetitif olarak inhibe ederken, BChE'yi inhibe etmektedir. Ayrıca oksidatif stresin düzenlenmesinde, periferik ve MSS'deki antioksidanların düzeyinin artırılmasında rol oynar. Huperzin A'nın $t_{1/2}$ 'si ~ 12 saattir. Herhangi bir modifikasyona uğramadan idrar ile elimine edilir. Metabolizmasında sitokrom P450 1A2 ve 3A1/2 rol almaktadır. Huperzin, Çin ve diğer bazı ülkelerde nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak AB ülkelerinde ve ABD'de kullanımı onaylanmamıştır. ZT-1, huperzinin bir türevidir ve tedavi amaçlı kullanım için uygun olduğu düşünülmektedir. Huperzin A'nın aynı zamanda bir ön ilacı olup, ilk prelinik ve klinik testler için umut vadetmektedir (29).

Geçmişte, takrin ve metrifonat (triklorfon) gibi bazı ilaçlar da Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanılırken, yan etkilerinden dolayı geri çekilmişlerdir. Metrifonat, yakın zamanda antihelmintik kullanım için onaylanmıştır.

Metrifonat ve metrifonatin parçalanmasıyla oluşan 2,2-klorvinildimetilfosfat (diklorvos), kan-beyin bariyerinden geçerek hem AChE'ı hem de BChE'ı geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir (130,131).

2.4.2. AChE'ı İnhibe Eden Toksinler

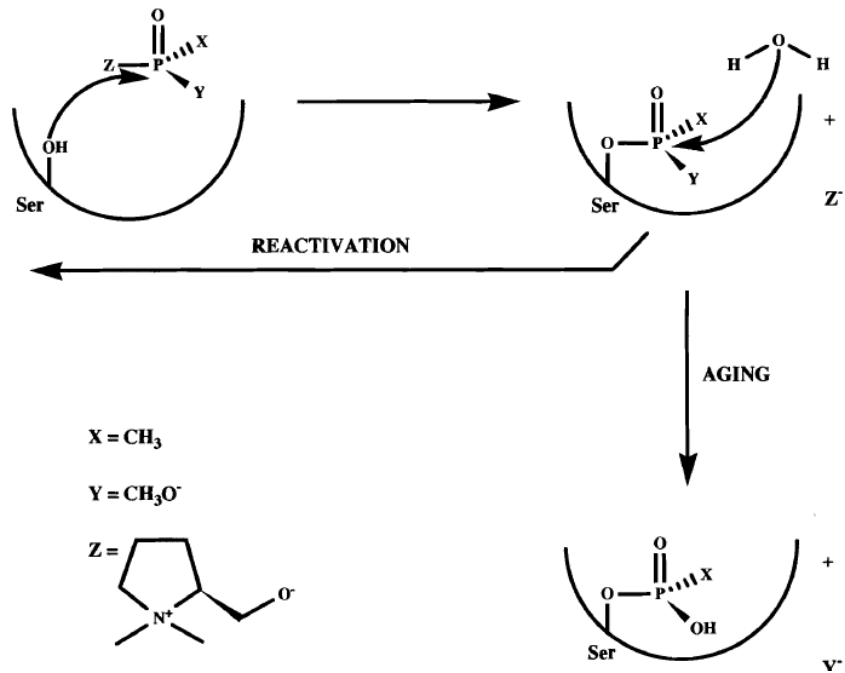
AChE'ı inhibe eden toksinler, iki ana gruba ayrılır: Organofosfat bileşikleri ve karbamatlar. Bazı organofosfatlar, aktif merkezdeki serine bağlanarak AChE'ı geri-dönüşümsüz olarak inhibe etmektedirler.

Genel olarak bilinen üç grup AChE inhibitörü bulunmaktadır: Askeri amaçlı kullanılan sinir ajanları, pestisidler ve ilaçlar. AChE'ı inhibe eden toksinlerle zehirlenmenin klinik belirtileri muskarinik, nikotinik ve santral belirtiler olarak özetlenebilir (132). Bazı karbamatlar, kan beyin bariyerini geçemediklerinden zehirlenmenin bazı belirtileri gözlenemezken, AChE'ın organofosfat inhibitörleri, tipik olan tüm zehirlenme belirtilerine neden olmaktadır (133). MSS'inde AChE'ın uyarılması sırasında gözlenen zehirlenmenin santral belirtileri, anksiyete, huzursuzluk, başağrısı, titreme, konfüzyon, konsantrasyon problemi ve uyuşukluk gibi klinik semptomlar ile sonuçlanmaktadır (132,134). Zehirlenme ciddi boyutlarda olursa solunum depresyonu ve konvülsiyonlar görülebilmekte, bezlerde ve düz kaslarda AChE'ın inhibisyonu ile göz yaşarması, ağız sulanması, bronşlarda aşırı salgılanma, miyozis, ishal ve bradikardi gibi muskarinik belirtiler gözlenmektedir. Ganglionlarda ve iskelet kaslarında AChE'ın inhibisyonu ise solgunluk, taşikardi ve hipertansiyon şeklinde nikotinik belirtilerin gözlenmesine neden olmaktadır (132,135).

Şu ana kadar bilinen 2 grup sinir ajanı mevcuttur: G ve V serileri. Her iki seri toksisiteleri, toksikokinetikleri ve vücut içerisindeki penetrasyonları açısından farklılıklar göstermektedir (132). Ayrıca her iki grup sinir ajanı, enzimlerin aktif merkezinde bulunan serinin esterefikasyonuna neden olarak kolinesterazları güçlü ve geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Sarin, soman, tabun ve siklosarin, G serisinin örneklerindedir. Kimyasal açıdan bakıldığında, G sinir ajanları O-alkil, alkil fosfonofloridat veya O-alkil N,N-dialkil fosforamidat yapısındadır. V serisi sinir ajanları ise; S-2-dialkilaminoetil alkilfosfonotiolat, dialkil S-2-dialkilaminoetil

fosforotolat ve S-2-dialkilaminoetil alkilfosfonoselenoat yapısındadır. VX, VR ve VC olarak bilinen sinir ajanları V serisinin örneklerindedir. V sinir ajanlarının toksisitesi, G sinir ajanlarına göre daha fazladır. Tabun, askeri sinir ajanlarından en az toksik olanıdır. Solunum yoluyla alındığında VX, ilk bilinen sinir ajanı olan tabundan 25 kat daha toksiktir. Askeri amaçlı kullanılan sinir ajanları yüksek oranda toksiktir. Bu nedenle sinir ajanları, tarımsal amaçlı ya da diğer amaçlar için kullanılamaz (135,136).

ACHe'nin inhibisyonunu baz alarak etki eden insektisitler ise 2 gruba ayrılmaktadır: Organofosfat bileşikleri ve karbamatlar. Her iki grup, kolinesterazların aktif bölgesindeki serine bağlanmaktadır. Organofosfat insektisitleri serinin tersinmez esterefikasyonuna neden olurken, karbamatlar karbamoilasyon adı verilen reaksiyonu gerçekleştirerek kolinesterazların görünür tersinmez inhibisyonunda rol oynamaktadır. Karbamatın enzimin serin grubuna bağlanması yeterince sıkı değildir ve bağın spontan olarak hidrolize uğraması ile enzim, aktivitesini geri kazanmaktadır (137). Aktif serine bağlı organofosfat grubu ise buradan ayrılmakta, bununla birlikte fosforile enzim, su ile ya da oksimlenenler gibi sudan güçlü nükleofiller kullanılarak spontan deaçilasyonla reaktif edilebilmektedir. Eğer organofosfat eklenti ürünleri (POX) yaşlanma (aging) adı verilen bir dealkilasyon reaksiyonuna uğrarsa fosforillenmiş enzim bir daha reaktif edilemeyen yaşlanmış türevlerine dönüşmektedir (84,138,139) (Şekil 2.9).



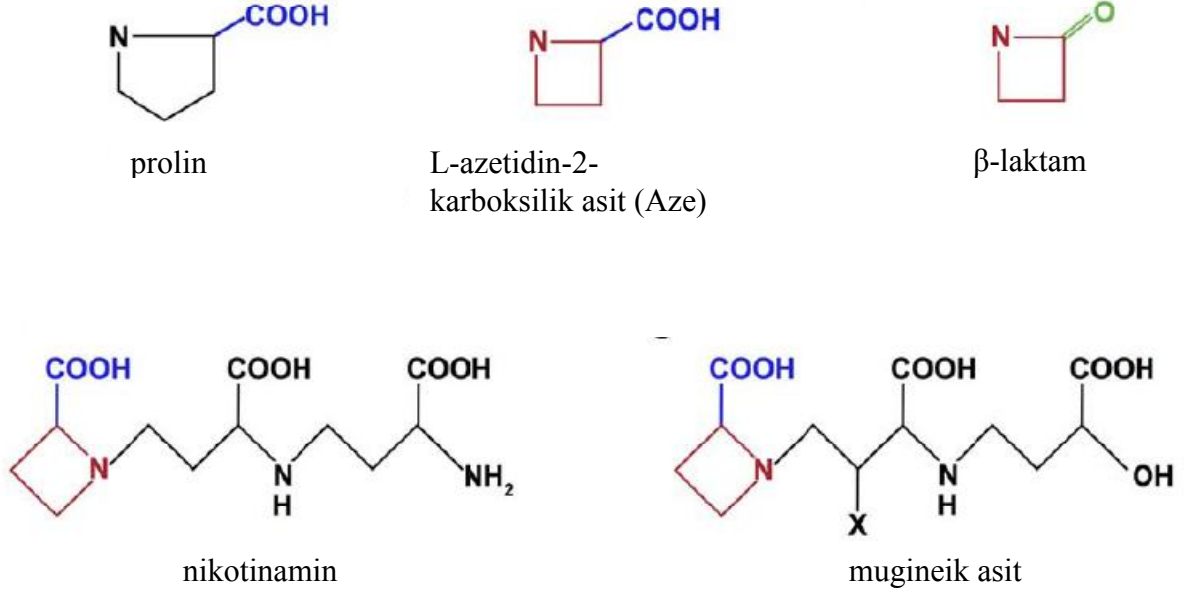
Şekil 2.9. AChE'nin fosforilasyonu reaksiyonu (140)

En iyi karakterize edilen yaşlanma reaksiyonu AChE'nin soman ile inhibe edilmesidir. Bu ve benzeri sinir ajanları ile yaşlanma çok hızlı olup dakikalar içinde gerçekleşirken, paraxon ya da etildiklorvos gibi pestisidler ile yaşlanmanın günler sürdüğü bilinmektedir (84,139).

2.5. Prolinlerin Dağılımı, Sıklığı ve Poliprolinlerin İnsan Proteomundaki Dağılımı

Yaklaşık 900 adet doğal olarak oluşan amino asit mevcuttur. Ancak bunlardan yalnızca 21 tanesi insan proteinlerinin bir araya gelmesinde görev alır (141,142). Bu amino asitlerden biri olan prolin her açıdan çok farklı bir amino asittir; bu özgün özellikleri sayesinde proteinlerin yapı ve fonksiyonlarına katkıda bulunur. Williamson ve MacArthur daha önce yaptığı çalışmalarla bazı proteinlerde prolince zengin bölgeleri analiz etmişlerdir (143,144). Prolin azotu, molekülün beş üyeli halkasına kovalent bağlıdır. Bu sayede bir proteinde veya bir peptitte yer alan peptid bağı oluşumundaki fi (ϕ) açısını belirgin şekilde kısıtlamaktadır (Şekil 2.9).

Prolin, olası lokal bir yük dağılım değişimleri gibi göze çarpmayan ufak etkilere cevap olarak trans konfigürasyonuna olduğu gibi cis konfigürasyonuna da kolayca adapte olur. Bu sıradışı davranış, prolillerin bölgesel amino asit doğrultusuna doğru bükülme eğilimini ve bu yüzden meydana gelen protein katlanmasına açıklama getirmektedir (145).



Şekil.2.10. Prolin ve ilişkili homologların yapıları (146).

Azot atomuna sadece bir hidrojenin bağlanmasıyla, prolin proton veremez ancak proton akseptörü olarak rol oynayabilir. Proliller alfa ve beta tabakaların dışında bir yönelim gösterirler, ancak bu motiflerin sonlarında bulunabilirler. Başka bir deyişle, prolin bir alfa-heliks veya bir beta tabaka oluşumuna uyum sağlamak için yapının bel kemiğini inhibe ederek proteinin sekonder yapısını bozar. Prolin sınırlı olan ϕ (ϕ) açısıyla kendi sekonder yapısına sahiptir. Hidrofobisiteleri nedeniyle proteinin iç kısmında olma yönelimindedirler. Üçlü-prolin dizileri sağ-el dönüşümlü veya sol-el dönüşümlü olarak katlanabilir ve bunlar sırasıyla; poliprolin I (PPI) ve poliprolin II (PPII) olarak tanımlanır. Sol-el dönüşümlü versiyon çok daha yaygındır. Poliprolin heliksler lokal bir geometride keskin dönüşlere neden olur. Moleküler konformasyonlarındaki rollerine ek olarak, poliprolin II heliksleri, SH3, EVH1 ve WW motifleri sayesinde protein-protein etkileşimleri, sinyal iletimine aracılık etmek

gibi önemli rollere sahiptir. Yüksek prolin düzeyi ve uzun poliprolin zincirlerine sahip olmaları nedeniyle ortak fonksiyon gösteren proteinleri tanımlamak ve prolinlerin özgün yapısal özellikleri nedeniyle prolinlerin proteomdaki dağılımları günümüzde çok ilgi çekmektedir (146).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

Fetal sığır serumundan (FBS) saflaştırılmış AChE (147), Prof. Ashima Saxena (Walter Reed Army Institute of Research, USA) tarafından temin edildi ve kullanılıncaya kadar % 50 gliserol içerisinde -80 °C'de saklandı. FBS AChE'nin saflığı, SDS-PAGE sonrasında jelin Coomassie Brilliant Blue ile boyanması ile kontrol edildi ve enzim preparatının spesifik aktivitesi ölçülerek preparatın, % 99 saf olduğu bulundu. α -siyano-4-hidroksi sinnamik asit (α -CHCA), Fluka'dan (A.B.D) satın alındı; % 50 asetonitril/su-% 0.3 trifluoroasetik asit içinde 10 mg/ml olacak şekilde doymuş çözeltisi hazırlandı. Asetonitril, Fisher (A.B.D)'den; trifluoroasetik asit, Beckman (ABD)'den; 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) ve formik asit Sigma-Aldrich'den satın alındı. Diğer kullanılan tüm kimyasallar yüksek saflıkta olup, Sigma Aldrich veya Merck kaynaklıydı.

3.1.2. Aletler

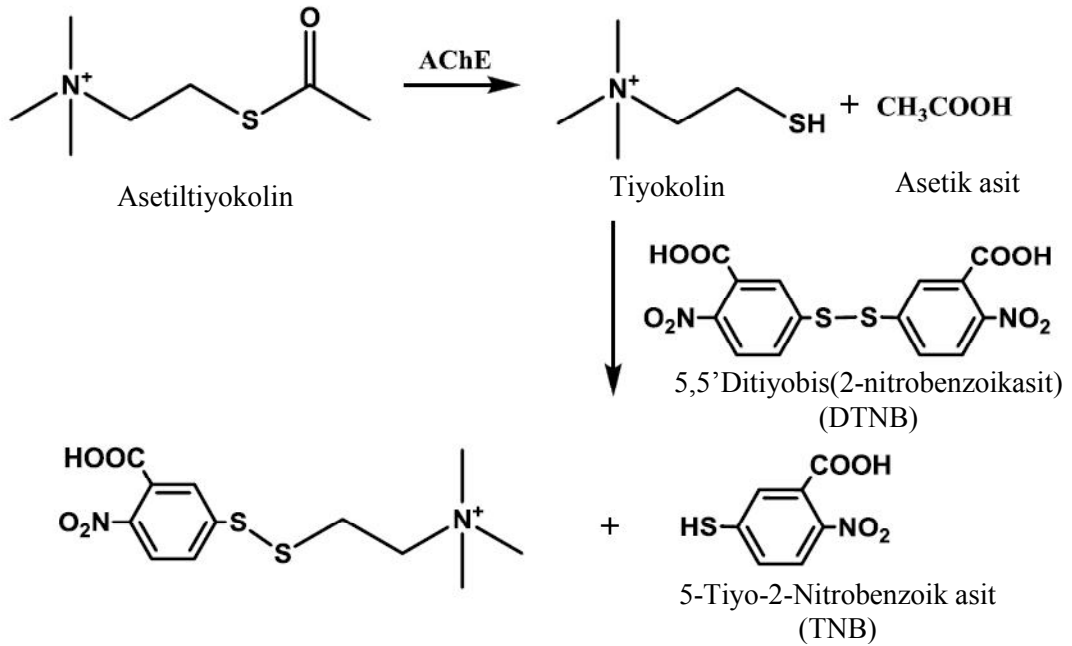
Aktivite ölçümlerinde Peltier donanımlı Shimadzu 1601 PC spektrofotometre kullanıldı. Poliprolin peptidler, Waters 625 HPLC sistemi (A.B.D) kullanılarak saflaştırıldı. Örnekler, MALDI plaklara yüklendi (Opti-TOF 384 well Insert, Applied Biosystems) ve 335 nm Nd-YAD lazer ile donanımlı Applied Biosystems MALDI-TOF-TOF 4800 kütle spektrometresi ile analiz edildi. LC/MSMS analizi, elektrosprey iyonizasyonu kullanan Orbitrap kuadropol kütle spektrometresi (Thermo Scientific, A.B.D) ile gerçekleştirildi. Bu analizde, C18 ters faz trap kolonu (CapTrap Peptide, Michrom BioResources, A.B.D) ve C18 ters faz ayrılma kolonu (Picofrit BioBasics C-18, New Objective, A.B.D) kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Asetilkolinesteraz Aktivitesinin Tayini

AChE aktivitesi, spektrofotometrik olarak 25°C’de Ellman yöntemine göre tayin edildi (Şekil 3.1) (148). Aktivite ölçümleri, substrat olarak 1 mM asetiltiyokolin ve renklendirme reaktifi olarak 0.5 mM 5,5’-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) içeren 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7.0) yapıldı. Asetiltiyokolinin hidrolizi, 412 nm’deki absorbans artışı üzerinden izlendi. AChE aktivitesi, absorbans-zaman eğrisinin ilk 60 saniyelik zaman içerisindeki lineer kısım kullanılarak hesaplandı. Bir ünite enzim, bir dakikada hidroliz edilen 1 µmol asetiltiyokolin olarak tanımlandı.

% 99 saflıktaki FBS AChE’ın pH 7.0 ve 25 °C’deki spesifik aktivitesi, 2160 ünite/mg protein olarak bulundu. Aynı preparat, pH 8.0’de analiz edildiğinde spesifik aktivitesi, 3000-3300 ünite/mg proteindir (30).



Şekil 3.1. AChE aktivitesinin Ellman yöntemi ile tayini (148)

3.2.2. Tetramerik Yapıyı Oluşturan Peptidlerin HPLC ile Saflaştırılması

Tetramer yapıyı organize eden peptidlerin HPLC ile saflaştırılması için örnekler hazırlandı: Öncelikle 14.1 ml FBS AChE'nin (350 U/ml) içinde bulunduğu % 50 gliserol içeren 50 mM sodyum fosfat pH 8.0 tamponu, 10 mM amonyum bikarbonat pH 8.1-% 0.01 sodyum azid içeren tampon ile değiştirildi. Bunun için, örnek, önce YM 30 membran kullanılarak Amicon karıştırıcı-hücre (10 ml, Millipore) ile 1 ml'ye konsantre edildi ve sonrasında örnek, 9 ml'ye dilüe edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak, örnek, 1.4 ml'ye konsantre edildi ($A_{280}=2.4$; ölçülen aktivite 2800 U/ml). Örneğin % 100 saf olduğu düşünülerek; 1 mg/ml FBS AChE için, A_{280} değeri 1.1 kullanıldığında, bu preparatın protein konsantrasyonu, 2.2 mg/ml olarak hesaplandı.

FBS AChE örneğinin (1.3 mg AChE/ml 10 mM amonyum bikarbonat pH 8.1-% 0.01 azid, 1.4 ml) su banyosunda 5 dakika kaynatılmasıyla poliprolin peptidlerin salınmasına izin verildi. Kaynatılmış AChE örneğinin pH'sı, trifluoroasetik asit ile pH 2'ye ayarlandı. Daha sonra örnek, 0.2 µm şırıngalı filtreden geçirilerek Waters 625 HPLC sistemine bağlı Zorbax 300 SB C-18 ters-faz kolonuna uygulandı. HPLC çalışmaları, oda sıcaklığında (22 °C), akış hızı 0.5 ml/dk olacak şekilde gerçekleştirildi [Tampon A,% 0.1 trifluoroasetik asit/su (v/v); tampon B, % 0.09 trifluoroasetik asit/asetonitril (v/v)]. Peptidler, % 0-60 gradient tampon B ile 60 dakikada elüe edildi. 210 nm'de absorbans izlenerek, fraksiyonların hacmi 0.5 ml/dk olacak şekilde toplandı. Daha sonra herbir fraksiyon, vakum santrifüj ile ~50 µl'ye konsantre edildi ve kütle spektrometre çalışmalarında kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklandı.

3.2.3. FBS AChE'dan Tetramer Yapıyı Oluşturan Peptidlerin Filtrasyon Yöntemi İle Ayrılması

Tetramer yapıyı oluşturan peptidleri direkt olarak MALDI plağına uygulamak veya Orbitrap analizini gerçekleştirmek için, FBS AChE'nin (2070 U/ml, 1.5 ml) içerdiği tampon, Amicon karıştırıcı-hücre kullanılarak su ile değiştirildi. Bu işlem dört kez tekrarlanarak, örnek hacmi 0.4 ml'ye indirildi. Poliprolin peptidlerin salınması için örnek, 5 dakika kaynatıldı ve proteinden salınan peptidleri ayırmak

için örnek, Microcon ultracel YM 10 membranından (MA 10 kDa'dan kesen) geçirildi. Daha sonra filtratın hacmi, peptidlerin son konsantrasyonunu, 25 mg/ml AChE örneğinden beklenen peptid konsantrasyonuna eşitlemek için, 0.1 ml'ye azaltıldı.

3.2.4. MALDI-TOF-TOF Kütle Spektrometresi

Tüm MALDI-TOF-TOF deneyleri, 335 nm Nd-YAD lazer ile donanımlı MALDI-TOF-TOF 4800 (Applied Biosystems) kütle spektrometresinde gerçekleştirildi. Örnekler (0.5 µl), MALDI hedef plağına (Opti-TOF 384 well, Applied Biosystems) uygulandı ve havaya karşı kurumasına izin verildi. Daha sonra örneklerin üzeri, α -siyano-4-hidroksi sinamik asit matriksi (α -CHCA, 0.5 µl) ile kaplandı. Kütle spektrumları; pozitif iyon reflektör modunda, ertelenmiş ekstraksiyon şartlarında (500 ns), 20 kV ivme voltajı kullanarak, lazer yoğunluğu, 4000-6000 V arasında, kütle aralığı 1000-4000 Da seçilerek elde edildi. Seçilen iyonlar, çarpışma-indüklü ayrışma ile fragmentlerine ayrıldı [Kollezyon gazı, hava (2×10^{-6} Torr); prekürsör kütle penceresi, ± 1 Da; metastabil süpresyonu, açık; dedektör voltaj çoğaltıcı, 0.95; ertelenmiş ekstraksiyon değerleri, DE1=370 ns, DE2=37,271 ns ve zaman ayarlı iyon seçici, aktif]. MSMS spektrumundaki fragmentlerin kimlikleri, manuel olarak Proteomics Toolkit (<http://db.systemsbiology.net>)'in yardımıyla Data Explorer software ve Protein Prospector 5.9.4 içindeki MS Product algoritması kullanılarak (prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm) belirlendi.

