

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

nAChR  $\alpha 7$ 'NİN SİNAPTİK PLASTİSİTE ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
OLFAKTÖR BULBUS VE HİPPOKAMPUS ORGANOTİPİK KESİT  
KÜLTÜRLERİNDE İNCELENMESİ

İREM LÜTFİYE ATASOY

TEZ DANIŞMANI  
PROF.DR. SELMA YILMAZER

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PORGRAMI

İSTANBUL-2018



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

**nAChR  $\alpha 7$ 'NİN SİNAPTİK PLASTİSİTE ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
OLFAKTÖR BULBUS VE HİPPOKAMPUS ORGANOTİPİK KESİT  
KÜLTÜRLERİNDE İNCELENMESİ**

**İREM LÜTFİYE ATASOY**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF.DR. SELMA YILMAZER**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**İSTANBUL-2018**

**TEZ ONAYI**

Bu çalışma 27.12.2018 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul  
edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. SELMA YILMAZER  
Altınbaş Üniversitesi  
Tıp Fakültesi



Doç. Dr. DUYGU GEZEN-AK  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



Doç. Dr. ERDİÑÇ DURSUN  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



Prof. Dr. TAMER DEMİRALP  
İstanbul Üniversitesi  
İstanbul Tıp Fakültesi



Prof. Dr. FATMA SAVRAN OĞUZ  
İstanbul Üniversitesi  
İstanbul Tıp Fakültesi

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

**İREM LÜTFİYE ATASOY**

## İTHAF

Hüseyin Sönmez'e ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca her konuda en büyük destekçim olan ve bilimsel açıdan gelişmemi sağlayan danışmanım Prof. Dr. Selma Yılmaz'er,

Eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Turgut Ulutin'e,

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Duygu Gezen Ak ve Doç. Dr. Erdinç Dursun'a,

Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıkları Araştırma Laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma,

Bilgisini ve bakış açısını önemseydiğim, örnek aldığım Prof. Dr. Tamer Demiralp'a,

Konfokal mikroskopi görüntüleme kısmında bana çok yardımcı olan Ümit Kına'ya,

Beni ziyaretçi öğrenci olarak kabul ederek laboratuvarında bulunduğum sürece yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen, bilimsel düşünce yapısı ile beni etkileyen Prof. Dr. Takeshi Imai'ye,

Bilgilerini benimle paylaşan ve bana her konuda yardımcı olan her zaman sevgiyle anacağım Imai Lab'daki arkadaşlarıma,

Doktora eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen ve beni her zaman motive ederek daha ileri gitmemi sağlayan çatısı altında olmaktan mutluluk duyduğum Pandora Kitabevi'ne,

Bilgi ve tecrübeleri ile yön buldurucu olan Hüseyin Sönmez'e,

Her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Dr. Derya Metin-Armağan'a

Maddi ve manevi her zaman beni destekleyen, sıkıntımı, mutluluğumu ve heyecanımı paylaşan güzel annem Mehtap Atasoy, babam Coşkun Atasoy ve teyzem Tülay Küçük'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-22337.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN .....	İİİ
İTHAF .....	İV
TEŞEKKÜR .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ .....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİ
ÖZET .....	XİV
ABSTRACT .....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. OLFAKTÖR SİSTEM .....	5
2.1.1. Olfaktör epitel ve Olfaktör duyu nöronları .....	5
2.1.2. Glomerulus içerisindeki sinaptik iletim .....	6
2.1.3. Mitral hücreler ve püsküllü (tufted) hücreler .....	8
2.1.4. Granüler hücreler .....	10
2.1.5. Kortikal Uzantılar .....	10
2.2. HİPPOKAMPAL SİSTEM .....	11
2.3. KOLİNERJİK SİSTEM .....	12
2.3.1. Asetilkolin ve Asetilkolin Reseptörleri .....	12
2.3.1.1. Muskarinik Asetilkolin Reseptörü .....	12
2.3.1.2. Nikotinik Asetilkolin Reseptörü/ ligand kapılı iyon kanalı .....	13
2.3.2. nAChR Agonist ve Antagonistleri .....	15
2.3.2.1. Agonistler .....	15
2.3.2.2. Antagonistler .....	15
2.3.3. Kolinerjik Devreler .....	16
2.3.3.1. Asetilkolin ve Olfaktör Bulbus .....	16
2.3.3.2. Asetilkolin ve Hippokampus .....	17
2.4. SİNAPTİK PLASTİSİTE .....	17
2.4.1. Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BNDF) .....	18