3.2.5. LC/MSMS Orbitrap Kütle Spektrometresi

Orbitrap kütle spektrometresi için örnekler, aşağıda tarif edilen şekilde hazırlandı:

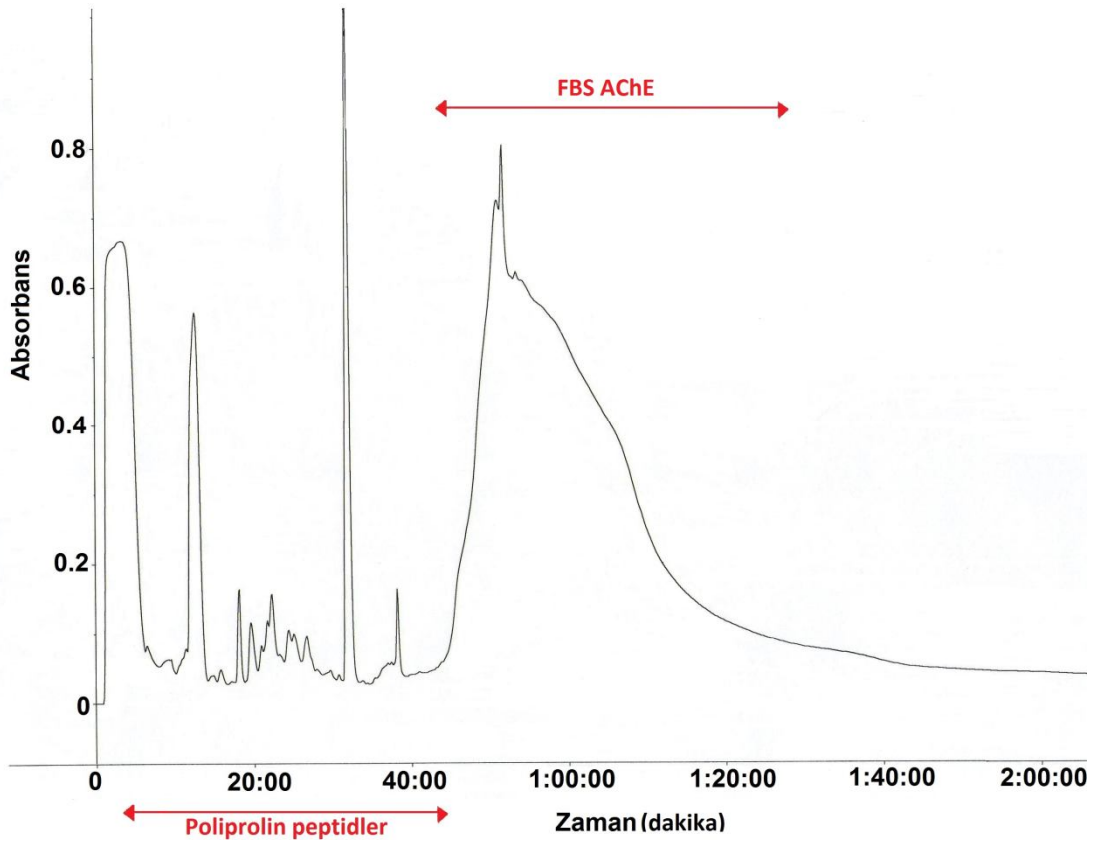
116 µM peptid çözeltisi hazırlamak için YM 10'dan filtre edilen kaynatılmış FBS AChE örneği (25 mg/ml su, 3.6 µl), % 0.1 formik asit (6.4 µl) ile dilüe edildi. LC/MSMS analizleri, elektrosprey iyonizasyonu kullanan LTQ Orbitrap kuadropol kütle spektrometresinde gerçekleştirildi.

Örnek (5 µl), Eksigent nanoLC 2D HPLC sisteminde C18 ters faz trap kolonuna yüklendi ve kolon, % 2 asetonitril/su ve % 0.1 formik asit ile yıkandı. Daha sonra, peptidler bir C18 ters faz ayırıcı kolona transfer edildi ve kolonun 45 dakika % 98 solvent A (% 2 asetonitril/su -% 0.1 formik asit) ve % 2 solvent B (% 98 asetonitril/su -% 0.1 formik asit)'den başlayarak, % 35 solvent A ve % 65 solvent B ile lineer gradient sonlanıncaya kadar yıkanması ile peptidler elüe edildi. Akış hızı 250 nl/dk olup, elüat, direkt olarak kütle spektrometresi içerisine elektrospreylendi. Fragmentasyon için çarpışma indüklü ayrışma (CID) kullanıldı [Normalize çarpışma enerjisi, 35; çarpışma gazı, helyum (1×10^{-3} Torr); aktivasyon zamanı, 30 ms; aktivasyon Q, 0.25]. Minimum sinyal yoğunluğu 50,000 cps olan herhangi bir yüke sahip ana iyonlar, fragmentasyon için seçildi. Fragmentasyon spektrumları manuel olarak Xcalibur software'ın Qual Browser özelliği kullanılarak analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Tetramer Yapıyı Oluşturan Peptidlerin HPLC ile Saflaştırılması

Peptidlerin FBS AChE'dan salınımını sağlamak amacıyla, örnek 5 dakika kaynar su banyosunda kaynatıldı ve sonrasında kaynatılmış FBS AChE örneğinin pH'sı trifluoroasetik asit ile pH 2'ye ayarlandı. HPLC çalışmaları, oda sıcaklığında (22 °C) ve akış hızı 0.5 ml/dk olacak şekilde gerçekleştirildi. HPLC elüantları, 1 dakikalık fraksiyonlar (her biri 0.5 ml) halinde 5. dakikadan 40. dakikaya kadar toplandı. Şekil 4.1, FBS AChE'daki peptidlerin HPLC ile saflaştırılmasına ait profili göstermektedir.



Şekil 4.1. FBS AChE'daki peptidlerin HPLC ile saflaştırılması. 1 mg/ml FBS AChE'in (2800 U/ml, AChE/ml 10 mM NH_4HCO_3 -% 0.01 azid) 1.4 ml'si HPLC kolonuna enjekte edildi. Akış hızı, 0.5 ml/dk; fraksiyon hacmi, 0.5 ml.

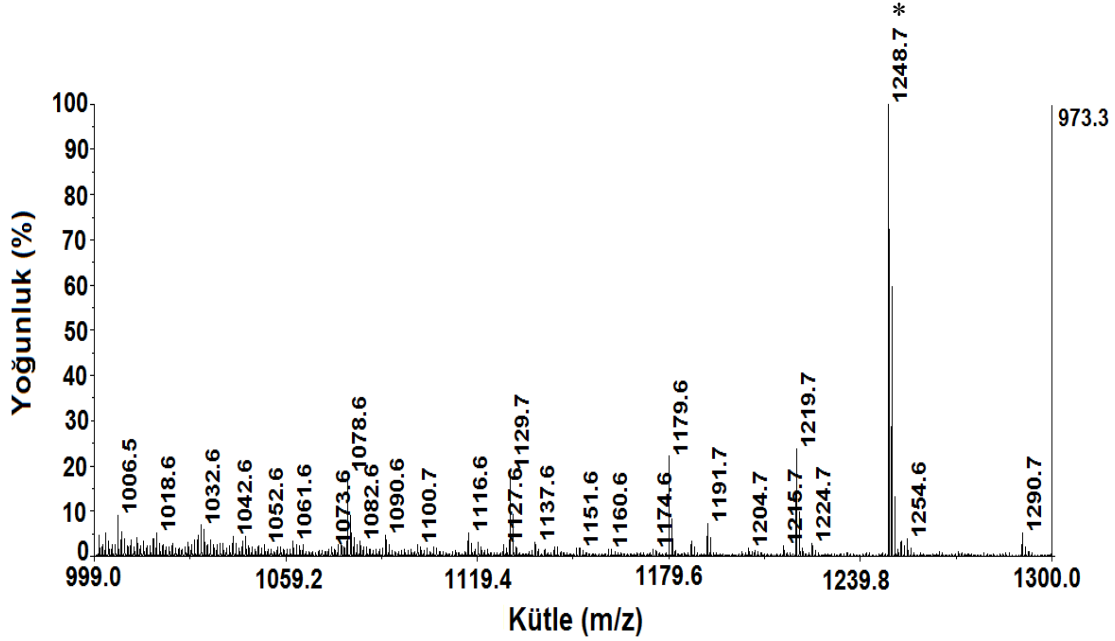
4.2. MALDI- TOF Kütle Analizi

HPLC'den elüe edilen her fraksiyon (5-40 dk), vakum santrifüj ile ~50 µl'ye konsantre edildi ve kütle spektrometre analizlerinde kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklandı. Daha sonra her bir fraksiyon için (A1-B12) ayrı ayrı MS analizi yapıldı (Tablo 4.1, Şekil 4.2-17). Kütle spektrumu, hedef spot üzerinde rastgele seçilen bölgelere ortalama 500 lazer atışı yapılarak gerçekleştirildi (Her bölgeye 50 sinyal).

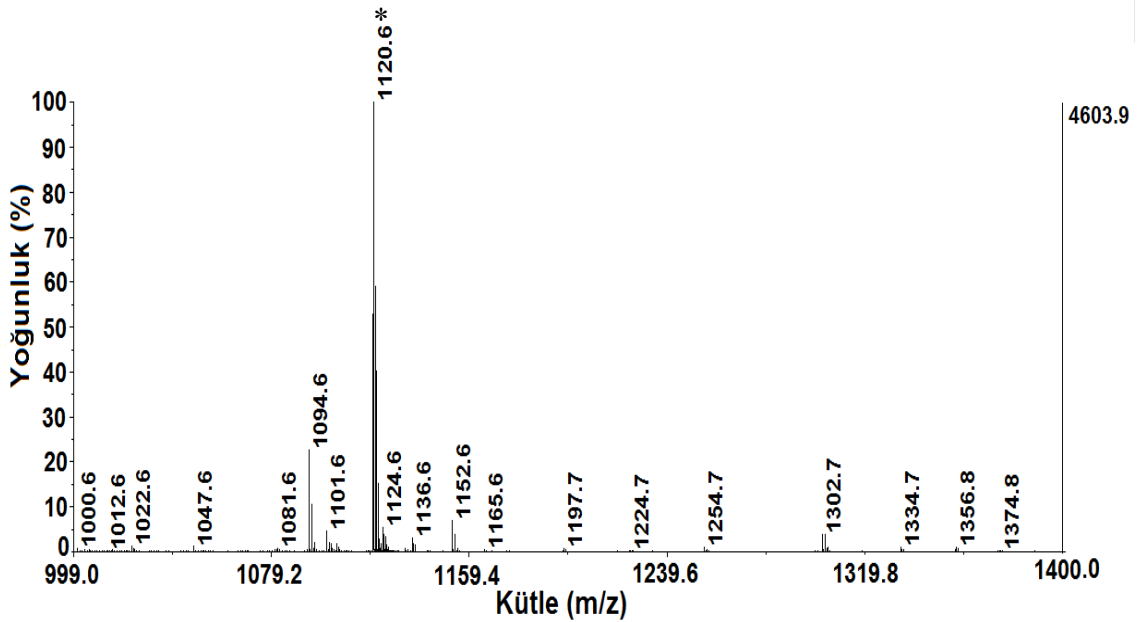
Tablo 4.1. HPLC elüentleri için MALDI TOF ile kütle analizi

Spot No	Dakika	MS				
A1	5-6					
A2	6-7					
A3	7-8					
A4	8-9					
A5	9-10					
A6	10-11					
A7	11-12					
A8	12-13					
A9	13-14					
A10	14-15					
A11	15-16					
A12	16-17					
A13	17-18	1248.7				
A14	18-19					
A15	19-20					
A16	20-21	1120.6				
A17	21-22	1120.6	1721.9			
A18	22-23	1788.0	1885.1	1972.0		
A19	23-24					
A20	24-25	1194.6	1389.8	1885.0	1972.0	2069.1
A21	25-26	1236.7	1574.9	2069.1		
A22	26-27	1069.7	1236.7	1574.9	2348.4	2444.4
A23	27-28	1787.9	1885.0	2347.3	2445.4	
A24	28-29	1086.7	1349.8	2445.4	2542.5	
B1	29-30	1065.7	1349.9			
B2	30-31					
B3	31-32	1077.7	1209.8	2195.2	2542.5	
B4	32-33	1029.6	1077.7	1091.6	1496.9	
B5	33-34	1029.6	1496.9	1654.9		
B6	34-35	1029.6	1654.9			
B7	35-36					
B8	36-37					
B9	37-38					
B10	38-39					
B11	39-40	1770.9				
B12	40-41	1770.9				

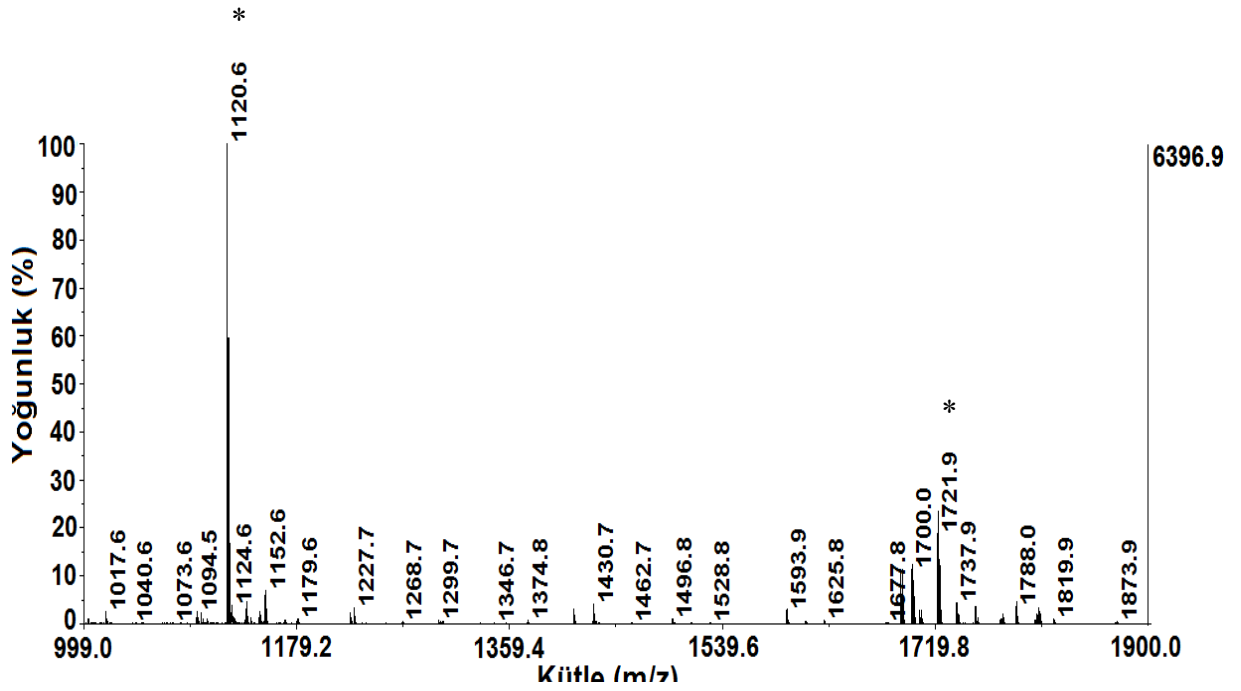
Çıkan sonuçlar doğrultusunda, çalışmada yüksek yoğunluk gösteren piklerin (*) herbiri için ayrı ayrı MSMS analizi yapıldı.



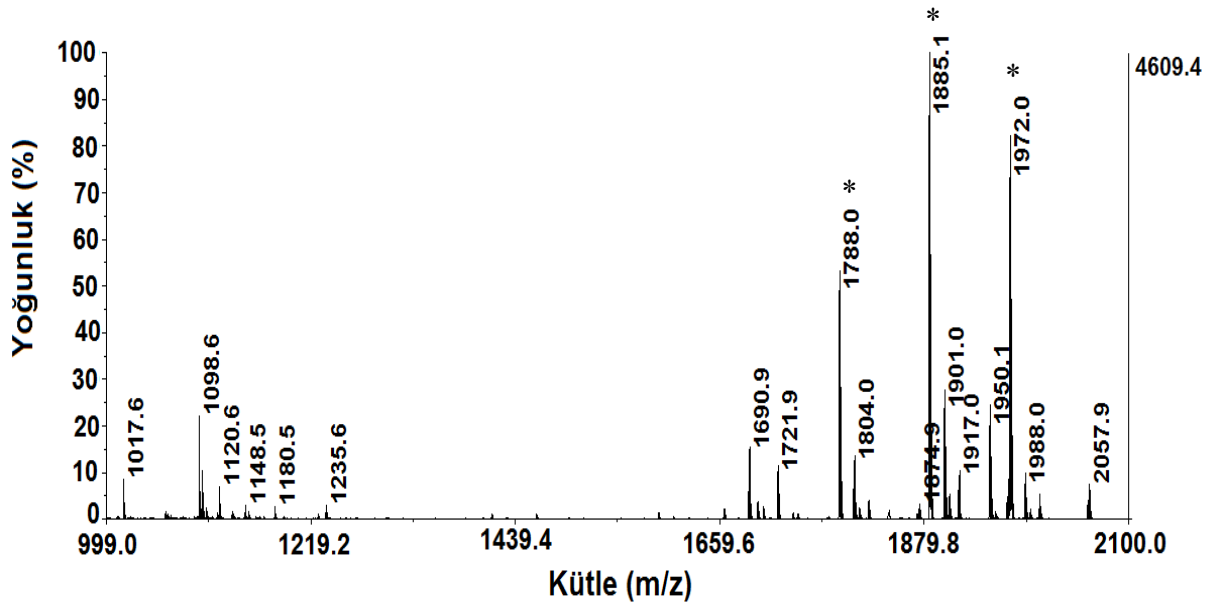
Şekil 4.2. HPLC çıktısı A13 (17-18. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



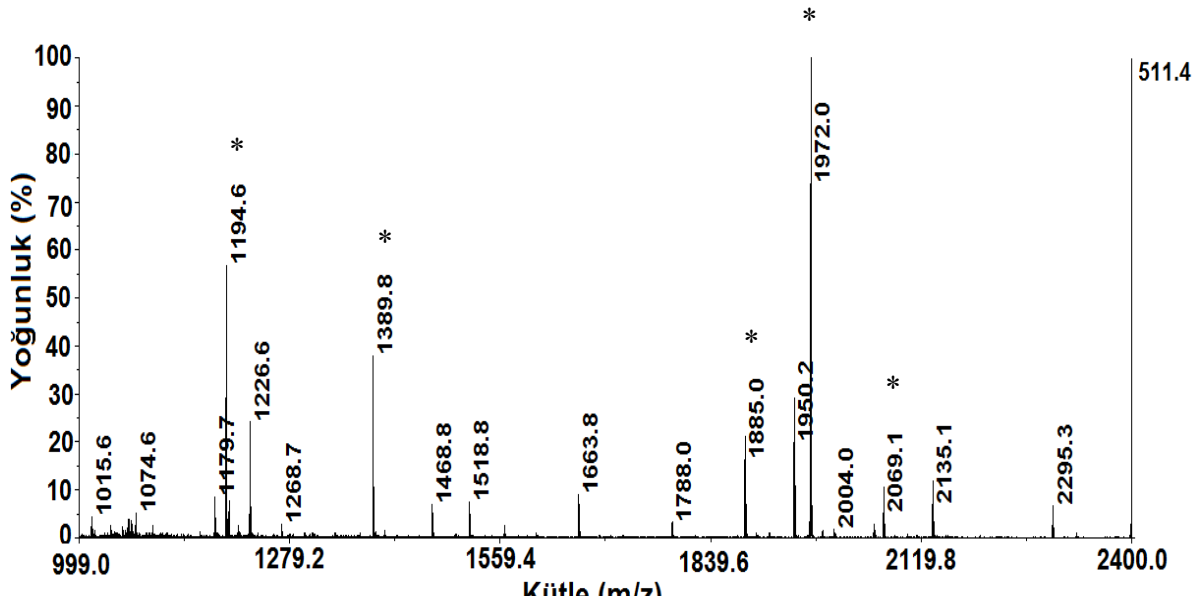
Şekil 4.3. HPLC çıktısı A16 (20-21. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



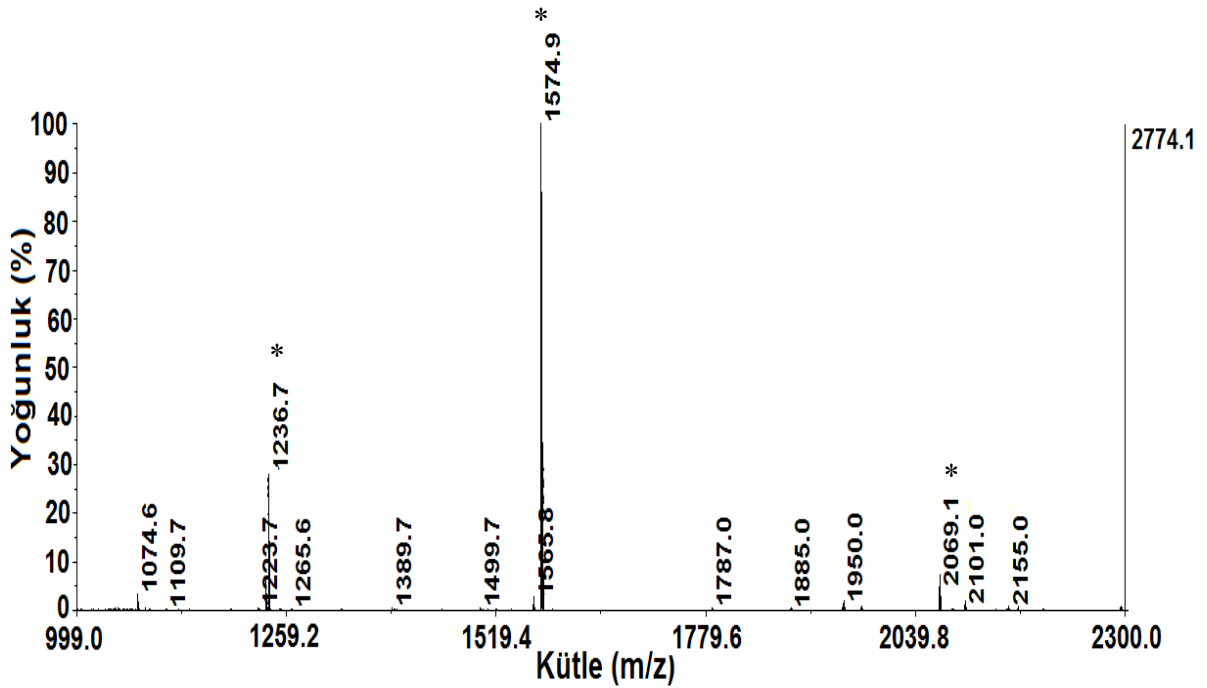
Şekil 4.4. HPLC çıktısı A17 (21-22. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



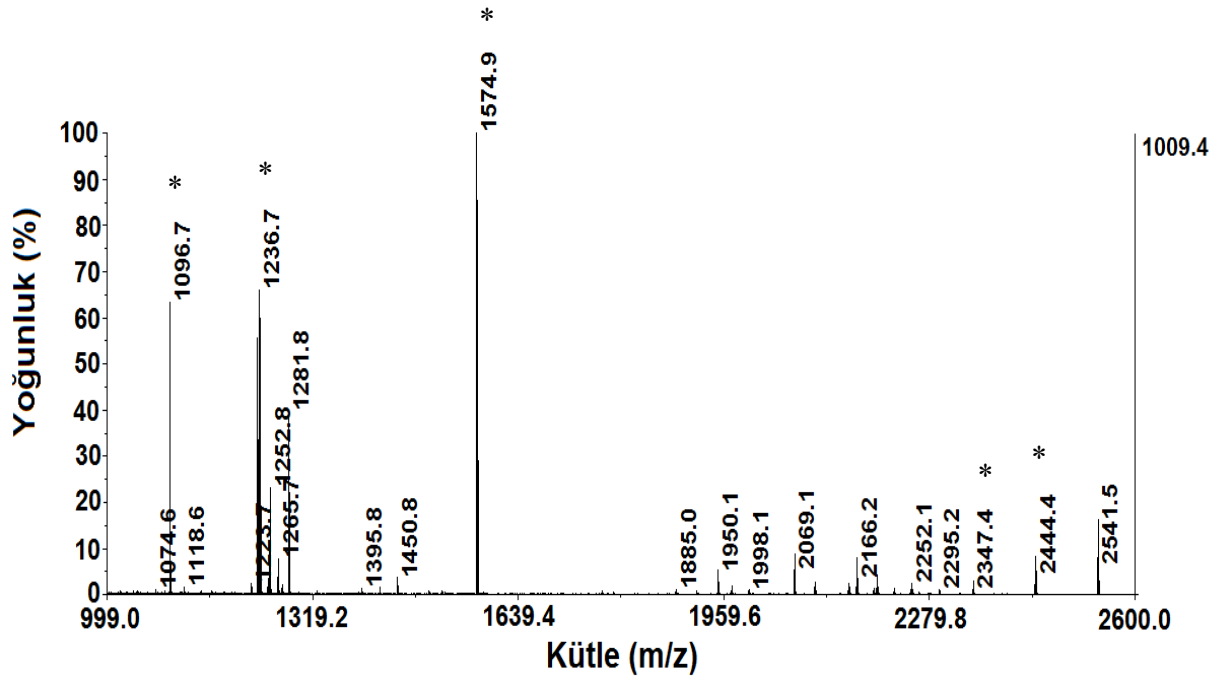
Şekil 4.5. HPLC çıktısı A18 (22-23. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



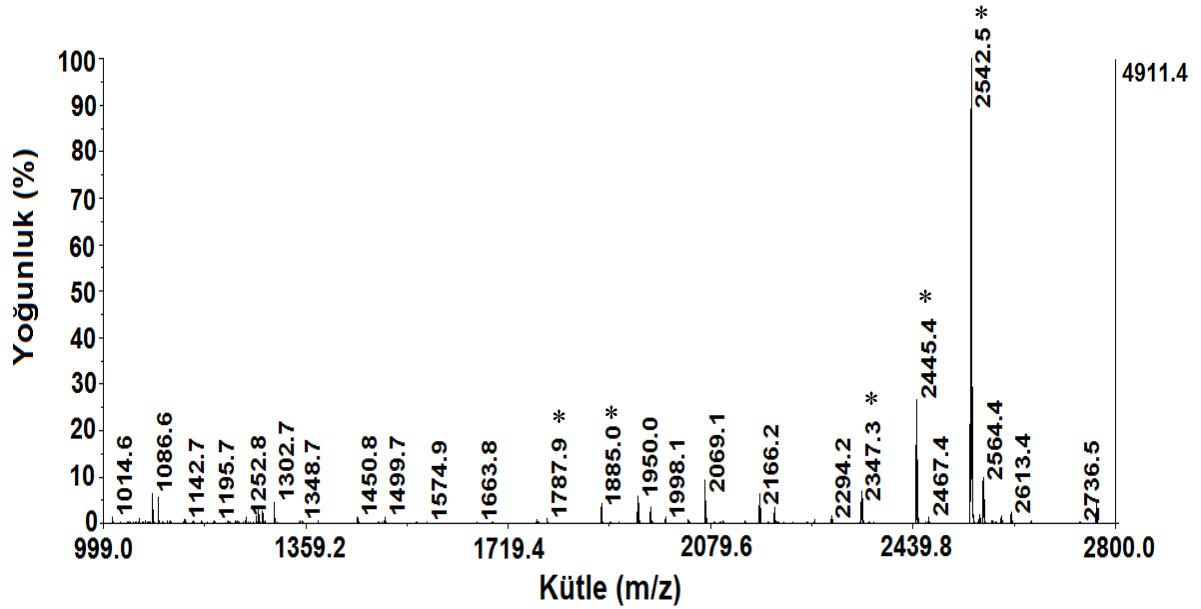
Şekil 4.6. HPLC çıktısı A20 (24-25. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



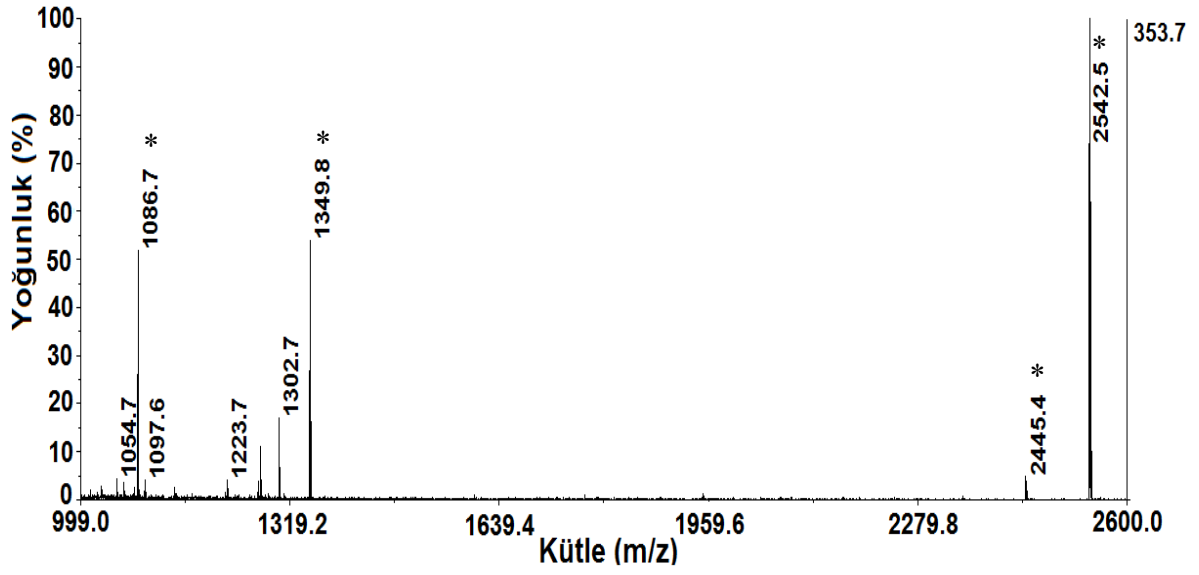
Şekil 4.7. HPLC çıktısı A21 (25-26. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



Şekil 4.8. HPLC çıktısı A22 (20-21. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



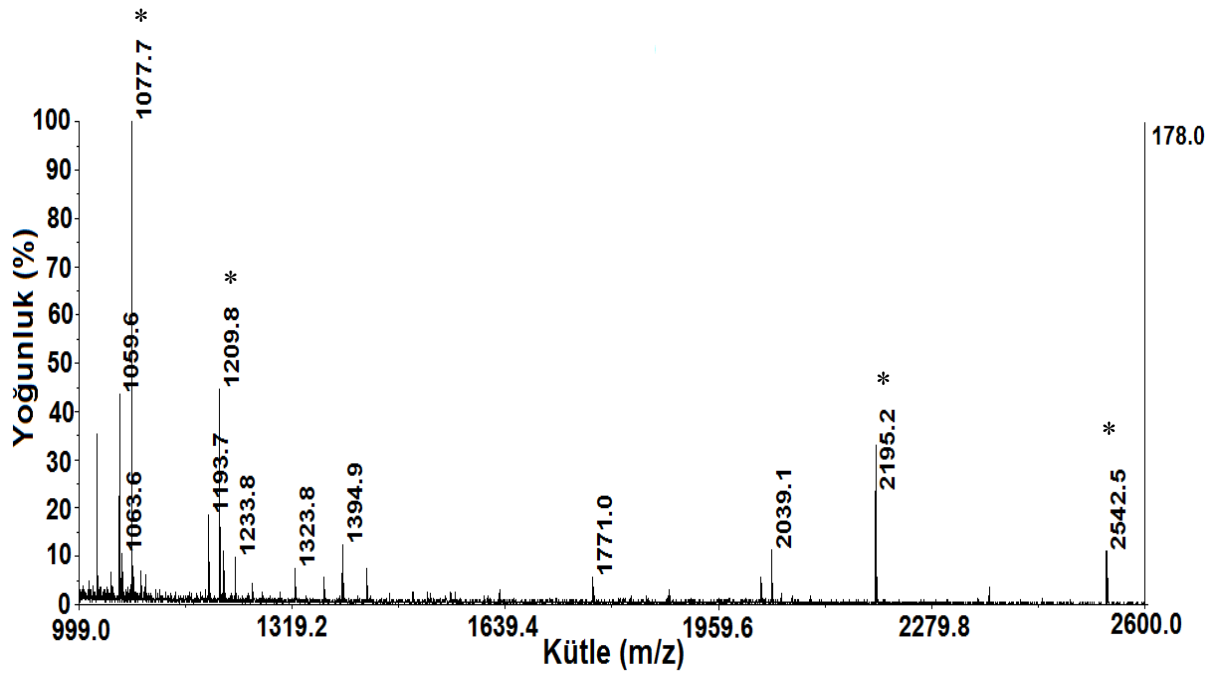
Şekil 4.9. HPLC çıktısı A23 (27-28. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



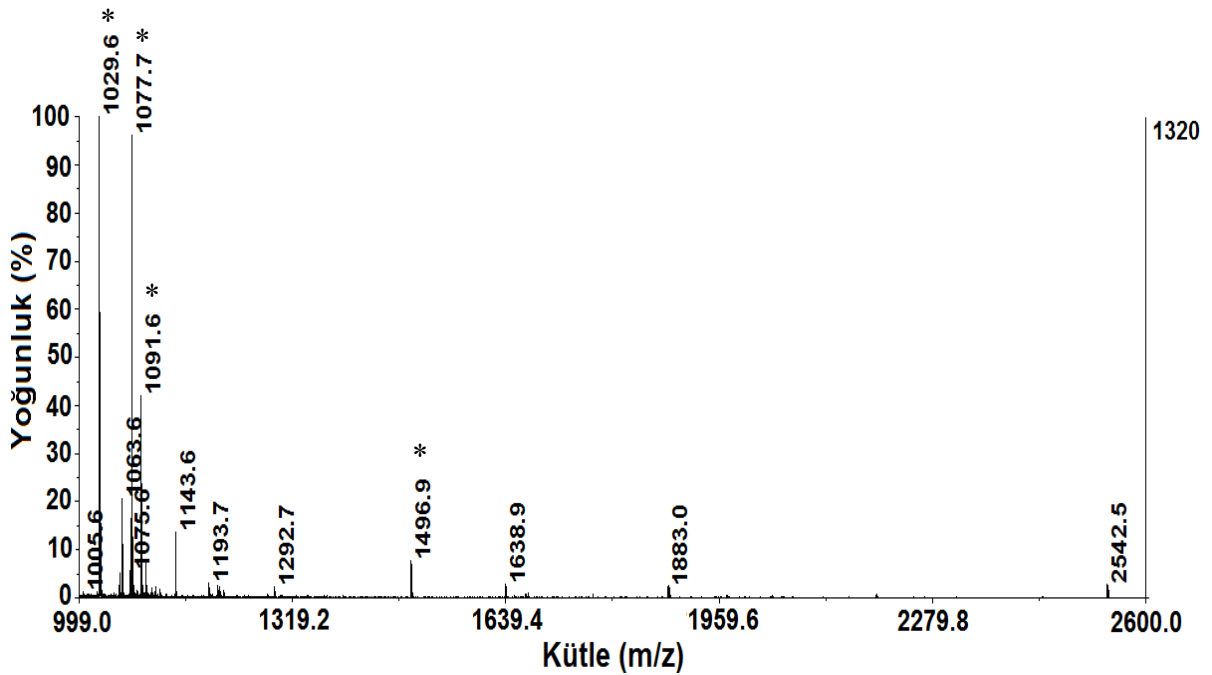
Şekil 4.10. HPLC çıktısı A24 (28-29. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



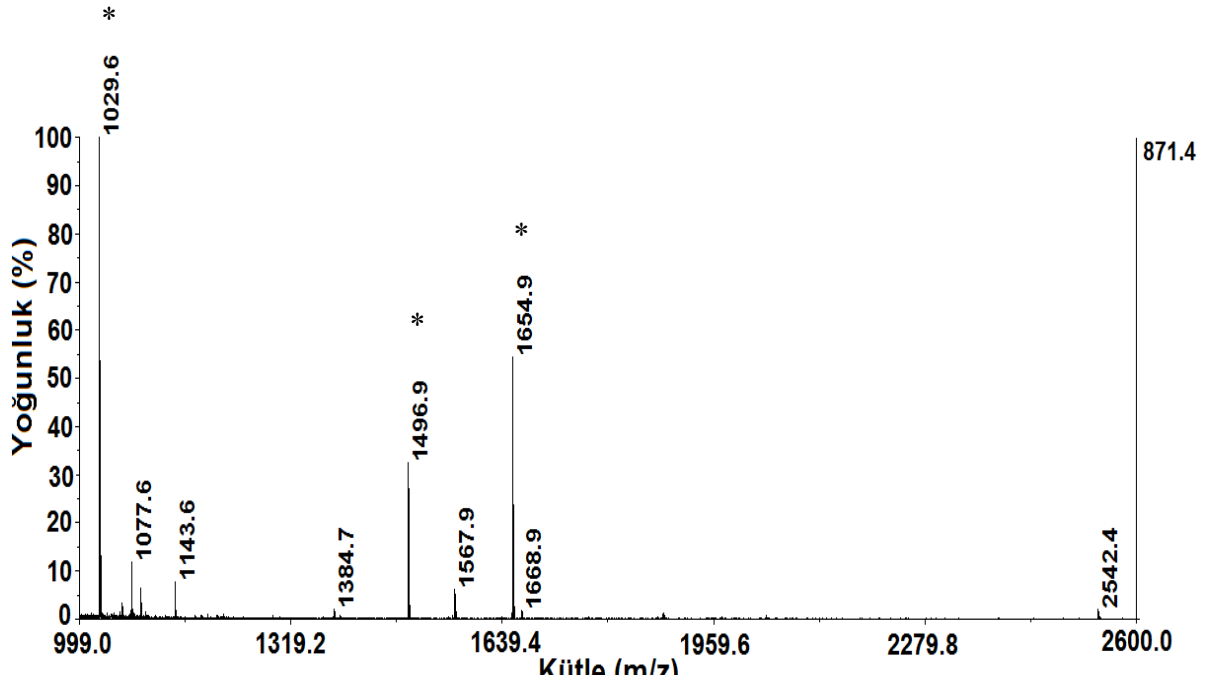
Şekil 4.11. HPLC çıktısı B1 (29-30. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



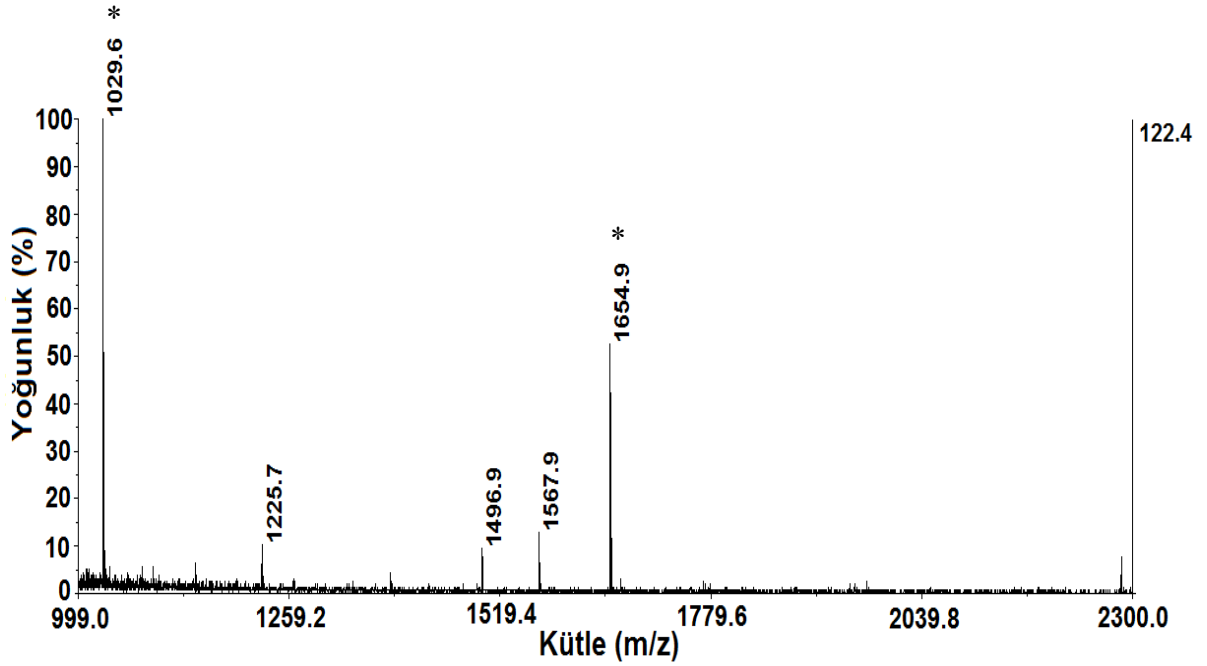
Şekil 4.12. HPLC çıktısı B3 (31-32. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



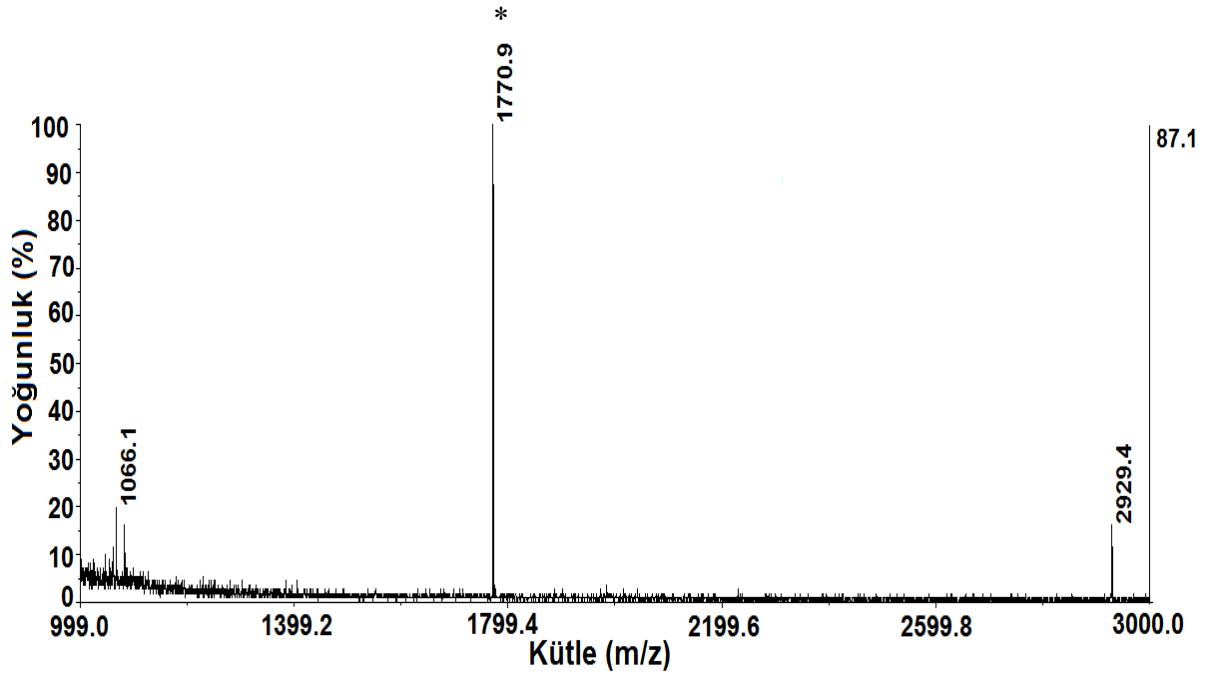
Şekil 4.13. HPLC çıktısı B4 (32-33. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



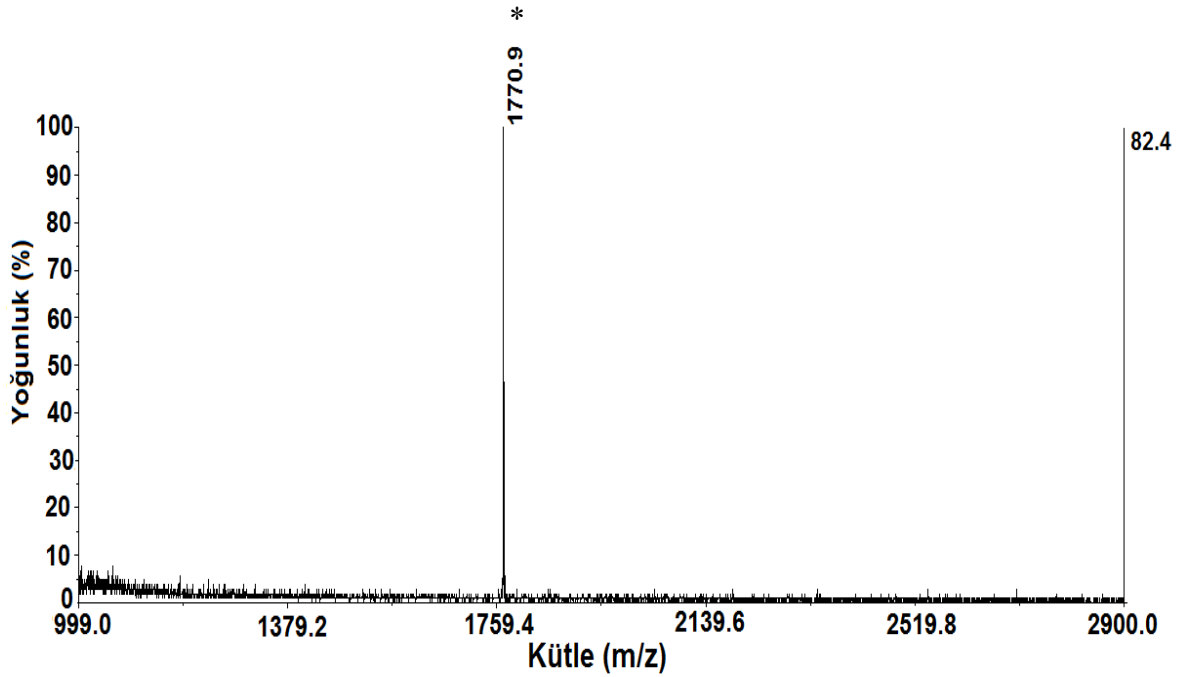
Şekil 4.14. HPLC çıktısı B5 (33-34. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



Şekil 4.15. HPLC çıktısı B6 (34-35. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

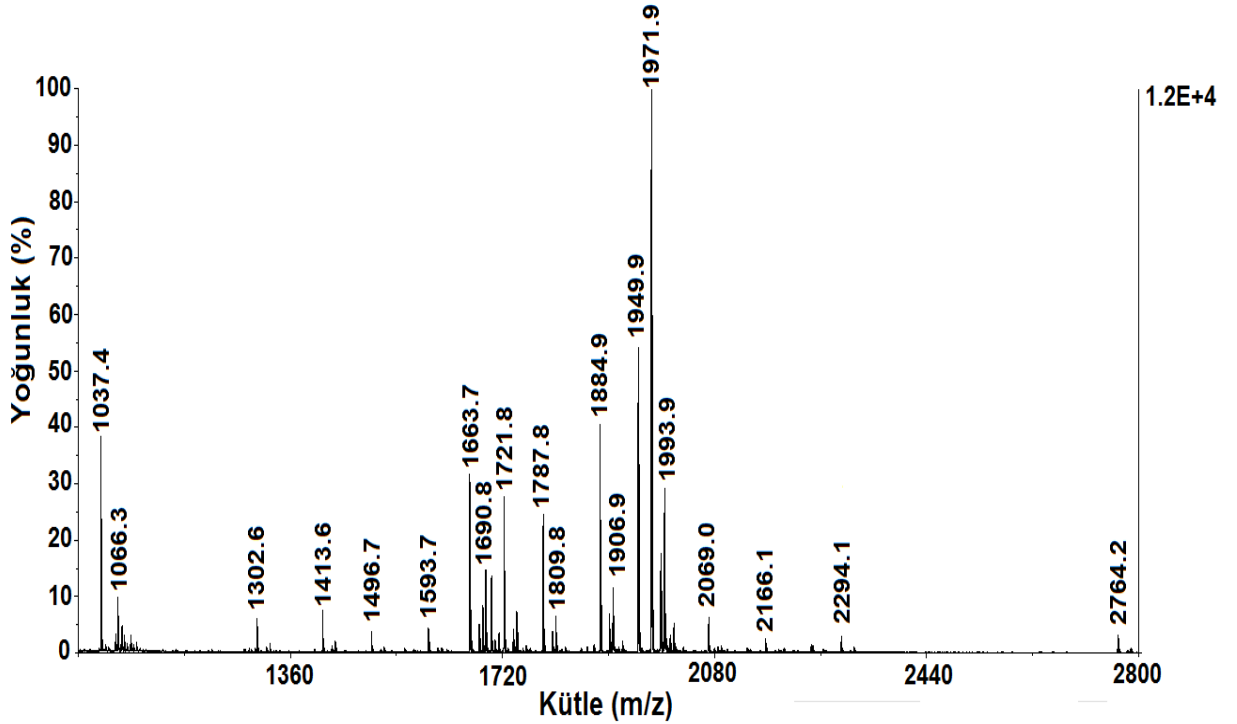


Şekil 4.16. HPLC çıktısı B11 (39-40. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.