2.4.2. Sinaptik Plastisitede Translasyonel Kontrol .....	19
2.4.2.1. eIF4e .....	20
2.4.2.2. CPEB .....	20
2.4.2.3. Neuroguidin .....	21
2.5. ORGANOTİPİK KESİT KÜLTÜRÜ .....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	25
3.1. ORGANOTİPİK KESİT KÜLTÜRÜ .....	25
3.1.1. Kültürün hazırlanması .....	25
3.1.2. Diseksiyon .....	26
3.1.3. Vibratom ile kesit alma .....	26
3.2. METHYLLYCACONİTİNE (MLA) UYGULAMASI .....	28
3.3. WESTERN BLOT YÖNTEMİ .....	28
3.3.1. Total protein izolasyonu .....	28
3.3.2. Sinaptik Protein İzolasyonu .....	28
3.3.3. Protein Miktarlarının Tayini .....	29
3.3.4. Proteinlerin Jele Yüklenmesi ve Jel Elektroforezi .....	29
3.3.5. Proteinlerin Nitroselülöz Membrana Aktarılması .....	30
3.3.6. Membranın Antikorlar ile İnkübe Edilmesi .....	30
3.3.7. Membranın Kemilüminesan Görüntülenmesi .....	31
3.4. İMMÜNOHISTOKİMYASAL BOYAMA .....	31
3.5. GÖRÜNTÜLEME .....	32
3.6. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER .....	32
4. BULGULAR .....	34
4.1. WESTERN BLOT ANALİZİ İLE SAPTANAN PROTEİN EKSPRESYON SONUÇLARI .....	34
4.1.1. nAChR Seviyeleri .....	34
4.1.1.1. Total nAChR a7 Seviyeleri .....	34
4.1.1.2. Sinaptik nAChR a7 Seviyeleri .....	35
4.1.2. BDNF Seviyeleri .....	36
4.1.2.1. Total BDNF Seviyeleri .....	36
4.1.2.2. Sinaptik BDNF seviyeleri .....	37
4.1.3. CPEB3 Seviyeleri .....	39
4.1.3.1. Total CPEB3 Seviyeleri .....	39



4.1.3.2. Sinaptik CPEB3 Seviyeleri .....	40
4.1.4. Ngdn Seviyeleri.....	41
4.1.4.1. Total Ngdn Seviyeleri .....	41
4.1.4.2. Sinaptik Ngdn Seviyeleri .....	42
4.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL SONUÇLAR.....	43
4.2.1. BDNF ve nAChR $\alpha$ 7'nin Olfaktör Bulbusdaki Dağılımı .....	43
4.2.2. CPEB3 ve Ngdn'in Olfaktör Bulbusdaki Dağılımı.....	47
4.2.3. nAChR $\alpha$ 7 ve BDNF'nin Hippokampusdaki Dağılımı.....	50
4.2.4. CPEB3 ve Ngdn'in Hippokampusdaki Dağılımı .....	53
5. TARTIŞMA .....	56
KAYNAKLAR .....	64
ETİK KURUL KARARI .....	69
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	70
ÖZGEÇMİŞ .....	71

**TABLolar LİSTESİ**

Tablo 3-1: Kùltür medyumunun içeriği .....	25
Tablo 3-2: Diseksiyon medyumunun içeriği.....	26
Tablo 3-3: Western Blot deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar .....	30
Tablo 3-4: İmmünohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer ve sekonder antikorlar .....	32