Şekil 4.17. HPLC çıktısı B12 (40-41. dakika) fraksiyonu için MALDI TOF kütle analizi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

FBS AChE'dan salınan tetramer yapıyı oluşturan peptidleri tek bir çatı altında toplamak için, kaynatılmış ve YM 10 membranından geçirilen örnek, doğrudan MALDI plağına uygulandı. Şekil 4.18, örneğin MALDI TOF kütle spektrumu olup, salınan peptidlerin kütlelerini (1037-2764 Da) göstermektedir. MALDI-TOF kütle spektrumundaki en göze çarpan üç pik (1949.9, 1971.9 ve 1993.9 Da) aynı peptidin sırasıyla; 1) protonlanmış formunu 2) tek-sodyum eklenmiş formunu ve 3) çift-sodyum eklenmiş formunu göstermektedir. Bu örnekteki tüm majör peptidler, MALDI kütle spektrometresinde çarpışma-indüklü fragmentasyona maruz bırakıldı. Örneklerin HPLC ile saflaştırılmadan önce ve sonrasında elde edilen kütle spektrumlarından kalitatif olarak aynı bilgi edinildi. Bununla birlikte HPLC ile saflaştırılmış peptidlerde daha iyi kalitede fragmentasyon spektrumu elde edilmiştir.



Şekil 4.18. FBS AChE'dan kaynatılma ile salınan peptidlerin MALDI kütle spektrumu. Peptidler, ana proteinden YM10 membranından (MA 10 kDa'dan kesen). filtre edilerek ayrılmıştır Sağ tarafta yer alan y-eksen, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

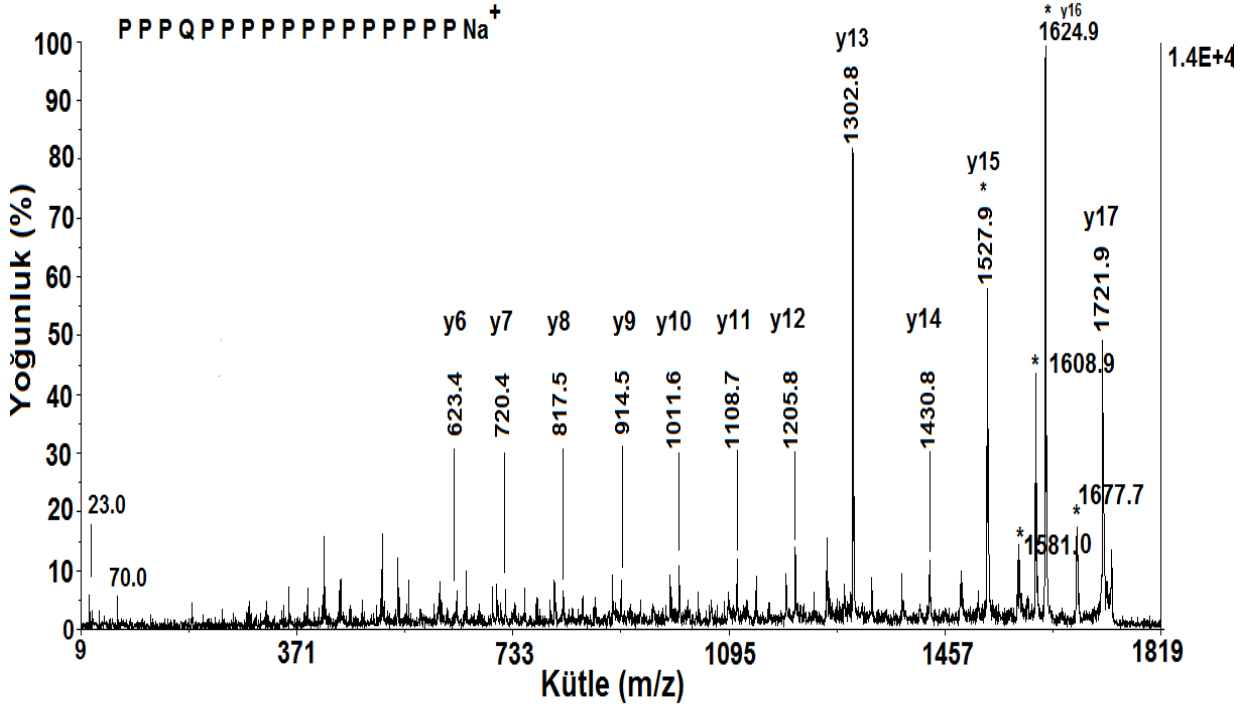
4.3. MALDI TOF MSMS Analizi

MALDI TOF MS spektrum analizinde bulunan sonuçlar ışığında, yüksek sinyal yoğunluğu gösteren her bir pik için MSMS analizi yapıldı. Dolayısıyla proline zengin peptidlerin yüksek sinyaller veren kütleler içerisinde olup olmadığı belirlendi. Şekil 4.19-24'de bu peptidlerin MSMS spektrumları görülmektedir. Bu spektrumlarda temel olarak a-, b- ve y- iyon serileri tanımlandı. a-iyon serileri, genellikle sodyum ile kompleks yapan peptidlerde gözlenirken, b- iyon serisi, özellikle Orbitrap sonuçlarında görüldü. Aynı zamanda, sodyumla teşvik edilen C-terminal fragmentasyonu nedeniyle de yüksek kütleyle sahip major pikler tespit edildi. Prolinin olduğu bölgede yaygın olarak, internal fragmentasyon ile ilişkili bir seri fragmentasyon gözlemlendi. Diğerlerine göre kırılma noktasında internal fragmentasyon, kütle spektrometresinde iyi tanımlanan bir olay olup, çalışılan peptid içerisindeki bazı prolinlerin olduğu yerde de beklenen bir olaydı. MSMS spektrumlarında yorumlanamayan birçok pikin açıklaması da bu fragmentasyonun farklı tipleri ile açıklanabilir.

Şekil 4.19, kütlesi 1721.9 Da olan peptid için MSMS sonuçlarını göstermektedir. Bu peptidin ana iyon kütlesi, 16 proline ek olarak bir glutamin (veya lizin) ve bir sodyum atomunun varlığı ile uyumluluk göstermektedir. Sodyum atomunun varlığı, 23 Da'daki kütle ile doğrulandı. Bu spektrumda sodyum iyonu tarafından teşvik edilen fragmentasyon hakimdir. 1677.7, 1624.9, 1608.9, 1581.0 ve 1527.9 Da'ki kütleler sırasıyla; 1) ana iyondan bir CO₂'in kaybı, 2) C-terminalinden bir prolinin kaybı, 3) 1624.9 Da'luk iyondan bir 16 Da'luk kayıp, 4) 1624.9 Da kütleden bir CO₂'in kaybı ve 5) 1624.9 Da kütleden bir prolinin kaybını göstermektedir.

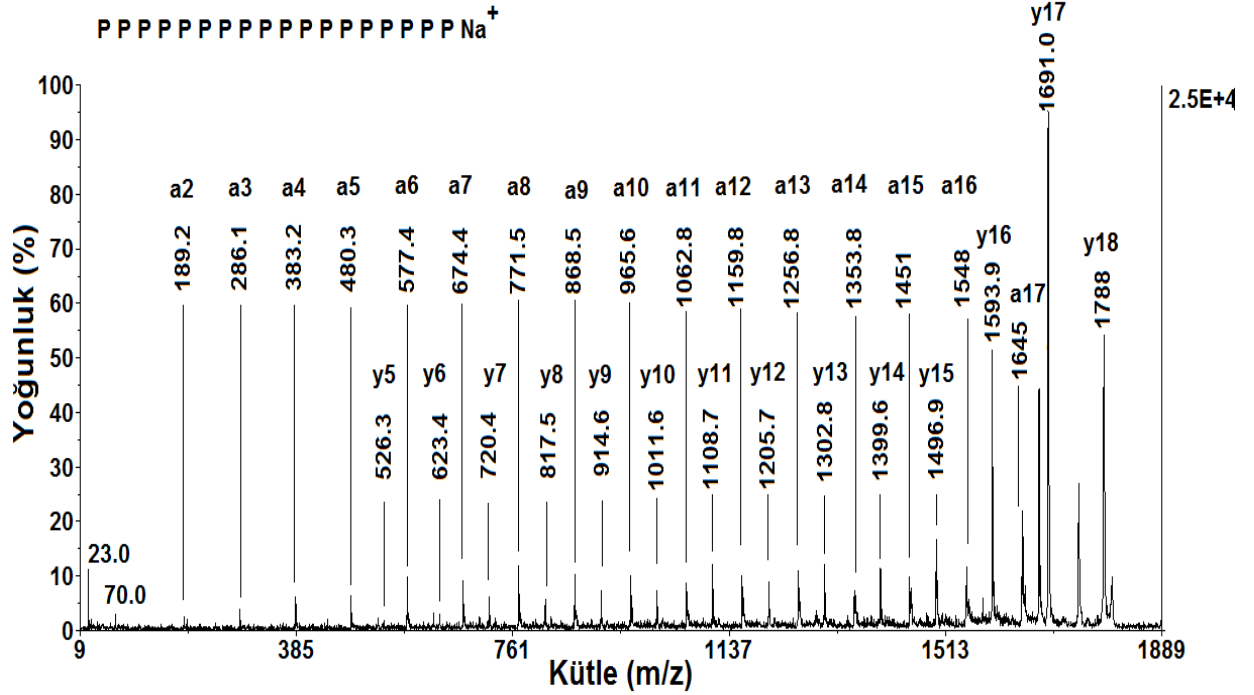
Minör sinyallerden uzun bir y-iyon serisi (13 ardışık prolini içeren) çıkarıldı. y-iyon serisi, katyon-kaynaklı fragmentler ile üst üste çakışmaktadır. 1302.8 ve 1430.8 Da arasındaki 128 Da'luk fark, lizin ya da glutamin birimi ile; 1302.8 Da'da gözlenen pikin yüksek yoğunluğu ise, bu pozisyonda bulunan prolin olmayan bir birimin varlığı ile uyumluydu.

1302.8 Da'daki yoğun pik, prolinin N-terminal bölgesindeki parçalanmadan kaynaklanmaktadır. Bir peptide prolin biriminin varlığı, MSMS spektrumunda çok farklı fragmentasyona neden olur. Prolin biriminde oluşan güçlü fragment iyonların sıklığı ‘‘Prolin Etkisi’’ olarak bilinmektedir ve prolinin N-terminal bölgesindeki parçalanmadan kaynaklanan y-serisi iyonların oluşumuna sebep olmaktadır.



Şekil 4.19. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 1721.9 Da'luk PPPQP P P P P P P P P P P P Na⁺ peptidin MALDI MSMS spektrumu. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu göstermektedir. Na⁺ atağı olan fragmentasyonlar asteriks (*) ile gösterilmiştir. Prolinin imonyum iyonu, 70 Da'da; sodyum atomu ise, 23 Da'da bulunmaktadır.

Şekil 4.20, kütleli 1788.3 Da olan peptid için MSMS sonuçlarını göstermektedir. Bu peptidin ana iyon kütleli, 18 prolinin yanında bir sodyum atomunun varlığı ile uyumluluk göstermektedir. Sodyum atomunun varlığı kütleli 23 Da olan pik ile doğrulandı. Sodyum atomu, y-iyon serisinde C-terminali ile ve a-iyon serisinde ise N-terminali ile ilişkilidir.

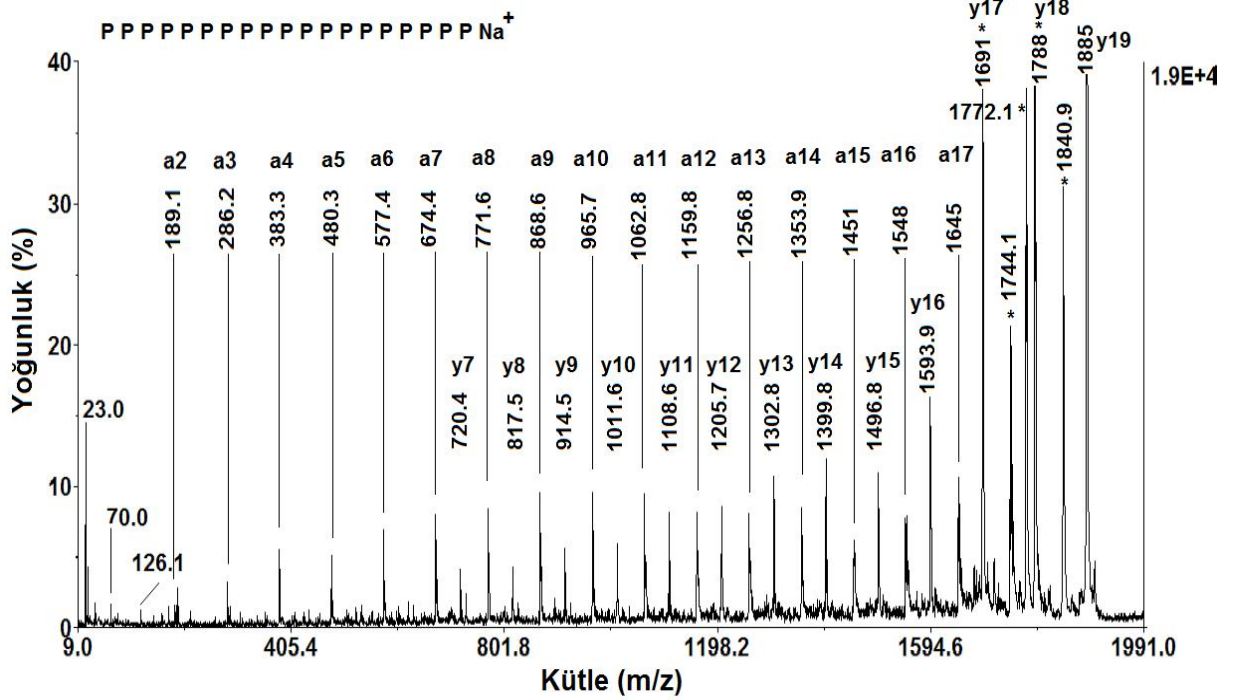


Şekil 4.20. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 1788.3 Da'luk 18-prolinli PPPPP PPPPP PPPPP PPP Na⁺ peptidin MALDI MSMS spektrumu. Amino asit dizisi, y-iyon ve a-iyon serileri ile belirlendi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu ve sol tarafta yer alan y-ekseni, en yoğun pikin yüzde yoğunluğunu göstermektedir. Prolinin imonyum iyonu 70 Da'da bulunmaktadır. Sodyum atomu ise; 23 Da'da bulunmaktadır.

Şekil 4.21, kütle 1885 Da olan peptid için MSMS sonuçlarını göstermektedir. Bu peptidin ana iyon kütle, 19 prolin ve bir sodyum atomunun varlığı ile uyumluluk göstermektedir. Sodyum atomunun varlığı 23 Da'da bulunan kütle ile doğrulandı. y-iyon ve a-iyon serisini tanımlamak için bir dizi pik işaretlendi. Sodyum atomunun, a-iyon serisinde N-terminal fragmenti ile ve y-iyon serisinde C-terminali ile ilişkili olduğu görüldü. Aynı zamanda a-iyon serisinden 1 Da daha büyük (a+1 iyon serisi) bir dizi pik mevcut olup, spektrumu karmaşıktırmaktan kaçınmak amacıyla işaretlenmedi. Ayrıca y-serisinin düşük kütleyle sahip yedi biriminden sinyal alınamadı. Bununla birlikte y7'nin kütle (720.4 Da); C-terminal prolin (116 Da), 6 tane dehidro-prolin (6 x 97.05) ve bir sodyum atomunun (23 Da) kütleleri toplamından sodyum atomu ile yer değiştiren bir protonun kütle (1 Da) çıkartılmasına eşittir.

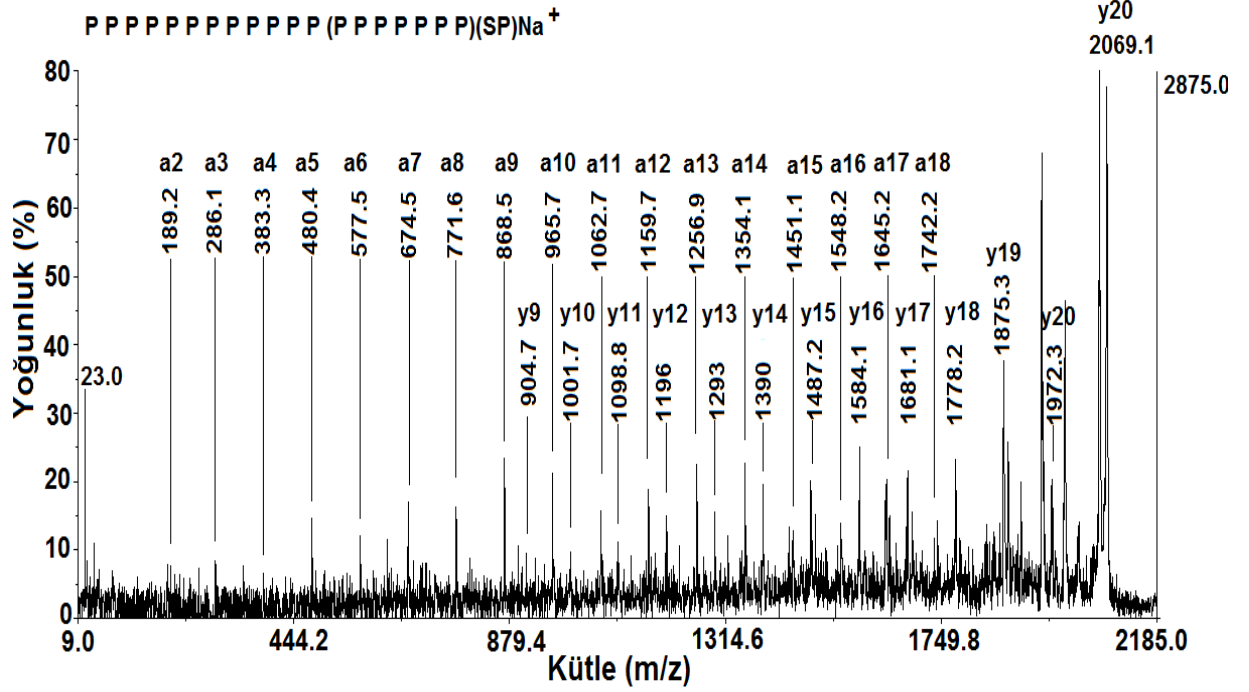
a-iyon serisinin yüksek kütleyle sahip son iki biriminden sinyal alınamadı. Bununla birlikte, 240 Da'luk kütle farkı, C-terminalindeki prolin (143 Da) ve prolinin dehidro kütlesi (97 Da) toplamına eşittir.

Şekil 4.21'de görülen yüksek kütleyle sahip, 5 büyük pikin, C-terminalinde meydana gelen sodyum kaynaklı fragmentasyondan kaynaklandığı düşünüldü. Sodyum-kaynaklı fragmentasyon piklerinin tepesi kesildi. Bu piklerin gerçek yükseklikleri, düşük kütleyle sahip iyonların çoğundan 10 kat daha fazlaydı. Şekil 4.21'de sodyum kaynaklı fragment iyonları "*" ile işaretlenmiştir: 1) 1788.1 Da'daki en yoğun sinyale sahip pik, C-terminal prolinin (97 Da) kaybı ile uyumludur. 2) 1691.0 Da'daki yoğun sinyal, ikinci bir prolinin (97 Da) kaybı ile uyumludur 3) 1840.9 Da'daki kütle, ana iyondan bir CO₂'in kaybı ile uyumludur 4) 1772.1 Da'ki kütle, 1788.1 Da kütlede 16 Da daha küçüktür. 5) 1744.1 Da kütleyle sahip pik, 1788.1 Da'dan bir CO₂'in kaybı ile uyumludur. Ayrıca 1788.1 ve 1691.0 Da'daki pikler, y-iyon serisindeki y17 ve y18 iyonları ile çakıştı. Bununla birlikte bu piklerin yoğunlukları, diğer y-serisi iyonlarından daha yüksekti. Bu durum, bu pozisyonlarda ikinci bir iyon kaynağı olduğunu düşündürdü. 1744.1, 1772.1 ve 1841.8 Da'daki kütleyle sahip pikler ise herhangi bir dizi iyonu ile ilişkili değildi.



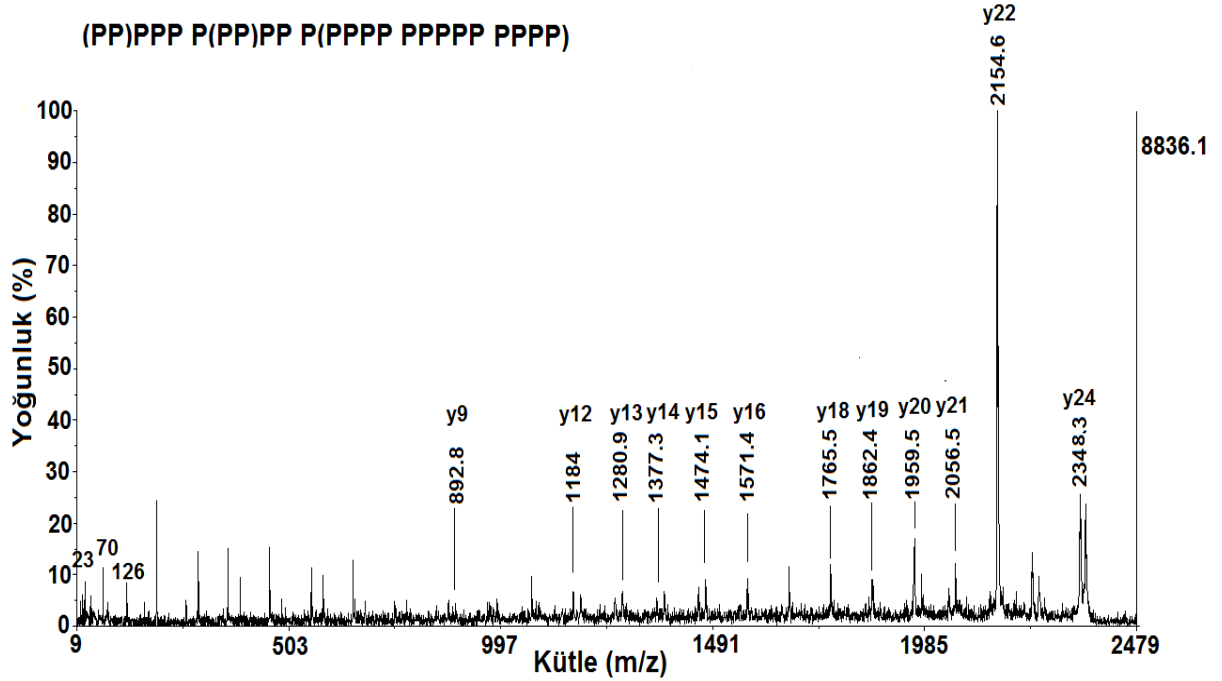
Şekil 4.21. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 1885.0 Da'luk 19-prolinli (PPP)PP PPPPP PPPPP PPPP Na⁺ peptidin MALDI MSMS spektrumu. Amino asit dizisi, y-iyon ve a-iyon serileri ile belirlendi. Maksimum yoğunluk, minör pikleri vurgulamak amacıyla % 40'a ayarlandı. Dolayısıyla en yoğun sinyal alınan pikin tepesi kesildi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu ve sol tarafta yer alan y-ekseni, en yoğun pikin yüzde yoğunluğunu göstermektedir. Na⁺ kaynaklı fragmentasyonlar "*" ile işaretlenmiştir. Prolinin imonyum iyonu 70 Da'da, prolin için karakteristik olan iyon 126 Da'da; sodyum atomu ise; 23 Da'da bulunmaktadır.

Şekil 4.22, kütlesi 2069.1 Da olan peptid için MSMS sonuçlarını göstermektedir. Bu peptidin ana iyon kütlesi, 20 prolin ve 1 serin amino asidine ek olarak bir sodyum atomunun varlığı ile uyumluluk göstermektedir. Sodyum atomunun varlığı, kütlesi 23 Da olan pik ile doğrulandı. Sodyum atomu, y-iyon serisinde C-terminali ile a-iyon serisinde ise N-terminali ile ilişkiliydi.



Şekil 4.22. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 2069.1 Da'luk 20-prolinli P P P P P P P P P P P P (P P P P P P P P) (S P) Na⁺ peptidin MALDI MSMS spektrumu. Amino asit dizisi, y-iyon ve a-iyon serileri ile belirlendi. Maksimum yoğunluk, minör pikleri vurgulamak amacıyla % 80'e göre değerlendirildi. Dolayısıyla en yoğun sinyal alınan pikin tepesi kesildi. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu ve sol tarafta yer alan y-ekseni, en yoğun pikin yüzde yoğunluğunu göstermektedir. Sodyum atomu 23 Da'da bulunmaktadır.

Şekil 4.23, kütlesi 2348.1 Da olan peptid için MSMS sonuçlarını göstermektedir. Bu peptidin ana iyon kütlesi, 24 prolinin varlığı ile uyumluluk göstermektedir. Sodyum atomunun varlığı, kütlesi 23 Da olan pik ile doğrulandı.



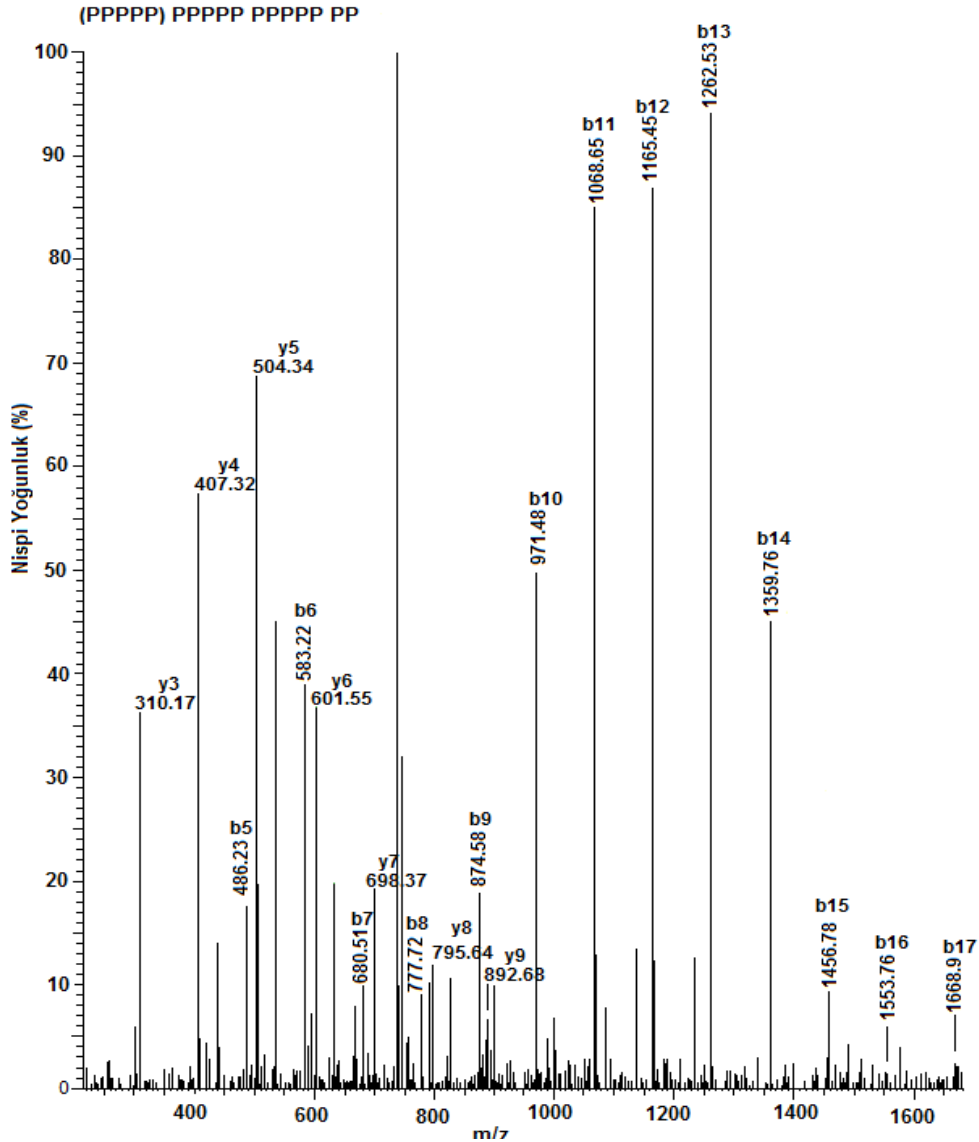
Şekil 4.23. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen 2348.3 Da'luk 24-prolinli (PP)PPP P(PP)PP P(PPPP P(PPPP P(PPPP peptidin MALDI MSMS spektrumu. Amino asit dizileri y-iyon serisini göstermek için işaretlenmiştir. Sağ tarafta yer alan y-ekseni, saniye başına düşen sinyal yoğunluğunu ve sol tarafta yer alan y-ekseni, en yoğun pikin yüzde yoğunluğunu göstermektedir. Prolinin imonyum iyonu 70 Da'da ve prolin için karakteristik olan iyon 126 Da bulunmaktadır. Sodyum atomu ise 23 Da'da bulunmaktadır.

4.3.1. Sodyum-kaynaklı Fragmentasyon

Alkali metal ile katyonize edilmiş peptidler, sodyum iyonunun bir proton ile yer değiştirerek peptidler ile kompleks oluşturması sonucunda oluşur. Kütle spektrometresinde katyonize peptidlerin fragmentasyonu sonucunda en göze çarpan iyon, C-terminal biriminin hidrojen atomlarını kaybetmesi nedeniyle. Sonuçta, orjinal peptidten bir amino asit daha kısa, yeni bir peptid meydana gelir (149-153). Bu fragmentasyonun mekanizması, peptidin C-terminalindeki hidroksil grubunun komşu amino asite transferi ve sonrasında C-terminal amino asit kütlesinin kaybına dayanmaktadır. Bu durum, orjinal C-terminal birimi içermeyen yeni bir alkali katyonize edilmiş peptidin oluşumuna neden olur (153). Ayrıca yeni oluşan alkali katyonize peptid için de başka fragmentasyonlar meydana gelebilir. Bu da orjinal peptidten iki veya üç amino asit daha kısa olan iyonlarla sonuçlanır. İkinci fragmentasyondaki iyonun sinyal yoğunluğu birinci ile benzer olabilir. Ancak, üçüncü fragmentasyondaki iyonun sinyal yoğunluğu genellikle diğerlerinden daha azdır (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20) (154).

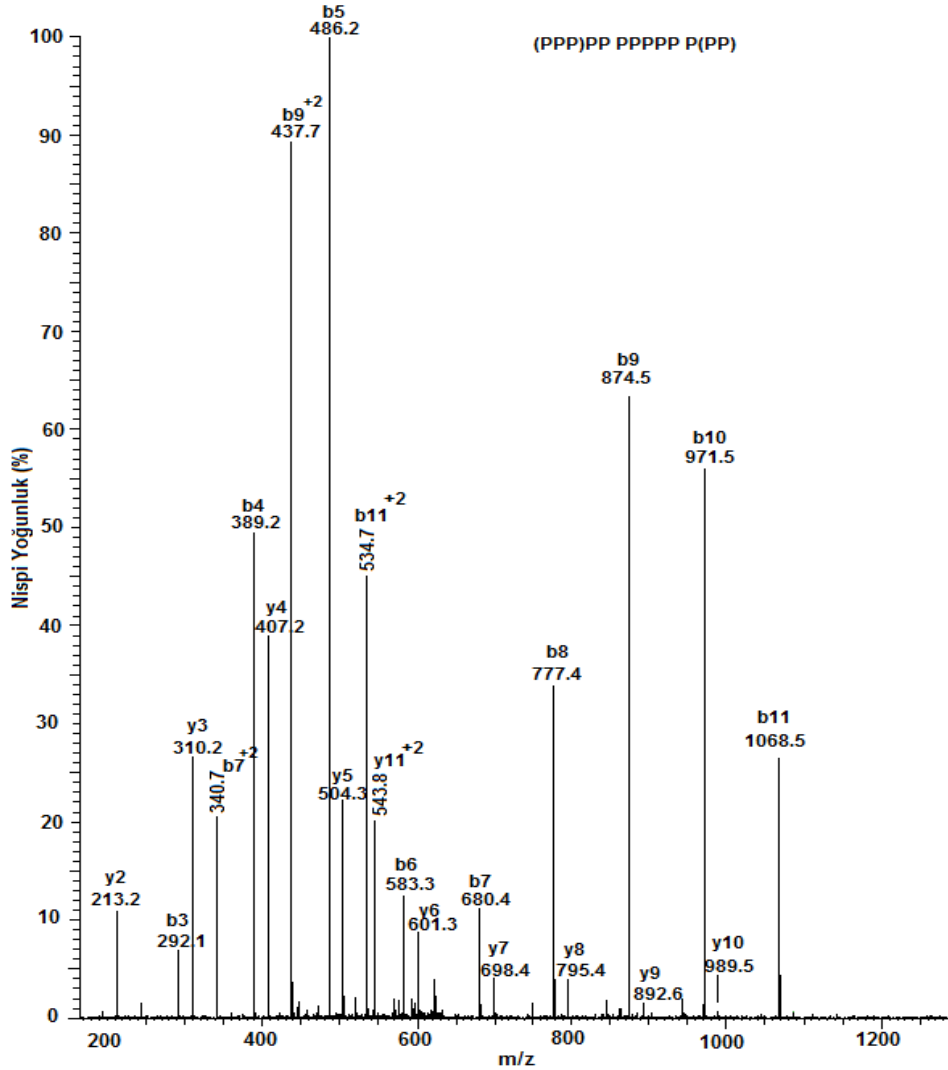
4.4. LTQ Orbitrap MSMS Analizi

Şekil 4.25, kütlesi 834.96 Da olan +2 yüklü peptid (1668.9 Da) için LTQ-Orbitrap MSMS sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar peptid ana iyon kütlesinin $((M+2H)^{+2} = 834.96)$ 17 prolinin varlığı ile uyumlu olduğunu göstermektedir. +1 yüklü y-iyon ve +1 yüklü b-iyon serileri gözlemlendi. Tüm bu iyonların hepsi sadece prolin amino asitinden oluşan dizi ile uyumluydu.



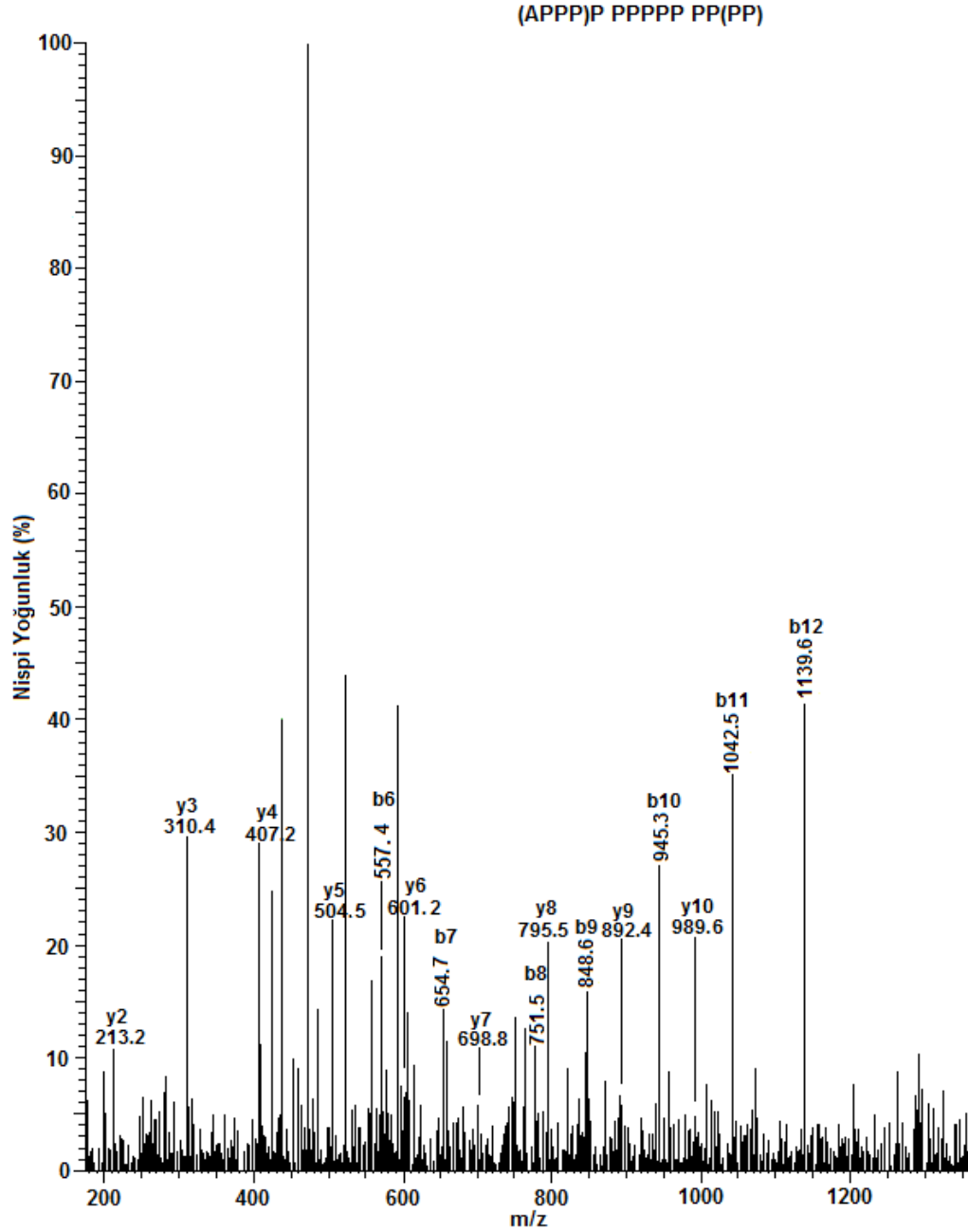
Şekil 4.25. HPLC ile saflaştırılan, kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (PPPPP) P P P P P P P P P P P P P P P P P peptidinin Orbitrap MSMS spektrumu. +2 yüklü ana iyonun kütlesi 834.96 m/z'dir. Amino asit dizileri, +1 yüklü y-iyon ve +1 yüklü b-iyon serileri ile belirlenmiştir. y-ekseni, spektrumda en yoğun pik ile ilişkili sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

Şekil 4.26, kütlesi 640.85 Da olan +2 yüklü peptid için LTQ-Orbitrap MSMS sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar ana iyon kütesinin $[(M+2H)^{+2}= 640.85]$ 13 prolinin varlığı ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Çalışmada, +1 yüklü y-iyon ve +1 yüklü b-iyon serilerinin yanında, çok belirgin +2 yüklü y-iyon ve +2 yüklü b-iyon serileri gözlemlendi. Tüm bu iyonların hepsi sadece prolin amino asitinden oluşan dizi ile uyumluydu. Ayrıca +1 yüklü y-iyon ve +1yüklü b-iyon serilerinin belirgin sinyaller vermesi de dikkate değerdi.



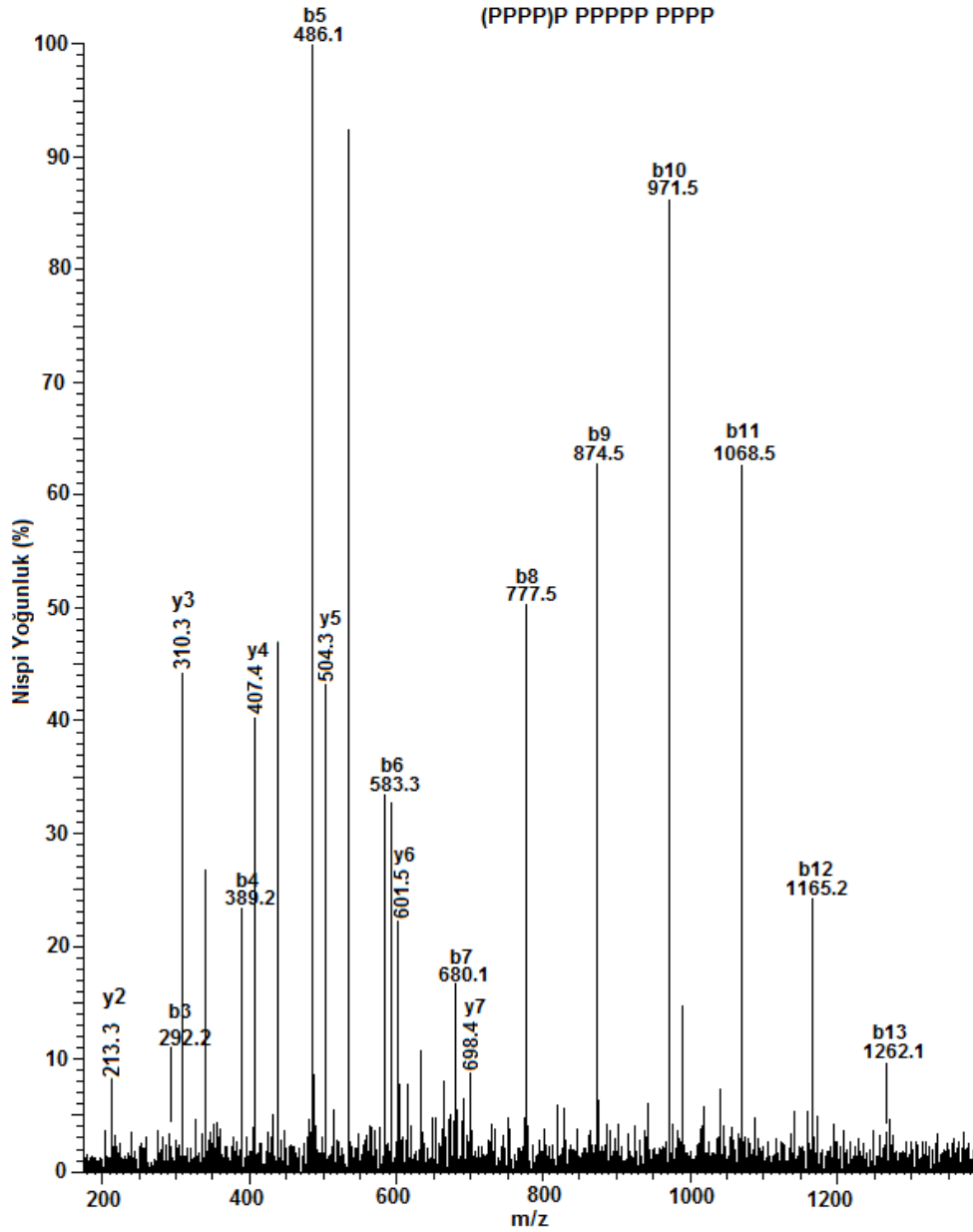
Şekil 4.26. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (PPP)PP P(PP)P(PP) peptidin Orbitrap MSMS spektrumu. +2 yüklü ana iyonun kütesi 640.85 m/z'dir. Amino asit dizileri +1 yüklü y-iyon serileri, +1 yüklü b-iyon serileri, +2 yüklü y-iyon ve +2 yüklü b-iyon serileri ile belirlenmiştir. y-ekseni, spektrumda en yoğun pik ile ilişkili sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

Şekil 4.27, kütlesi 676.37 Da olan +2 yüklü peptid için LTQ-Orbitrap MSMS sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar ana iyon kütlesinin $[(M+2H)^{+2}= 676.37]$ 14 prolinin ve 1 alaninin varlığı ile uyumlu olduğunu göstermektedir. +1 yüklü y-iyon ve +1 yüklü b-iyon serileri gözlemlendi.



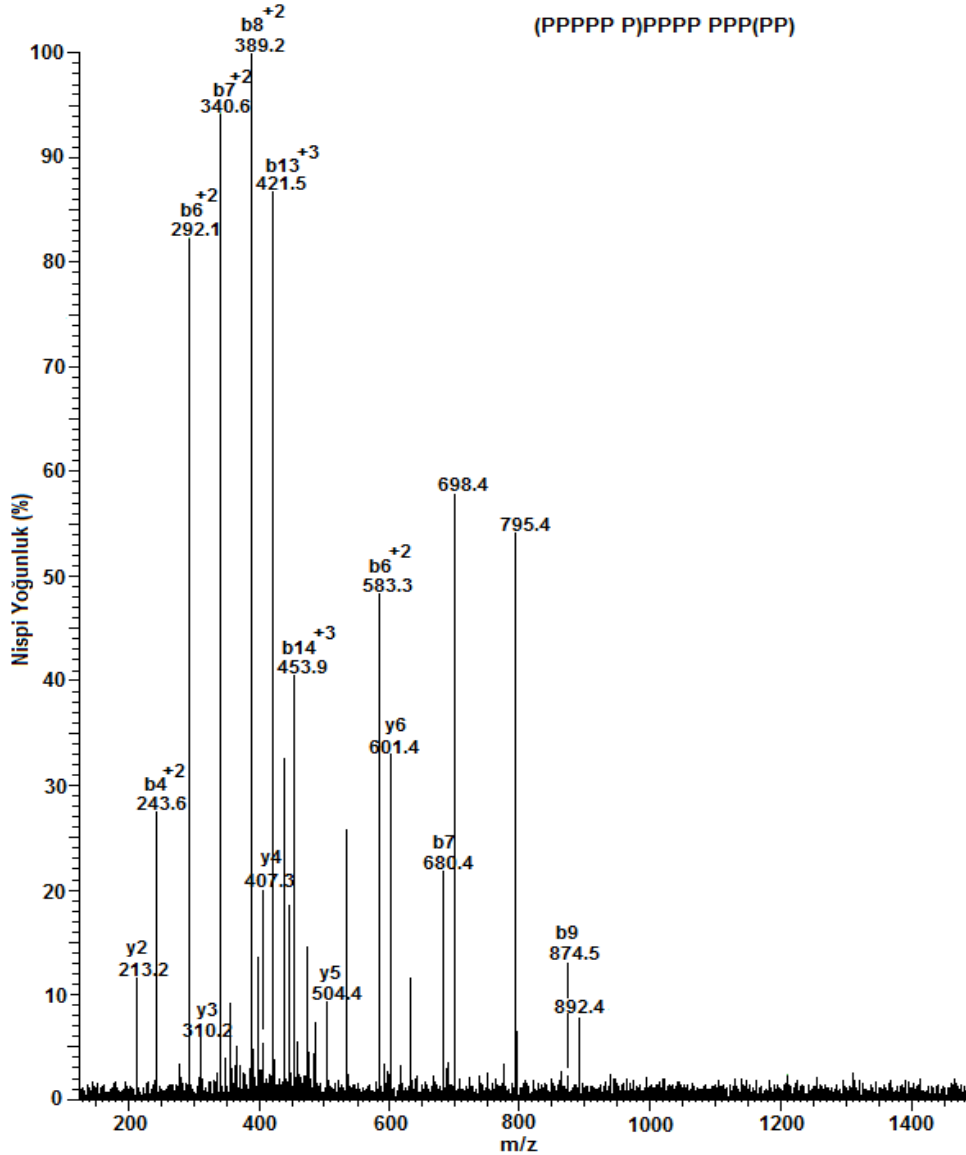
Şekil 4.27. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (APPP)P P P P P P P P P P P P peptidinin Orbitrap MSMS spektrumu. +2 yüklü ana iyonun kütlesi 676.37 m/z'dir. Amino asit dizileri +1 yüklü y-iyon serileri ve +1 yüklü b-iyon serileri ile belirlenmiştir. y-ekseni, spektrumda en yoğun pik ile ilişkili sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

Şekil 4.28, kütlesi 689.38 Da olan +2 yüklü peptid için LTQ-Orbitrap MSMS sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar ana iyon kütlesinin $[(M+2H)^{+2}= 689.38]$ 14 prolinin varlığı ile uyumlu olduğunu göstermektedir. +1 yüklü y-iyon ve +1 yüklü b-iyon serileri gözlemlendi.