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: A) Olfaktör bulbus içerisindeki esas hücresel sistemler görünmektedir. B) Olfaktör bulbus'dan alınan koronal kesit ile hücre katmanlarının gösterimi .....	6
Şekil 2-2: Glomerüler tabakada bulunan nöronlar görünmektedir .....	7
Şekil 2-3: Dış pleksiform tabaka ve mitral hücre tabakasında bulunan nöron alt tipleri..	9
Şekil 2-4: Mitral ve püsküllü (tufted) hücrelerinin kortikal uzantıları görünmektedir...	11
Şekil 2-5: A) Hippokampal sistem ve B) Dentat gyrus histolojik kesiti.....	12
Şekil 2-6: Nikotinik asetil kolin reseptörlerinin beyindeki dağılımı. Kemirgen beyinde bulunan nikotinik asetilkolin reseptör alttiplerinin bölgesel dağılımı .....	13
Şekil 2-7: nAChR $\alpha 7$ reseptörünün şematik olarak gösterilmesi.....	14
Şekil 2-8: nAChR $\alpha 7$ 'nin pre- ve post-sinaptik nöronda konumlanması.....	15
Şekil 2-9: Bazal ön beyindeki kolinerjik nöronlarının beyindeki farklı bölgelere uzantıları görülmektedir .....	16
Şekil 2-10: Erken USP sırasında uyarıcı sinapsların BDNF aracılı düzenlenmesi.....	19
Şekil 2-11: Neuroguidin hem CPEB hemde eIF4E ile etkileşime girerek translasyonun düzenlenmesini sağlar .....	22
Şekil 2-12: Organotipik kültürün hazırlanması için kullanılan teknikler .....	24
Şekil 3-1: Organotipik kesit kültürünün hazırlanması .....	27
Şekil 3-2: Kültüre edilen hippocampus kesitlerinin ışık mikroskobu ile gösterilmesi...	27
Şekil 3-3: Kültüre edilen olfaktör bulbus kesitlerinin ışık mikroskobu ile gösterilmesi	27
Şekil 4-1: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki nAChR $\alpha 7$ protein seviyesindeki değişimler görülmektedir .....	35
Şekil 4-2: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki sinaptik nAChR $\alpha 7$ protein seviyesindeki değişimler görülmektedir .....	36
Şekil 4-3: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki BDNF protein seviyesindeki değişimler görülmektedir .....	37
Şekil 4-4: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki sinaptik BDNF protein seviyesindeki değişimler görülmektedir .....	38
Şekil 4-5: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki CPEB3 protein seviyesindeki değişimler görülmektedir .....	39
Şekil 4-6: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki sinaptik CPEB3 protein seviyesindeki değişimler görülmektedir .....	40
Şekil 4-7: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki Ngdn protein seviyesindeki değişimler görülmektedir .....	41
Şekil 4-8: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki sinaptik Ngdn protein seviyesindeki değişimler görülmektedir .....	42
Şekil 4-9: Olfaktör Bulbus'un organotipik kesitteki genel görünümü.....	43
Şekil 4-10: 24 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 24 saat sonra, BDNF ve nAChR $\alpha 7$ proteinlerinin olfaktör bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	44
Şekil 4-11: 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, BDNF ve nAChR $\alpha 7$ proteinlerinin olfaktör bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi .....	46
Şekil 4-12: 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, BDNF ve nAChR $\alpha 7$	

proteinlerinin olfaktor bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	47
Şekil 4-13: 24 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 24 saat sonra, CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin olfaktor bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	48
Şekil 4-14: 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin olfaktor bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	49
Şekil 4-15: 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin olfaktor bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	50
Şekil 4-16: Hippokampusun organotipik kesit kültüründeki genel görünümü.....	51
Şekil 4-17: 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, BDNF ve nAChR $\alpha$ 7 proteinlerinin hippocampusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	52
Şekil 4-18: 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, BDNF ve nAChR $\alpha$ 7 proteinlerinin hippocampus Dentat gyrus bölgesinde dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	53
Şekil 4-19: 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin hippocampusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	54
Şekil 4-20: 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin hippocampus Dentat gyrus bölgesindeki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi.....	55
Şekil 5-1: Presinaptik ve postinaptik bölgelerde sinaptik protein sentezinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinler ve ilişkili şematik gösterimi.....	63

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- a-Btx: alfa bungarotoksin  
Ach: Asetilkolin  
AON: Anterior olfaktör nukleus  
AONpE: Anterior olfaktör nukleus pars externa  
BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör  
CA: Cornu Ammonis  
CCK: Kolesistokinin  
ChAT: Kolin asetiltransferaz  
CPE: Sitoplazmik poliadenilasyon element  
CPEB: Sitoplazmik poliadenilasyon elementine bağlanan protein  
DG: Dentat gyrus  
DPT: Dış pleksiform tabaka  
DT: Dış püsküllü (tufted)  
eIF4E: ökaryotik translasyonu başlatıcı faktör 4  
GHT: Granüler hücre tabakası  
GH: Granüler hücre  
GT: Glomerular tabaka  
HDB: Diyagonal bandın horizontal uzantısı  
İPT: İç pleksiform tabaka  
JG: Jukstaglomerular  
MACHR: muskarinik asetilkolin reseptör  
MHT: Mitral hücre tabakası  
MLA: Methyllycaconitine  
MS: Medyal Septum  
nAChR: nikotinik asetilkolin reseptör  
nAChR a7: nikotinik asetilkolin reseptör alfa 7  
Ngdn: Neuroguidin  
OB: Olfaktör bulbus  
ODN: Olfaktör duyu nöronu