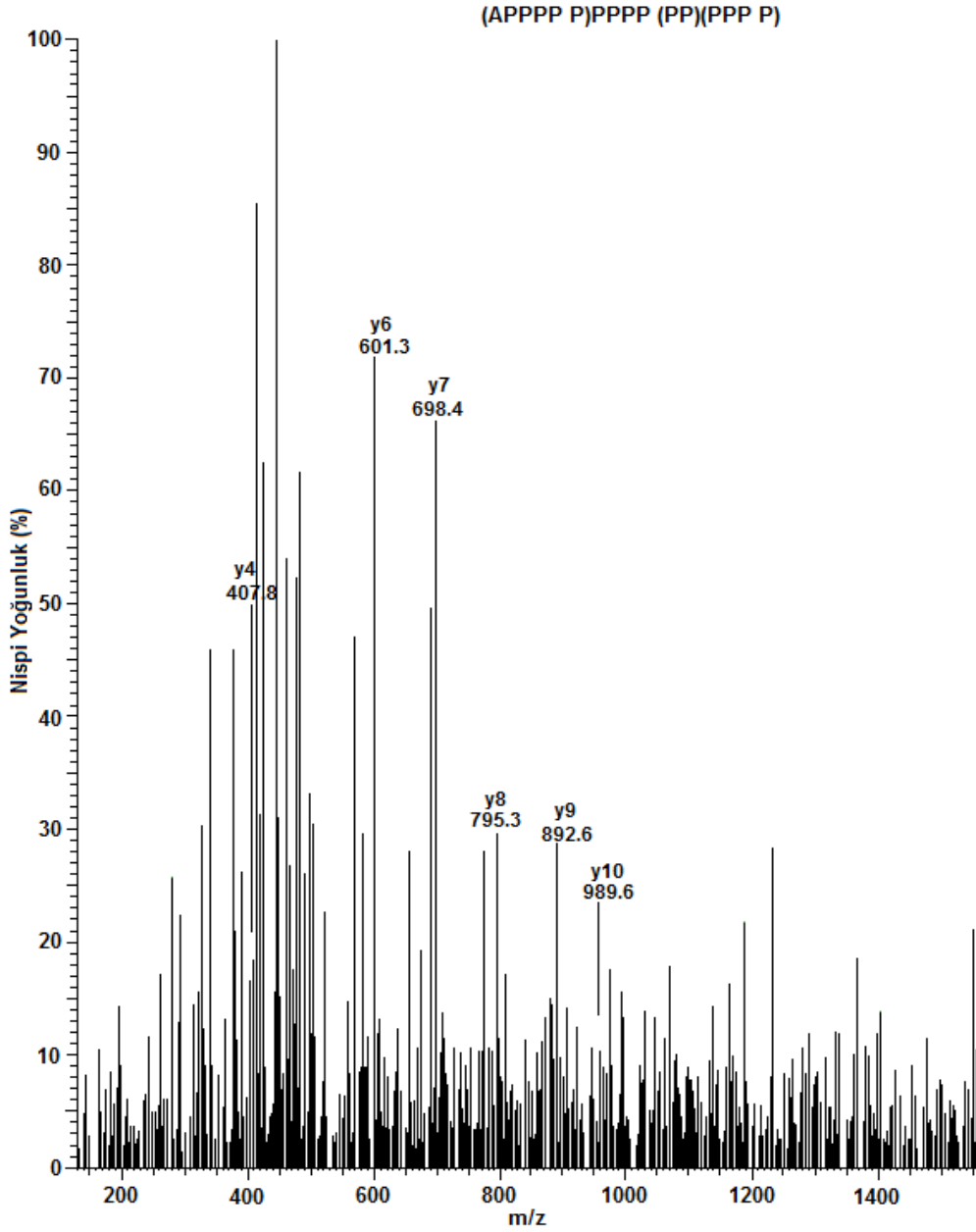
Şekil 4.28. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (PPPP)P P P P P P P P P P P P P P P P peptidinin Orbitrap MSMS spektrumu. +2 yüklü ana iyonun kütlesi 689.38 m/z'dir. Amino asit dizileri +1 yüklü y-iyon serileri ve +1 yüklü b-iyon serileri ile belirlenmiştir. y- eksenini, spektrumda en yoğun pik ile ilişkili sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

Şekil 4.29, kütlesi 492.27 Da olan +3 yüklü peptid için LTQ-Orbitrap MSMS sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar ana iyon kütlesinin $[(M+2H)^{+3} = 492.27]$ 15 prolinin varlığı ile uyumlu olduğunu göstermektedir. +1 yüklü y-iyon ve +1 yüklü b-iyon serilerinin yanında, çok belirgin +2 yüklü b-iyon ve +3 yüklü b-iyon serileri gözlemlendi.



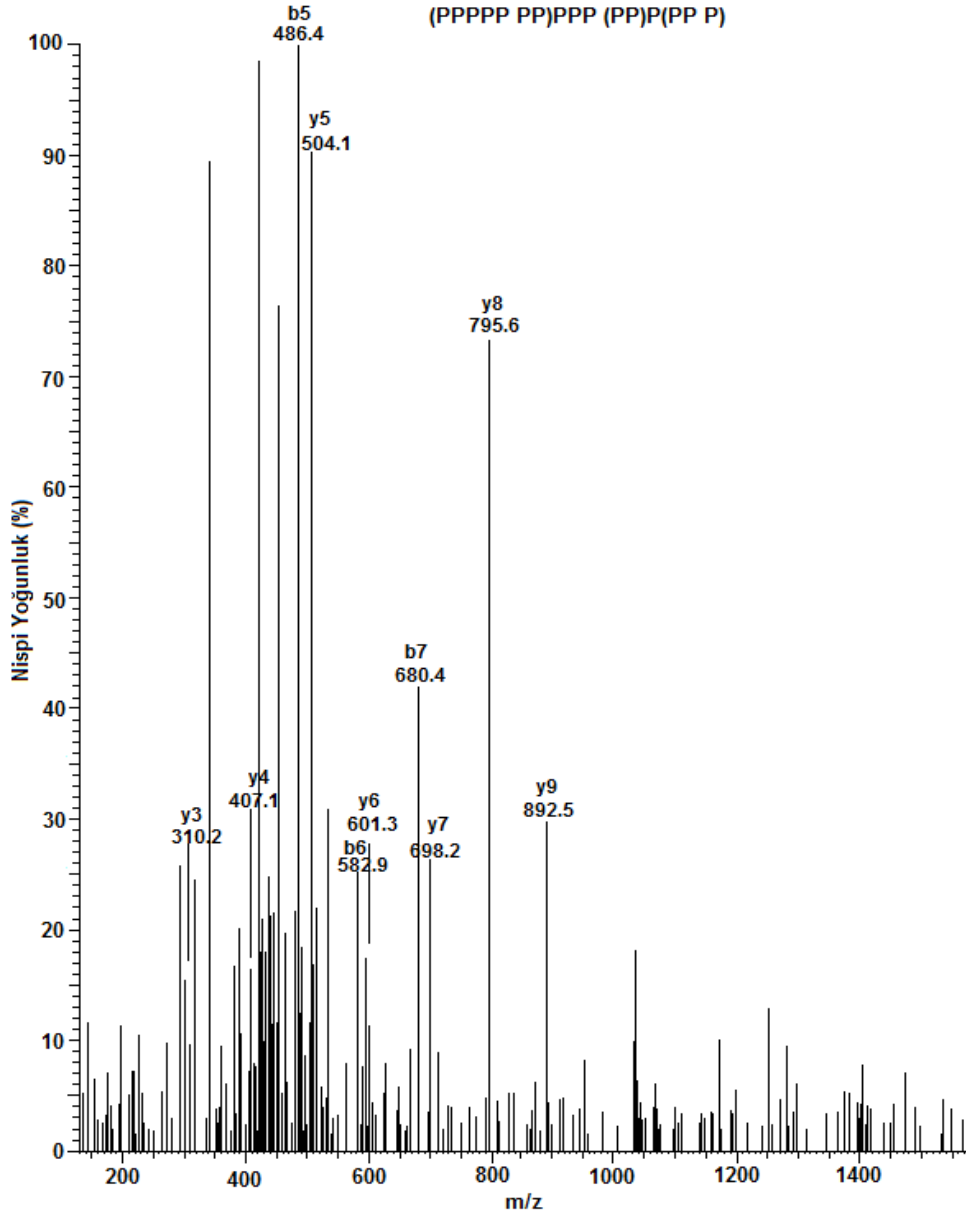
Şekil 4.29. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (PPPPP P)PPPP PPP (PP) peptidinin Orbitrap MSMS spektrumu. +3 yüklü ana iyonun kütlesi 492.27 m/z'dir. Amino asit dizileri +1 yüklü y-iyon serilerini, +1 yüklü b-iyon serilerini, +2 yüklü b-iyon ve +3 yüklü b-iyon serileri ile belirlenmiştir. y-ekseni, spektrumda en yoğun pik ile ilişkili sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

Şekil 4.30, kütlesi 515.95 Da olan +3 yüklü peptid için LTQ-Orbitrap MSMS sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar ana iyon kütlesinin $[(M+2H)^{+3} = 515.95]$ 15 prolinin ve 1 alaninin varlığı ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Sadece +1 yüklü y-iyon serisi gözlemlendi.



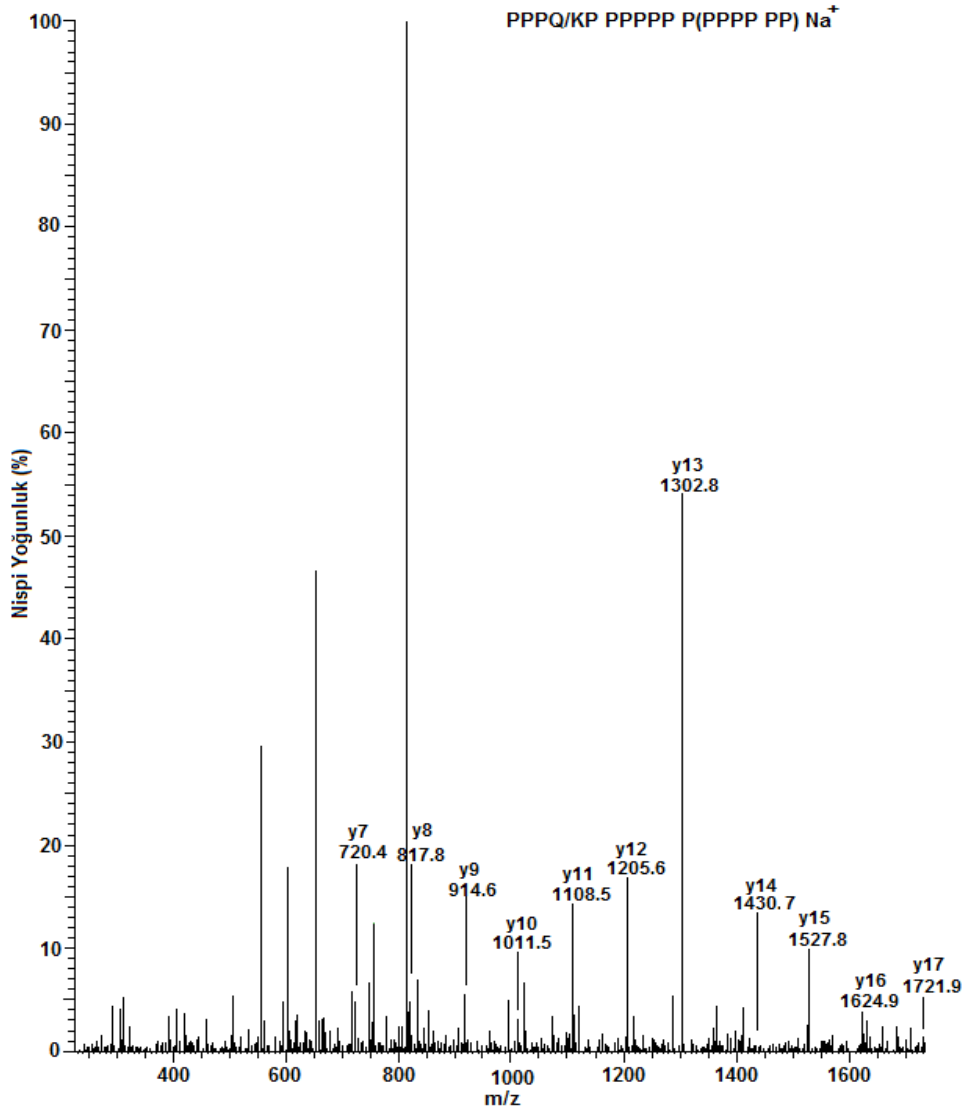
Şekil 4.30. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (APPPP P)PPPP (PP)(PPP P) peptidinin Orbitrap MSMS spektrumu. +3 yüklü ana iyonun kütlesi 515.95 m/z'dir. Amino asit dizileri +1 yüklü y-iyon serilerini göstermek için işaretlenmiştir. y-ekseni, spektrumda en yoğun pik ile ilişkili sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

Şekil 4.31, kütesi 524.62 Da olan +3 yüklü peptid için LTQ-Orbitrap MSMS sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar ana iyon kütesinin $[(M+2H)^{+3} = 524.62]$ 16 prolinin varlığı ile uyumlu olduğunu göstermektedir. +1 yüklü y-iyon ve +1 yüklü b-iyon serileri gözlemlendi.



Şekil 4.31. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen (PPPPP PP)PPP (PP)P(PP P) peptidinin Orbitrap MSMS spektrumu. +3 yüklü ana iyonun kütesi 524.62 m/z'dir. Amino asit dizileri +1 yüklü y-iyon serilerini ve +1 yüklü b-iyon serilerini göstermek için işaretlenmiştir. y-ekseni, spektrumda en yoğun pik ile ilişkili sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

Şekil 4.33, kütlesi 861.45 Da olan +2 yüklü peptid için LTQ-Orbitrap MSMS sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar ana iyon kütlesinin $[(M+2H)^{+2}= 861.45]$ 16 prolin ve 1 glutamin/lizinin varlığı ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Bu iki amino asidin kütlesinin aynı olması nedeniyle bu peptidte hangi amino asidin olduğu kesin olarak belirlenemedi. Sadece +1 yüklü y-iyon serisi gözlemlendi.



Şekil 4.33. HPLC ile saflaştırılan kaynatılmış FBS AChE'dan izole edilen PPPQ/KP P(PPPP PP)Na⁺ peptidinin Orbitrap MSMS spektrumu. +2 yüklü ana iyonun kütlesi 861.45 m/z'dir. Amino asit dizileri +1 yüklü y-iyon serileri ile belirlenmiştir. y-ekseni, spektrumda en yoğun pik ile ilişkili sinyal yoğunluğunu göstermektedir.

Tablo 4.2’de beş farklı peptid ailesi gösterilmekte olup, hepsi prolin birimlerinin uzamış dizilerini içermektedir. Aile 1, sadece prolinlerden oluşan dokuz peptidi (13-25 birim uzunluğunda) içermektedir. Aile 2, 3 ve 4’ün N-terminalinde prolin olmayan bir birim (alanin, lösin/izolösin/hidroksiprolin veya glutamin/lizin) yer alırken, aile 5’in C-terminalinde serin bulunmaktadır. Aile 1 ve 2 içerisindeki ana iyonlar, farklı sayıda proline sahip peptidleri içermektedir. Farklı uzunluktaki peptidler, dolaşımında AChE’ya bağlı olan tetramerizasyon peptidine bir ekzopeptidazın etkisinden ya da kütle spektrometresine girişi sırasında serbest kalan peptidin kaynak içerisinde fragmentasyona uğramasından kaynaklanabilir. MALDI kütle spektrometresindeki model poliprolinlerin 4000-6000 V’luk lazer enerjisinde kaynak içerisindeki fragmentasyonu, çalışma sırasında görüldü. Bununla birlikte örneklerin Orbitrap içerisine girişi için kullanılan elektrosprey iyonizasyon enerjisi daha düşük olduğu için, orbitrap deneylerinde kaynak içerisindeki fragmentasyonun, ana iyon uzunluklarındaki farklılıktan sorumlu olması daha az olasıdır.

4.5. Prolince Zengin Peptidlerde BLAST Taraması

Kütle spektrometre çalışmaları sonunda FBS AChE'dan 14 adet prolince-zengin peptid tanımlandı (Tablo 4.2). Bunların hepsi, tetramer yapıyı oluşturan peptidler için uygun adaylar olup, 5 aileye bölündü. Peptidlerin kaynağı tam olarak belli olmamakla birlikte, bu peptidlerin başka proteinlerin bir parçası olabileceği düşünüldü. Bu düşüncüyü test etmek için her aileden en uzun temsili bir peptid, memeli taksonomisi kullanılarak (40674) NCBI'nin veritabanındaki BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) taramasına sunuldu. Tarama sonucunda her bir aile için eşleştirme gerçekleştirildi. Bir dizide 15 veya daha fazla prolin için eşleşen adaylarda ciddi bir sayı sınırlaması olabileceği önceden tahmin edildi. Örneğin, aile 2'deki APPPP PPPPP PPPPP P dizinin eşleştiği 25 ayrı protein bulundu. Bu çalışmanın amacı, çok sayıdaki adaylar arasından AChE ile spesifik olarak etkileşenleri bulmaktır. Diziler eşleştiğinde ise; proteinler arasından *Bos taurus* taksonomisine ait olanlar seçildi. *Bos taurus* taksonomisinde hiç bir aday bulunmadığı takdirde, *Homo sapiens* taksonomisinden bir aday belirlendi. Tablo 4.2'deki aile 1'de bulunan dokuz peptid, sadece prolin içermekteydi. 25 birim prolin içeren peptid kullanılarak yapılan BLAST taraması sonucunda ardarda 25 prolin içeren, yedi tane farklı protein bulundu. Sığır proteomundan herhangi bir eşleşme olmadığı için *H. sapiens* taksonomisinden "UDP-N-acetyl glucosamine transferase subunit homology domain-containing protein 1" Tablo 4.3 için seçildi. İkinci aile, APPPP PPPPP PPPPP P ile temsil edildi. N-terminaldeki alanin amino asitinin pozisyonu konusunda belirsizlik olması nedeniyle (Tablo 4.2), BLAST taraması alanin için N-terminalinin 1., 2., 3. ve 4. pozisyonları için denendi. Dört taramanın tamamı da pek çok protein ile eşleşme sağladı. N-terminal pozisyonundaki alanin ile 25 protein, dizi ile eşleşme gösterdi. Bu proteinlerden 5 tanesi *B. taurus* taksonomisinde (Predicted R3H domain-containing protein 1; leiomodine-2; Predictedformin-like 1; largeprolinerich protein BAG6; ve Zinc finger homeobox 4) bulundu. Tablo 4.3 için leiomodine-2 seçildi. Alanin, C-terminaline doğru bir pozisyon kaydırılınca her defasında daha az sayıda protein ile eşleşme gerçekleşti. Ayrıca APPPP PPPPP PPPPP P peptid dizisinin, daha önce Biberoglu ve ark. tarafından at BChE'ı için rapor edilen leiomodine-2'deki tetramer yapıyı organize eden peptid ile uyumlu olduğu görüldü (155).

5. TARTIŞMA

5.1. Çözünür ve Membrana-bağlı Tetramerlerdeki Prolince-Zengin Peptidlerin Karşılaştırılması

Bu çalışma ile çözünür, tetramerik FBS AChE'da bulunan poliprolin peptidlerin kimliği belirlendi (156). Bu peptidler, daha önce çözünür, tetramerik insan ve at plazmasından saflaştırılan BChE'da tanımlanmıştı (8,155). Plazma AChE ve plazma BChE'daki poliprolin peptidler, birbirlerine benzerlik göstermektedir. Ancak bu peptidler, sinir-kas kavşağındaki kollajen kuyruklu AChE'daki ColQ'nun prolince zengin bölgesinden (PRAD) ve beyindeki membrana bağlı AChE'daki PRiMA'nın PRAD'ından çok farklıdır (Tablo 5.1). Plazma AChE ve BChE tetramerlerindeki poliprolin peptidler, 25 birime varan uzun prolin zincirlerine sahipken, ColQ'nun ve PRiMA'nın prolince-zengin bölgesi sırasıyla; 8 ve 14 proline sahiptir. ColQ ve PRiMA'daki prolin dizisi Leu, LeuPhe, MetPhe veya Met ile kesintiye uğrar (Tablo 5.1). Tablo 5.1'de FBS AChE için sadece bir peptid gösterilmektedir; diğer peptidler ise Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

Çözünür AChE ve BChE'daki tetramer yapıyı organize eden peptidler ile ColQ ve PRiMA'nın prolince-zengin peptidleri arasındaki amino asit dizileri arasındaki farklılıklar, Tablo 5.1'de gösterilmiştir. Bu farklılıklar, çözünür kolinesterazlardaki tetramer yapıyı organize eden peptidlerin, ColQ ve PRiMA'nınkinden farklı bir gen tarafından üretildiği anlamına gelmektedir. Bu nedenle, plazmadaki çözünür AChE ve BChE tetramerleri, membrana-bağlı formlardan oluşmaz. Bununla birlikte, insan ve at plazma BChE'ndeki poliprolin peptidlerinin, lamellipodini de içeren çok sayıda proteinden türediği gözükmektedir (8,155). Bu konu ile ilgili yapılan ilk araştırmalarda, lamellipodin, tetramer yapıyı organize eden poliprolin peptidlerinin kaynağı olarak tanımlanmıştı (8). Ancak, Biberoglu ve ark. tarafından yapılan bir araştırma sonucunda tetramer yapıyı organize eden peptidlerin birçok proteinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (155). Bu çalışma, FBS AChE'daki poliprolin peptidlerinin de bir çok proteinden kaynaklandığı sonucunu desteklemektedir.

Dolayısıyla, hem çözünür BChE hem de AChE'da tanımlanan tüm poliprolin peptidlerin tek bir gen tarafından kodlanmadığı sonucuna varıldı.

Tablo 5.1. Çözünür ve membran bağlı tetramerik AChE ve BChE’da tetramer yapıyı oluşturan dizilerin karşılaştırılması

Kaynak	Dizi	Referans	Erişim # ^a
Fetal sığır serum AChE	PPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPP25	(Bu çalışma, 156)	
İnsan plazma BChE	PSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP27	(8)	gi 82581557
At plazma BChE	PSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP27	(8)	gi 82581557
İnsan ColQ	LLTPPPPLFPPPPF15	(157)	gi 18105016
Sıçan ColQ	LLMPPPPPLFPPPPF15	(158,159) ^b	gi 9506503
Fare ColQ	LLMPPPPPLFPPPPF15		gi 122065161
Torpedo ColQ	LLTPPPPMFPPPPF15	(160)	gi 543769
İnsan PRİMA	RPPPPLPPPPPPPPPRLLS20		gi 29788778
Sıçan PRİMA	RPPPPLPPPPPPPPPRLLS20	(4) ^b	gi 205830448
Fare PRİMA	RPPPPLPPPPPPPPPRLLS20	(161)	gi 29824432

^a Prolince-zengin peptidlerin köken aldığı proteinlerin NCBI erişim numarası. ^b Bir dergide yayınlanmadan, Pubmed’de kabul edilen Fare ColQ ve sıçan PRİMA dizileri

5.2. Nonkovalent Bağlanma

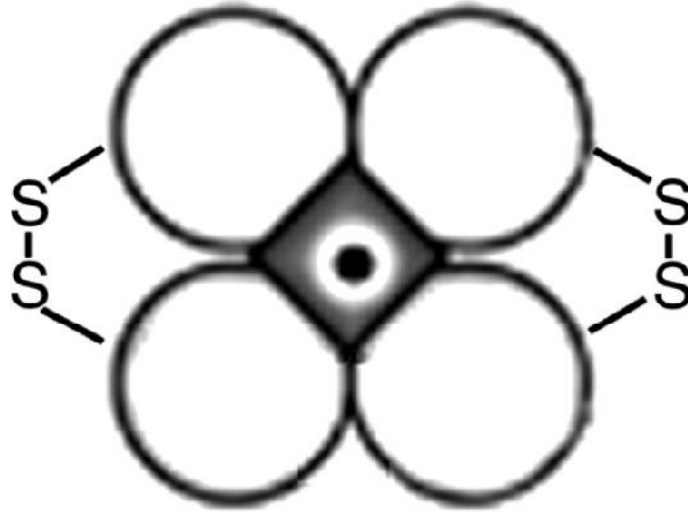
Poliprolin peptidler, tetramerik FBS AChE’ya kovalent olmayan bağlarla bağlıdır. Peptidler kaynayan suda veya kriyoprotektan olmadan proteinin dondurulması ile ana proteinden kolayca ayrıldı. Salınan peptidler, HPLC ile 210 nm’de ve kütle spektrometresinde gözlemlendi. Bununla birlikte poliprolin peptidler, Coomassie blue ile boyanan poliakrilamid jellerde ve imidazol-çinko ile boyanmış jellerde tanımlanamadı (162).

5.3. Tetramer Yapının Oluşumu İçin İkinci Bir Genin Katkısı

Şimdiye kadar AChE ve BChE, tetramer yapılarını oluşturmak üzere poliprolin peptidlere ihtiyaç duyduğu bilinen iki proteindir. Protein veri bankası aracılığıyla yapılan araştırmalarda, birçok tetramerik kristal yapı gözlemlenmiş olmasına

rağmen, hiçbir kristal yapı, ikinci bir genden kaynaklanan bir poliprolin peptidi içermemektedir. Tetramer yapının oluşumu için en yaygın motif, dört alt birimdeki yan zincirlerinin etkileşimi aracılığı ile oluşur. AChE ve BChE'in aynı zamanda alt birimleri arasında da bağlantılar olmasına rağmen bu bağlantılar, tetramer yapısını stabilize edecek kadar yeterli değildir.

Şekil 5.1, AChE tetramerinin merkezindeki bir poliprolin peptidin yerini göstermektedir. Bu yapı, AChE tetramerinin tüm organizasyonunu vurgulamak ve bu yapıyı oluşturan, tetramerizasyon peptidinin rolüne dikkat çekmek için verilmiştir.

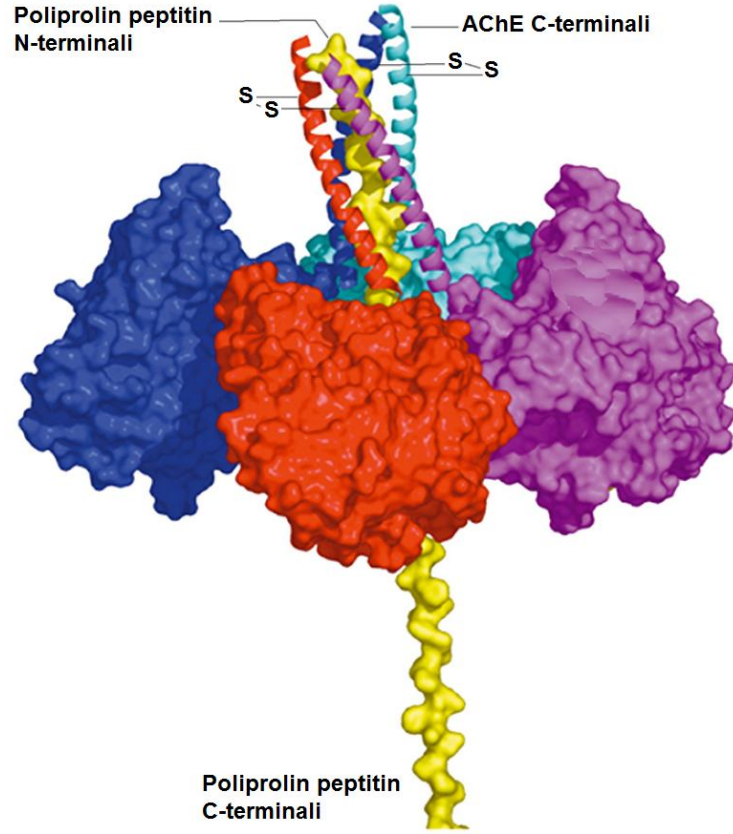


Şekil 5.1. Fetal sığır serum AChE'in (erişim numarası gi 108493 ve gi 115497516) dört eş altbirimi, tetramerin merkezindeki bir poliprolin peptid ile etkileşimler sonucu birbirlerine bağlıdır. 580. pozisyondaki Cys'den zincirlerarası disülfid bağları aracılığı ile AChE dimerleri oluşur.

Kas ve beyin, sadece AChE'in membrana bağlı formlarını içermez aynı zamanda az miktarda çözünür tetramerik AChE da içerir. Bu dokularda bulunan tetramerik AChE'da hangi tip prolince-zengin peptidlerin bulunduğu bilinmemekle birlikte, gelecekte yapılacak çalışmalarla non-kovalent bağlı bir poliprolin peptid içeren diğer tetramerik proteinlerin kimliğinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

5.4. FBS AChE'dan Salınan Prolince-Zengin Peptidler 25 Birime Varan Uzunluktadır.

4 paralel zincir ile sentetik insan PRAD arasındaki kompleksin kristal yapısı, sarmal 15-birimlik ColQ PRAD (LLTPP PPPLF PPPFF) peptidinin, AChE'ın helikal 40 birimlik tetramerizasyon bölgesi ile aynı uzunluğa sahip olduğunu ortaya koymuştur (5). Bir prolince-zengin peptid ile kompleks yapmış tam uzunluktaki tetramerik AChE'ın kristal yapısı henüz mevcut değildir. Bununla birlikte Dvir ve ark, sentetik peptidlerin kristal yapısından yola çıkarak, tam uzunluktaki ColQ proteine bağlı AChE tetramer modelini ileri sürmüştür (Şekil 5.2) (5). Bu modele göre ColQ proteini, tüm AChE tetramerini boydan boya geçmektedir. Antiparalel baş-kuyruk konfigürasyonunda AChE C-terminal tetramerizasyon bölgesi ile etkileşen ColQ'nun N-terminal bölgesi, AChE tetramerinin merkezinden geçer ve diğer taraftan dışarı çıkar. Bu konfigürasyon, bu çalışmada gözlenen 25-birimlik poliprolin peptid dahil, tüm boyutlardaki poliprolin peptidleri barındırabilecek özelliktedir. Tetramerizasyon bölgesi, poliprolinlerin helikal yapısına uymak zorunda olduğu için dört alt birimin pozisyonunda tam bir simetrisinin olması beklenemez.



Şekil 5.2. Tam uzunluktaki ColQ proteini varlığında AChE tetramerinin modeli. AChE monomerleri; triptofanca zengin, C-terminal, amfilik α -heliksleri ile globüler olarak gösterilmektedir. ColQ protein ya da alternatif olarak tetramer yapıyı organize eden poliprolin peptid (sarı), AChE tetramer kompleksinin ortasından çıkmaktadır. ColQ'nun N-terminali, AChE'nin C-terminal tetramerizasyon bölgesi (üstte) ile etkileşmekte ve kompleksin altına doğru tek bir zincir gibi uzamaktadır (5).

5.5. Proteaz Aktivitesinin Gerekliliği

Proteaz aktivitesi, AChE'nin membrana-bağlı formlarının üretilmesinde gerekli değildir. Ancak, büyük prekürsör proteinlerden kaynaklanan plazma AChE ve plazma BChE'daki poliprolin peptidler, prolince-zengin peptidleri oluşturmak üzere proteolize uğramalıdır. Prekürsör proteinin, proteolizden önce, başlangıçta AChE tetrameri ile bir araya gelip gelmediği ya da AChE tetramerlerini oluşturmak üzere, AChE altbirimleri ile bir araya gelmeden önce prekürsör proteinlerden prolince-zengin peptidlerin salınıp salınmadığı hala bilinmemektedir.

FBS AChE'dan salınan poliprolin peptidlerin büyüklüğü 1280-2445 Da arasında değişmekte olup, yaklaşık 13-25 amino asite tekabül etmektedir. Poliprolin peptidlerin uzunluklarındaki farklılıklar, plazmadaki proteaz aktivitesinden kaynaklanabilir. Ayrıca düşük moleküler ağırlıklı plazma proteomunun kütle spektrometresi ile analizi, proteazların (aminopeptidaz, karboksipeptidaz vb), büyük proteinleri, birbirleri ile örtüşen peptid serilerine dönüştürdüğünü göstermiştir (163).

5.6. AChE Tetramerlerinin Biraraya Gelmesi

Çözünür AChE tetramerlerinden, farklı poliprolin peptidlerin ekstrakte edilmesi, birçok soruyu da beraberinde getirmektedir. Bu sorular, aşağıda detaylı bir şekilde tartışılmıştır.

Soru 1. Tetramer yapıyı organize eden peptidlerin çeşitliliği, AChE'nin farklı dokulardan mı ekprese edildiğini göstermektedir?

Fetal sığır serumundaki çözünür AChE'nin kaynağı bilinmemektedir. Bununla birlikte insan serumundaki çözünür BChE'nin karaciğerden kaynaklandığı kesin olarak belirlenmiştir (164). Genel olarak, memeli serum kolinesterazlarının kaynağı karaciğer olarak kabul edilmektedir. Fetal sığır farklılık göstermesine rağmen, karaciğerden başka farklı dokulardan kaynaklanan serum AChE'nin bulunması beklenen bir durum değildir.

Soru 2. Membrana-bağlı AChE tetramerlerinden farklı olarak, çözünür AChE'nin tetramer yapısını oluşturan peptidlerin başka amaçlar için tasarlanan proteinlerden kaynaklandığı gözükmemektedir. AChE'da kullanılmak üzere bu prekürsör proteinlerden poliprolin peptidler, nasıl salınmaktadır? Poliprolin peptidler salınmadan önce mi oligomerlere eklenmekte ya da bu birleşmeler kan dolaşımında spontan olarak mı meydana gelmektedir? AChE'nin son halini oluşturabilmek için endoplazmik retikulumda ve/veya golgide etkileşime girmesi beklenen prekürsör proteinlerin varlığına dair herhangi bir kanıt var mı?

Tetramerizasyon peptidleri ile eşleştiği bulunan tüm sığır proteinleri, peptidin AChE ile etkileşime girdiği mekanizmayı belirlemek için detaylı olarak araştırıldı.

Bu proteinlerin dizileri NCBI'nin Protein kaynaklarından elde edildi. Proteinlerin fonksiyonları, hücredeki konumları ve doku dağılımları ise; UniProtKB protein bilgi bankasından elde edildi.

Çalışmada toplamda 5 peptid ailesi ile ilişkili, 11 sığır ve 1 insan proteini incelendi. Aile 2, 3 ve 5'deki prolince-zengin dizilerin hepsi, protein yapıları içerisinde yer almaktadır. Nükleer proteinler: 1) zinc finger protein 318, (gi 194677641) endokrin dokuda eksprese edilen, endokrin düzenleyici bir proteindir (aile 3'den bir peptid içermektedir) 2) lysine-specific demethylase 6B (gi 359076756) spesifik bir dokuda lokasyonu olmaksızın bir histon demetilazdır (aile 3'den bir peptid içermektedir). 3) YLP motif containing protein 1 (gi 297479917) telomeraz aktivitesinin redüksiyonunda rol oynamaktadır. (aile 3'den bir peptid içermektedir) 4) zinc finger homeobox protein 4 (gi 296480588) beyin, iskelet kası, karaciğer ve midede eksprese edilir. Nöral ve musküler farklılaşmada rol oynayan bir transkripsiyon düzenleyicisidir (Hem aile 2'den bir peptid, hem de aile 5'den bir peptid ve ayrıca diğer peptidleri içermektedir) 5) R3H domain-containing protein 1 (gi 194664704) bir nükleik asit bağlayan proteindir (aile 2'den bir peptid içermektedir) ve 6) myb-related p42POP (gi 359075807), bir transkripsiyonel represör ve DNA bağlayan proteindir (aile 2'den bir peptid içermektedir).

Sitoplazmik proteinler: 7) leiomodin-2 (gi 157427900) kalp ve iskelet kasında bulunan bir aktin ve tropomiyozin bağlayan proteindir (aile 2'den bir peptid içermektedir), 8) protein diaphonous homolog 3, DIAPH3 (gi 296481927) herhangi bir doku spesifitesisi olmaksızın aktin polimerizasyonunu teşvik eden bir profilin ve Rho bağlayan proteindir. (aile 3'den bir peptid içermektedir) ve 9) formin-like 1 (gi 297487196) aktin ve Rho'ya bağlanan, hücre morfolojisi ve sitoiskelet organizasyonunda yer alan bir regülatördür (aile 2 peptidini içermektedir).

Geriye kalan üç tane eşleşen proteinden ikisi (aile 1 ve aile 2 ile eşleşen), endoplazmik retikulum ile ilişkili olması bakımından daha önemli olup, sentezlendiğinde AChE ile teorik olarak bağlantılı olabilir. UDP-N-acetyl glucosamine transferase subunit ALG13 homology domain-containing protein 1 (gi 153791910), endoplazmik retikulumda proteinlerin N-glikozilasyonunda rol oynar. (Aile 1'den peptid içermektedir). Sığır taksonomisinden hiçbir protein, aile 1 peptidi ile eşleşmediği için bunun yerine insan taksonomisinden bu protein alındı.

Large proline rich protein BAG6 (gi 161621275) endoplazmik retikuluma bir kuyruk ile bağlı proteinlerin yerleşmesi ile ilişkili bir şaperondur. Aile 2'den bir peptid içermektedir. Bu proteinlerin ikisi de endoplazmik retikulumun lüminal tarafı ile değil, sitozolik tarafı ile ilişkilidir. Ayrıca topolojik özellikleri de AChE ile etkileşmek için uygun değildir.

En mükemmel aday ise; “mesoderm-specific transcript homology protein (MEST)” olup bu protein aynı zamanda “paternally expressed 10 isoform 3” (gi 187761320) (aile 4'e ait) olarak da isimlendirilmektedir. Tetramerizasyon peptidi, C-terminalinden 5 birim uzaklıkta olup FBS AChE ile etkileşim için çok uygun bir yerde konumlanmıştır. Bu durumda dört AChE monomerinin biraraya gelmesini sağlayan prolin heliksi kolaylıkla göz önünde canlandırılabilir. Olgun AChE tetrameri, MEST C-terminalinin proteolizi ile salınabilir. MEST'e benzeyen diğer proteinler için de benzer bir mekanizma, çözünür AChE tetramerlerinden izole edilen diğer tetramerizasyon peptidleri için de açıklanabilir. Bu aday için en büyük sorun, çekirdek ve sitoplazma içerisinde bulunmasıdır.

Soru 3. Bu çalışmada deneylerde kullanılan AChE, serumların birleştirilmesi ile elde edildiğinden tetramer yapıyı-organize eden peptidlerin çeşitliliği, serumlar arasındaki farklılıktan mı kaynaklanmaktadır?

Deneylerde kullanılan FBS AChE, farklı hayvanların serumundan elde edildiği için farklı poliprolin peptidlerin ortaya çıkması olasılığı gözardı edilemez. Gelecekteki çalışmalarda bu husus üzerinde daha detaylı bir araştırma yapılacaktır.

SONUÇ

Plazmadaki çözünür, tetramerik AChE molekülleri, bir poliprolin peptid içermektedir. Bu çalışma sonunda 5 tip poliprolin peptid tanımlandı. Bu poliprolin peptidler, dört AChE alt biriminin bir tetramer yapıya dönüştürüldüğü C-terminal tetramerizasyon bölgesine bağlıdır. Poliprolin peptidlerin kaynağı ise tek bir prekürsör protein değildir.

6. REFERANSLAR

1. Massoulie J., Pezzementi L., Bon, S., Krejci, E., Vallette F.M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41, 31-91.
2. Li, B., Stribley, J.A., Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L.M., Hammond, P., Brimijoin, S., Hinrichs, S.H., Lockridge, O. (2000). Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J. Neurochem.* 75, 1320-1331.
3. Feng, G., Krejci, E., Molgo, J., Cunningham, J.M., Massoulie, J., Sanes, J.R. (1999). Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function, *J. Cell Biol.* 144, 1349-1360.
4. Perrier, A.L., Massoulie, J., Krejci, E. (2002). PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron.* 33, 275-285.
5. Dvir, H., Harel, M., Bon, S., Liu, W.Q., Vidal, M., Garbay, C., Sussman, J.L., Massoulie, J., Silman, I. (2004). The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. *EMBO J.* 23, 4394-4405.
6. Simon, S., Krejci, E., Massoulie, J. (1998). A four-to-one association between peptide motifs: four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway. *EMBO J.* 17, 6178-6187.
7. Bon, S., Massoulie, J. (1997). Quaternary associations of acetylcholinesterase. I. Oligomeric associations of T subunits with and without the amino-terminal domain of the collagen tail. *J. Biol. Chem.* 272, 3007-3015.
8. Li, H., Schopfer, L.M., Masson, P., Lockridge, O. (2008). Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. *Biochem. J.* 411, 425-432.
9. Cygler, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M.K., Doctor, B.P. (1993). Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Prt. Sci.*, 2, 366-382.

10. Dale, H.H. (1914). The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 6,147-190
11. Trevor, A.J., M.A., Gordon, Parker, K.K., Chan, S.L. (1978). Acetylcholinesterases. *Life Sci.*, 23, 1209-1220.
12. Massoulie, J., Pezzement., L., Bon, S., Krejci, E. Ve Vallettes, F.M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.*, 41, 31-91.
13. Saxena, A., Redman, A.M.G., Jiang, X., Lockridge, O., Doctor, B.P. (1997). Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36, 14642-14651.
14. Darvesh, S., Grantham, D.L., Hopkins, D.A. (1998). Distribution of butyrylcholinesterase in normal human amygdala and hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.*, 393, 374-390.
15. Masson, P., Rochu, D. (2009). Catalytic bioscavengers against toxic esters, an alternative approach for prophylaxis and treatments of poisonings. *Acta Naturae*, 1, 68-77.
16. Lockridge, O., Eckerson, H.W., La Du, B.N. (1979). Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 254, 8324-8330.
17. Lockridge, O., Bert, N.L.D. (1982). Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 257, 12012-12018.
18. Chatonnet, A., Lockridge, O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.*, 260, 625-634.
19. Lockridge, O. (1988). Structure of human serum cholinesterase. *BioEssays*, 9, 125-128.
20. Rosenberry, T.L. (1975). Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 43, 103-218.
21. Soreq, H., Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Neurosci.*, 2, 294-302.

22. Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H. (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* 264, 672-686.
23. Greenfield, S.A., Zimmermann, M., Bond, C.E. (2008). Non-hydrolytic functions of acetylcholinesterase, the significance of C-terminal peptides. *FEBS J.*, 275, 604-611.
24. Landgraf, D., Barth, M., Layer, P.G., Sperling, L.E. (2010). Acetylcholine as a possible signaling molecule in embryonic stem cells: studies on survival, proliferation and death. *Chem. Biol. Interact.* 187, 115-119.
25. Small, D.H., Michaelson, S., Sberna, G. (1996). Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 28, 453-483.
26. Koelle, G. B. (1963). *Handb. Exp. Pharmacol.* 15, 187
27. Leuzinger, W., Baker, A.L. (1967). Acetylcholinesterase, I. large-scale purification, homogeneity, and amino acid analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 57,446-451.
28. Meshorer, E., Soreq, H. (2006). Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci.*, 29, 216-224.
29. Pohanka, M. (2012). Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 - present). *Expert Opin. Ther. Patents*, 22, 871-886.
30. Ralston, J.S., Rush, R.S., Doctor, B.P., Wolfe, A.D. (1985). Acetylcholinesterase from fetal bovine serum. Purification and characterization of soluble G4 enzyme. *J. Biol. Chem.*, 260, 4312-4318.
31. Hicks, D., John, D., Makova, N.Z., Henderson, Z., Nalivaeva, N.N., Turner, A.J. (2011). Membrane targetting, shedding and protein interactions of brain acetylcholinesterase. *J. Neur.*, 116, 742-746.
32. Sikorav, J.L., Duval, N., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Osterlund, M., Reimund, B., Massoulie, J. (1988). Complex alternative splicing of acetylcholinesterase transcripts in Torpedo electric organ; primary structure of the precursor of the glycolipid-anchored dimeric form. *EMBO J.*, 7, 2983-2993.

33. Legay, C., Bon, S., Massoulie, J. (1993). Expression of a cDNA encoding the glycolipidanchored form of rat acetylcholinesterase. *FEBS Lett.* 315, 163-166.
34. Perrier, A.L., Massoulie, J., Krejci, E. (2002). PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* 33, 275-285.
35. Navaratnam, D.S., Fernando, F.S., Priddle, J.D., Giles, K., Clegg, S.M., Pappin, D.J., Craig, I., Smith, A.D. (2000). Hydrophobic protein that copurifies with human brain acetylcholinesterase: amino acid sequence, genomic organization, and chromosomal localization. *J. Neurochem.* 74, 2146-2153.
36. Arpagaus, M., Kott, M., Vatsis, K.P., Bartels, C.F., La Du, B.N., Lockridge, O. (1990). Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*, 29, 124-131.
37. Toutant, J.P. (1988). Insect acetylcholinestase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog Neurobiol.*, 32, 423-446.
38. Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M.P., Pasteur, N., Raymond, M. (2002). A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is nonhomologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc. Biol. Sci.* 269, 2007-2016.
39. Vontas, J.G., Hejazi, M.J., Hawkes, N.J., Cosmidis, N., Loukas, M., Janes, R.W., Hemingway, J. (2002). Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera olea*. *Insect Mol. Biol.*, 11, 329-336.
40. Cousin, X., Creminon, C., Grassi, J., Meflah, K., Cornu, G., Saliou, B., Bon, S., Massoulie, J., Bon, C. (1996). Acetylcholinesterase from *Bungarus* venom: a monomeric species. *FEBS Lett.* 387, 196-200.
41. Hasin, Y., Avidan, N., Bercovich, D., Korczyn, A.D., Silman, I., Beckmann, J.S., Sussman, J.L. (2005). Analysis of genetic polymorphisms in acetylcholinesterase as reflected in different populations. *Curr. Alzheimer Res.*, 2, 207-218.

42. Shapira, M., Tur-Kaspa, I., Bosgraaf, L., Livni, N., Grant, A.D., Grisaru, D., Korner, M., Ebstein, R.P., Soreq, H. (2000). A transcriptionactivating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1273-1281.
43. Bartels, C.F., Zelinski, T., Lockridge, O. (1993). Mutation at codon 322 in the human acetylcholinesterase (ACHE) gene accounts for YT blood group polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 52, 928-936.
44. Ehrlich, G., Ginzberg, D., Loewenstein, Y., Glick, D., Kerem, B., Ben-Ari, S., Zakut, H., Soreq, H. (1994). Population diversity and distinct haplotype frequencies associated with ACHE and BCHE genes of Israeli Jews from trans-Caucasian Georgia and from Europe. *Genomics*, 22, 288-295.
45. Benmoyal-Segal, L., Vander, T., Shifman, S., Bryk, B., Ebstein, R.P., Marcus, E.L., Stessman, J., Darvasi, A., Herishanu, Y., Friedman, A., Soreq, H. (2005). Acetylcholinesterase/paraoxonase interactions increase the risk of insecticide-induced Parkinson's disease. *FASEB J.*, 19, 452-454.
46. Sklan, E.H., Lowenthal, A., Korner, M., Ritov, Y., Landers, D.M., Rankinen, T., Bouchard, C., Leon, A.S., Rice, T., Rao, D.C., Wilmore, J.H., Skinner, J.S., Soreq, H. (2004). Acetylcholinesterase/paraoxonase genotype and expression predict anxiety scores in Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics study. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 5512-5517.
47. Bryk, B., BenMoyal-Segal, L., Podoly, E., Livnah, O., Eisenkraft, A., Luria, S., Cohen, A., Yehezkelli, Y., Hourvitz, A., Soreq, H. (2005). Inherited and acquired interactions between ACHE and PON1 polymorphisms modulate plasma acetylcholinesterase and paraoxonase activities. *J. Neurochem.*, 92, 1216-1227.
48. Gorell, J.M, Johnson, C.C., Rybicki, B.A, Peterson, E.L., Richardson, R.J. (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neur.*, 50, 1346-1350.
49. Kondo, I., Yamamoto, M. (1998). Genetic polymorphism of paraoxonase (PON1) and susceptibility to Parkinson's disease. *Brain Res.*, 806, 271-273.

50. Soreq, H., Ben-Aziz, R., Prody, C.A., Seidman, S., Gnatt, A., Neville, L., Lieman-Hurwitz, J., Lev-Lehman, E., Ginzberg, D., Lipidot-Lifson, Y. (1990). Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C-rich attenuating structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 9688-9692.
51. Rotundo, R.L. (1988). Biogenesis of acetylcholinesterase molecular forms in muscle. Evidence for a rapidly turning over, catalytically inactive precursor pool. *J Biol Chem.*, 263, 19398-19406.
52. Velan, B., Grosfeld, H., Kronman, C., Leitner, M., Gozes, Y., Lazar, A., Flashner, Y., Marcus, D., Cohen, S., Shafferman, A. (1991). The effect of elimination of intersubunit disulfide bonds on the activity, assembly, and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. Expression of acetylcholinesterase Cys-580–Ala mutant. *J Biol Chem.*, 266, 23977-23984.
53. Rotundo, R.L., Fambrough, D.M. (1980). Synthesis, transport and fate of acetylcholinesterase in cultured chick embryos muscle cells. *Cell.*, 22, 583-594.
54. Rotundo, R.L. (1984). Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 479-483.
55. Rotundo, R.L., Rossi, S.G., Kimbell, L.M., Ruiz, C., Marrero, E. (2005). Targeting acetylcholinesterase to the neuromuscular synapse. *Chem Biol Interact.*, 157-158, 15-21.
56. Massoulie, J., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Morel, N., Simon, S. (1998). Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *J Physiol.*, 92, 183-190.
57. Legay, C., Mankal, F.A., Massoulie, J., Jasmin, B.J. (1999). Stability and secretion of acetylcholinesterase forms in skeletal muscle cells. *J Neur.*, 19, 8252-8259.
58. Lomo, T., Slater, C.R. (1980). Control of junctional acetylcholinesterase by neural and muscular influences in the rat. *J Physiol.*, 303, 191-202.

59. Cangiano, A., Lomo, T., Lutzemberger, L., Sveen, O. (1980). Effects of chronic nerve conduction block on formation of neuromuscular junctions and junctional AChE in the rat. *Acta Physiol Scand.*, 109, 283-296.
60. Michel, R.N., Vu CQ, Tetzlaff W, Jasmin BJ (1994) Neural regulation of acetylcholinesterase mRNAs at mammalian neuromuscular synapses. *J Cell Biol.*, 127:1061–1069.
61. Fernandez, H.L., Hodges-Savola, C.A. (1992). Trophic regulation of acetylcholinesterase isoenzymes in adult mammalian skeletal muscles. *Neurochem. Res.*, 17, 115-124.
62. Gregory, E.J., Hodges-Savola, C.A., Fernandez, H.L. (1989). Selective increase of tetrameric (G4) acetylcholinesterase activity in rat hindlimb skeletal muscle following short-term denervation. *J Neurochem.*, 53, 1411-1418.
63. Massoulie, J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosign.*, 11, 130-143.
64. Rossi, S.G., Vazquez, A.E., Rotundo, R.L. (2000). Local control of acetylcholinesterase gene expression in multinucleated skeletal muscle fibers: individual nuclei respond to signals from the overlying plasma membrane. *J Neurosci.*, 20, 919-928.
65. Rubin, L.L. (1985). Increases in muscle Ca²⁺ mediate changes in acetylcholinesterase and acetylcholine receptors caused by muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 7121-7125.
66. Lomo, T., Massoulie, J., Vigny, M. (1985). Stimulation of denervated rat soleus muscle with fast and slow activity patterns induces different expression of acetylcholinesterase molecular forms. *J. Neurosci.*, 5, 1180-1187.
67. Fernandez, H.L., Donoso, J.A. (1988). Exercise selectively increases G4 AChE activity in fast-twitch muscle. *J. Appl. Physiol.*, 65, 2245-2252.

68. Brenner, T., Hamra-Amitay, Y., Evron, T., Boneva, N., Seidman, S., Soreq, H. (2003). The role of readthrough acetylcholinesterase in the pathophysiology of myasthenia gravis. *FASEB J.*, 17, 214-222.
69. Evron, T., Benmoyal-Segal, L., Lamm, N., Geffen, A., Soreq, H. (2005). RNA-targetted suppression of stress-induced allostasis in primate spinal cord neurons. *Neurodegener. Dis.*, 2, 16-27.
70. Inestrosa, N.C., Moreno, R.D., Fuentes, M.E. (1994). Monomeric amphiphilic forms of acetylcholinesterase appear early during brain development and may correspond to biosynthetic precursors of the amphiphilic G4 forms. *Neurosci Lett.*, 173, 155-158.
71. Anselmet, A., Fauquet, M., Chatel, J.M., Maulet, Y., Massoulie, J., Vallette, F.M. (1994). Evolution of acetylcholinesterase transcripts and molecular forms during development in the central nervous system of the quail. *J Neurochem.*, 62, 2158-2165.
72. Arendt, T., Bruckner, M.K., Lange, M., Bigl, V. (1992). Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development-a study of molecular forms. *Neurochem. Int.*, 21, 381-396.
73. Darreh-Shori, T., Hellstrom-Lindahl, E., Flores-Flores, C., Guan, Z.Z., Soreq, H., Nordberg, A. (2004). Long-lasting acetylcholinesterase splice variations in anticholinesterase-treated Alzheimer's disease patients. *J Neurochem.*, 88, 1102-1101.
74. Schegg, K.M., Harrington, L.S., Neilsen, S., Zweig, R.M., Peacock, J.H. (1992). Soluble and membrane-bound forms of brain acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 13, 697-704.
75. Fishman, E.B., Siek, G.C., MacCallum, R.D., Bird, E.D., Volicer, L., Marquis, J.K. (1986). Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.*, 19, 246-252.

76. Younkin, S.G., Goodridge, B., Katz, J., Lockett, G., Nafziger, D., Usiak, M.F., Younkin, L.H. (1986). Molecular forms of acetylcholinesterases in Alzheimer's disease. *Fed Proc.*, 45, 2982-2988.
77. Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L., Sussmana, J.L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 187, 10-22.
78. Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J.J., Nachon, F. (2003). Crystal structure of human butyrylcholinesterase and its complexes with substrate and products. *J.Biol. Chem.*, 278, 42, 41141-41147.
79. Nachmansohn, D., Wilson, I.B. (1951). The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine, *Adv. Enzymol.*, 12, 259-339.
80. Froede, H.C., Wilson, I.B. (1971). Acetylcholinesterase, in: P.D. Boyer (Ed.), *The Enzymes*, 3rd ed. *Academic Press*, New York, 87-114.
81. Wilson, I.B., Quan, C. (1958). Acetylcholinesterase: Studies on molecular complementarity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 73, 131-143.
82. Mooser, G., Sigman, D.S. (1974). Ligand binding properties of acetylcholinesterase determined with fluorescent probes. *Biochemistry*, 13, 2299-2307.
83. Johnson, G., Moore, S.W. (2006). The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr Pharm Des.*, 12, 217-25.
84. Çokuğraş, N. (2003). Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J. Biochem.*, 28, 54-61.
85. Inestrosa, N.C., Dinamarca, M.C., Alvarez, A. (2008). Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. *FEBS J.*, 275, 625-32.
86. Taylor, P., Radic, Z. (1994). The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 34, 281-320.
87. Masson, P., Nachon, F., Froment, M.T., Bartels, C.F., Ribes, F., Matthews, C., Lockridge, O. (2003). High activity of human butyrylcholinesterase at

- low pH in the presence of butyrylcholinesterase. *Eur. J. Biochem.*, 270, 315-325.
88. Masson, P., Legrand, P., Bartels, C.F. Ribes, F., Froment, M.T., Schopfer, L.M., Lockridge, O. (1997). Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochem.*, 36, 2266-2277.
 89. Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S., Taylor, P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochem.*, 32, 12074-84.
 90. Salas, R., Main, A., Gangitano, D.A., Zimmerman, G., Ben-Ari, S., Soreq, H., De Biasi, M. (2008). Nicotine relieves anxiogenic-like behavior in mice that overexpress the read-through variant of acetylcholinesterase but not in wild-type mice. *Mol. Pharmacol.*, 74, 1641-1648.
 91. Appleyard, M.E. (1992). Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. *Trends Neurosci.*, 15, 485-490.
 92. Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S.B. (2007). The secreted b-amyloid precursor protein ectodomain APP_s is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J. Neurosci.*, 27, 7817-7826.
 93. Malatova', Z., Marsala, J. (1993). Cholinergic enzymes in spinal cord infarction. Biochemical and histochemical changes. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 19, 283-296.
 94. Rodri'guez-Ithurralde, D., Maruri, A., Rodri'guez, X. (1998). Motor neurone acetylcholinesterase release precedes neurotoxicity caused by systemic administration of excitatory amino acids and strychnine. *J. Neurol. Sci.*, 160, S80-S86.
 95. Appleyard, M.E., Smith, A.D. (1987). Spontaneous and carbacholevoked in vivo secretion of acetylcholinesterase from the hippocampus of the rat. *Neurochem. Int.*, 11, 397-406.
 96. Schweitzer, E.S. (1993). Regulated and constitutive secretion of distinct molecular forms of acetylcholinesterase from PC12 cells. *J. Cell Sci.*, 106, 731-740.

97. Nalivaeva, N.N., Turner, A.J. (1999). Does acetylcholinesterase secretion involve an ADAMs-like metallosecretase? *Lett. Peptide Sci.*, 6, 343–348
98. van Goor, H., Melenhorst, W.B., Turner, A.J., Holgate, S.T. (2009). Adamalysins in biology and disease. *J. Pathol.*, 219, 277-286.
99. Belyaev, N.D., Nalivaeva, N.N., Makova, N.Z., Turner, A.J. (2009). Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep.*, 10, 94-100.
100. Cordy, J.M., Hooper, N.M., Turner, A.J. (2006). The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol. Membr. Biol.*, 23, 111-122.
101. Cordy, J.M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N.M., Turner, A.J. (2003) Exclusively targeting b-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates b-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 11735-11740.
102. Vetrivel, K.S., Thinakaran, G. (2010). Membrane rafts in Alzheimer's disease b-amyloid production. *Biochim. Biophys. Acta*, 1801, 860-867.
103. Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer b-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.*, 160, 113-123.
104. Massoulie, J., Bon, S., Perrier, N., Falasca, C. (2005). The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem. Biol. Interact.*, 157-158, 3-14.
105. Xie, H.Q., Liang, D., Leung, K.W., Chen, V.P., Zhu, K.Y., Chan, W.K., Choi, R.C., Massoulie, J., Tsim, K.W. (2010). Targeting acetylcholinesterase to membrane rafts: a function mediated by the proline-rich membrane anchor (PRiMA) in neurons. *J. Biol. Chem.*, 285, 11537-11546.
106. Henderson, Z., Matto, N., John, D., Nalivaeva, N.N., Turner, A.J. (2010). Co-localization of PRiMA with acetylcholinesterase in cholinergic neurons of rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res.*, 1344, 34-42.
107. Xie, H.Q., Cho, R., Leung, K.W., Chen, V.P., Chu, G.K., Tsim, K.W. (2009). Transcriptional regulation of proline-rich membrane anchor

- (PRiMA) of globular form acetylcholinesterase in neuron: an inductive effect of neuron differentiation. *Brain Res*, 1265, 13-23.
108. Moral-Naranjo, M.T., Montenegro, M.F., Munoz-Delgado, E., Campoy, F. J., Vidal, C.J. (2010). The levels of both lipid rafts and raftlocated acetylcholinesterase dimers increase in muscle of mice with muscular dystrophy by merosin deficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, 1802, 754-764.
 109. Fitzpatrick-McElligott, S., Stent, G.S. (1981). Appearance and localization of acetylcholinesterase in embryos of the leech *Helobdella triserialis*. *J. Neurosci.*, 1, 901-907.
 110. Betz, H., Bourgeois, J.P., Changeux, J.P. (1980). Evolution of cholinergic proteins in developing slow and fast skeletal muscles in chick embryo. *J. Physiol.*, 302, 197-218.
 111. Layer, P.G. (1990). Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. *Bioessays*, 12, 415-420 .
 112. Kreutzberg, G.W. (1969). Neuronal dynamics and axonal flow. IV. Blockage of intra-axonal enzyme transport by colchicine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 62, 722-728.
 113. Escalera, S., Bockamp, E.O., Moya, F., Piovant, M., Jimenez, F. (1990). Characterization and gene cloning of neurotactin, a *Drosophila* transmembrane protein related to cholinesterases. *The EMBO J.*, 9, 3593-3601.
 114. Zimmerman, G., Soreq, H. (2006). Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.*, 326, 655-669.
 115. Wright, C.I., Geula, C., Mesulam, M.M. (1993). Neurological cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann. Neurol.*, 34, 373-384.
 116. Kawashima, K., Fujii, T. (2000). Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol. Ther.*, 86, 29-48.
 117. Soreq, H. (1994). Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and

- suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 7907-7911.
118. Brown, L.M. (1990). Pesticide exposure and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.*, 50, 6585-6591.
119. Lapidot-Lifson, Y. (1989). Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 4715-4719.
120. Cvetkovic, D., Skender, M., Dozic, S. (2001). Neuropathological hallmarks of Alzheimer's disease. *Arch. Oncol.*, 9, 195-199.
121. LaFerla, F.M., Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: Ab, tau and synaptic dysfunction. *TRENDS Mol. Med.*, 11, 170-176.
122. Pohanka, M. (2011). Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders: implication and counteracting of melatonin. *J. Appl. Biomed.*, 9, 185-196.
123. Bassil, N., Thaipisuttikul, P., Grossberg, G.T. (2010). Memantine ER, a one-daily formulation for the treatment of Alzheimer's disease. *Exp. Op. Pharm.*, 11, 1765-1771.
124. Birks, J, Harvey, R.J. (2003). Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.*, CD001190.
125. Heydorn, W.E. (1997). Donepezil (E2020): a new acetylcholinesterase inhibitor. Review of its pharmacology, pharmacokinetics, and utility in the treatment of Alzheimer's disease. *Exp. Op. Invest. Drugs*, 6, 1527-1535.
126. Huang, F., Fu, Y. (2010). A review of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of galantamine, a reversible acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease, in healthy subjects and patients. *Curr. Clin. Pharmacol.*, 5, 115-124.
127. Bartolucci, C., Perola, E., Pilger, C. (2001). Three dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Proteins*, 42, 182-191.

128. Schilstrom, B., Ivanov, V.B., Wiker, C., Svensson, T.H. (2007). Galantamine enhances dopaminergic neurotransmission in vivo via allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropsychopharmacology*, 32, 43-53.
129. Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Meng, X. (2011). Rivastigmine transdermal patch and capsule in Alzheimer's disease: influence of disease stage on response to therapy. *Int J Geriatric Psychiatry*, 26, 1236-1243.
130. Kostromytska, O.S, Buss, E.A. (2008). Seasonal phenology and management of *Tomarus subtropicus* (Coleoptera: scarabaedae) in St. Augustinegrass. *J Econ Entomol.*, 101, 1847-1855.
131. Heining, R, Sachse, R. (1999). The effect of food and time of administration on the pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of metrifonate. *Int J Clin Pharmacol Ther.*, 37, 456-464.
132. Marrs, T.C. (1993). Organophosphate poisoning. *Pharmac Ther.*, 58, 51-66.
133. Bajgar, J. (2004). Organophosphates/nerve agents poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv Clin Chem.*, 38, 151-216
134. O'Reilly D.A., Heikens, G.T. (2011). Organophosphate poisoning in a 12-day-old infant: case report. *Ann Trop Paediatr.*, 31,263-267.
135. Thiermann, H., Steinritz, D., Worek, F. (2011). Atropine maintenance dosage in patients with severe organophosphate pesticide poisoning. *Toxicol Lett.*, 206, 77-83.
136. Pohanka, M. (2011). *Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.,155, 219-230.
137. Darvesh, S., Darvesh, K.V., McDonald, R.S. (2008). Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J. Med. Chem.*, 51, 4200-4212.
138. Aldridge, W.N., Reiner, E. (1972). *Enzyme inhibitors as substrates*. North Holland, Amsterdam.
139. Millard, C.B., Kryger, G., Ordentlich, A., Greenblatt, H.M., Harel, M., Raves, M.L. (1999). Crystal structures of aged phosphonylated

- acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. *Biochem.*, 38, 7032-7039.
140. Mehta, D. Synthesis of an organophosphorus analog of acetylcholine. (1997). Thesis for Chemistry 499 and Research Honors, Illinois Wesleyan University.
 141. Rubenstein, E. (2000). Biologic effects of and clinical disorders caused by nonprotein amino acids. *Medicine*, 79, 80-89.
 142. Bell, E.A. (2003). Nonprotein amino acids of plants: significance in medicine, nutrition, and agriculture. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2854-2865
 143. Williamson, M.P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.*, 297, 249-260.
 144. MacArthur, M.W., Thornton, J.M. (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.*, 218, 397-412.
 145. Baldwin, R.L. (2008). The search for folding intermediates and the mechanism of protein folding. *Annu Rev Biophys.*, 37, 1-21
 146. Morgan, A.A., Rubenstein, E. (2013). Proline: the distribution, frequency, positioning, and common functional roles of proline and polyproline sequences in the human proteome. *Plos one*, 8, e53785.
 147. Hoz, D.D., Doctor, B.P., Ralston, J.S., Rush, R.S., Wolfe, A.D. (1986). A simplified procedure for the purification of large quantities of fetal bovine serum acetylcholinesterase. *Life Sci.*, 39, 195-199.
 148. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Feather, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
 149. Renner, D., Spiteller, G. (1988). Linked scan investigation of peptide degradation initiated by liquid secondary ion mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 15, 75-77.
 150. Grese, R.P., Cerny, R.L., Gross, M.L. (1989). Metal ion-peptide interactions in the gas phase: a tandem mass spectrometry study of alkali metal cationized peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 2835-2842.
 151. Teesch, L.M., Adams, J. (1991). Fragmentation of gas-phase complexes between alkali metal ions and peptides: metal ion binding to carbonyl

- oxygen and other neutral functional groups. *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 812-820.
152. Lin, T., Glish, G.L. (1998). C-terminal peptide sequencing via multistage mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 70, 5162-5165.
153. Barr, J.M., Van Stipdonk, M.J. (2002). Multi-stage tandem mass spectrometry of metal cationized leucine enkephalin and leucine enkephalin amide, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16, 566-578.
154. Tang, X.J., Ens, W., Standing, K.G., Westmore, J.B. (1988). Daughter ion mass spectra from cationized molecules of small oligopeptides in a reflecting time-of-flight mass spectrometer, *Anal. Chem.*, 60, 1791-1799.
155. Biberoglu, K., Schopfer, L.M., Tacal, Ö., Lockridge, O. (2012). The proline-rich tetramerization peptides in equine serum butyrylcholinesterase. *FEBS J.*, 279, 3844-3858.
156. Biberoglu, K., Schopfer, L.M., Saxena, A., Tacal, O., Lockridge, O. (2013). Polyproline tetramer organizing peptides in fetal bovine serum acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys Acta.* 1834, 745-753.
157. Donger, C., Krejci, E., Serradell, A.P., Eymard, B., Bon, S., Nicole, S., Chateau, D., Gary, F., Fardeau, M., Massoulie, J., Guicheney, P. (1998). Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am. J. Hum. Genet.*, 63, 967-975.
158. Krejci, E., Thomine, S., Boschetti, N., Legay, C., Sketelj, J., Massoulie, J. (1997). The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J. Biol. Chem.*, 272, 22840-22847.
159. S. Bon, F. Coussen, J. Massoulie. (1997). Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. *J. Biol. Chem.*, 272, 3016-3021.
160. Krejci, E., Coussen, F., Duval, N., Chatel, J.M., Legay, C., Puype, M., Vandekerckhove, J., Cartaud, J., Bon, S., Massoulie, J. (1991). Primary structure of a collagenic tail peptide of Torpedo acetylcholinesterase: co-expression with catalytic subunit induces the production of collagen-tailed forms in transfected cells. *EMBO J.*, 10, 1991, 1285-1293.

161. Nouredine, H., Schmitt, C., Liu, W., Garbay, C., Massoulie, J., Bon, S. (2007). Assembly of acetylcholinesterase tetramers by peptidic motifs from the proline-rich membrane anchor, PRiMA: competition between degradation and secretion pathways of heteromeric complexes. *J. Biol. Chem.*, 282, 3487-3497.
162. Fernandez-Patron, C., Hardy, E., Sosa, A., Seoane, J., Castellanos, L.(1995). Double staining of Coomassie blue-stained polyacrylamide gels by imidazole–sodium dodecyl sulfate–zinc reverse staining: sensitive detection of coomassie blue-undetected proteins. *Anal. Biochem.*, 224, 263-269.
163. Koomen, J.M., Li, D., Xiao, L.C., Liu, T.C., Coombes, K.R., Abbruzzese, J., Kobayashi, R. (2005). Direct tandem mass spectrometry reveals limitations in protein profiling experiments for plasma biomarker discovery *J. Proteome Res.*, 4, 972-981.
164. Khoury, G.F., Brill, J., Walts, L., Busuttill. R.W. (1987). Atypical serum cholinesterase eliminated by orthotopic liver transplantation. *Anesthesiology*, 67, 273-274.