ONT: Olfaktör nöron tabakası

PABP: Poliadenilasyon bağlayıcı protein

PG: Periglomerular hücre

TM: Transmembran

TMB: Transmembran bölge

USD: Uzun süreli depresyon

USP: Uzun süreli potansiyasyon

VDB: Diyagonal bandın vertikal uzantısı

Yka: Yüzeyel kısa akson



## ÖZET

ATASOY, İ.L. (2018). nAChR  $\alpha 7$ 'nin Sinaptik Plastisite Üzerine Etkilerinin Olfaktör Bulbus ve Hippokampus Organotipik Kesit Kültürlerinde İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Olfaktör bulbus koku bilgisinin işlendiği beyin bölgesidir. Olfaktör bulbus ön beyinden gelen kolinerjik girdiler almaktadır ve yüksek seviyede nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) içermektedir. Bu çalışmada, olfaktör bulbus ve hippocampus kesit kültürlerine bir nAChR  $\alpha 7$  antagonisti olan methyllycaconitine (MLA) uygulaması yapılarak, sinaptik plastisite için gerekli olan beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) ve sinaptik protein sentezini kontrol eden sitoplazmik poliadenilasyon elementine bağlanan protein (CPEB) ve Neuroguidin (Ngdn) proteinlerinin total ve sinaptik alanlardaki seviyeleri, 6, 24 ve 48. saatlerde Western blot yöntemi ile incelendi. Söz konusu proteinlerin olfaktör bulbus ve hippocampusdaki dağılımları immünohistokimyasal yöntemle araştırıldı. Western blot bulgularımız, kolinerjik aktivitenin nAChR  $\alpha 7$  reseptörünün inhibisyonu aracılığıyla engellenmesinin nAChR  $\alpha 7$ , BDNF, CPEB3, Ngdn proteinlerinin ifadelerini doz, süre ve bölgeye bağlı bir şekilde etkilediğini gösterdi. İmmünohistokimyasal sonuçlarımız, nAChR  $\alpha 7$ 'nin olfaktör bulbusda glomerüler tabakada (GT), dış pleksiform ve iç pleksiform tabakalarda yoğunlaştığını gösterdi. BDNF'nin, olfaktör nöron tabakası (ONT) ve GT'de konumlandığı, GT'deki immünreaksiyon şiddetinin doza bağlı olarak nAChR  $\alpha 7$  inhibisyonundan etkilendiği gözlemlendi. CPEB3 ve Ngdn'nin olfaktör bulbus'da tüm bölgelerde ifade edildiği, BDNF, CPEB3 ve Ngdn'nin glomerüllerde birlikte yerleşim gösterdiği saptandı. Hippokampusta ise nAChR  $\alpha 7$  ve BDNF yaygın bir immün işaretlenme gösterdi. Ngdn ve CPEB3'ün hippocampusun dentat gyrus bölgesinde konumlandığı saptandı. Sonuç olarak, bu çalışmada organotipik kesit kültürlerinde nAChR  $\alpha 7$  antagonisti MLA uygulanmasının sinaptik plastisite için önemli bir mekanizma olan sinaptik protein sentezinin kontrol edilmesinde görevli CPEB3, Ngdn proteinlerinin ve sinaptik düzenleyici BDNF'nin olfaktör bulbus ve hippocampusdaki total ve sinaptik protein seviyelerinde ve dağılımlarında değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Sonuçlarımız, kolinerjik sistemin nAChR  $\alpha 7$  reseptör aracılığıyla olfaktör bulbus ve hippocampusta sinaptik plastisitenin oluşması ve sürdürülmesinde önemli rolleri bulunabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler : CPEB3, Ngdn, nAChR  $\alpha 7$ , BDNF, MLA, sinaptik plastisite

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-22337.

## ABSTRACT

ATASOY, I.L. (2018). The effects of nAChR  $\alpha 7$  on synaptic plasticity by olfactory bulb and hippocampal organotypic slice culture. İstanbul University, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. PhD thesis. İstanbul.

Olfactory bulb (OB) glomeruli, the initial sites of synaptic processing of odor information, exhibit high levels of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) expression and receive strong cholinergic input from the basal forebrain. Acetylcholine is important modulator in odor related memory. It has been suggested that Ach and nicotinic acetylcholine receptor may have an important role in odor discrimination and modulation of smell memory. In this study, olfactory bulb and hippocampal organotypic slice culture was established. Specific nAChR  $\alpha 7$  antagonist methyllycaconitine (MLA) was applied to the organotypic slices. After treatment periods both synaptic and total protein expression levels and localization of Brain derived neurotrophic factor (BDNF), cytoplasmic polyadenylation binding protein (CPEB), neuroguidin and nAChR  $\alpha 7$  was determined by Western blot and immunohistochemistry methods. Our western blot analysis indicate that cholinergic activity through nAChR  $\alpha 7$  receptor could have direct or indirect effects on synaptic plasticity by regulating protein expression levels of nAChR  $\alpha 7$ , BDNF, CPEB3, Ngdn by a dose and time dependent manner. Our immunohistochemical analysis indicate that nAChR  $\alpha 7$  immunoreactivity was detected glomerular layer, external and internal plexiform layers in the OB. Also, BDNF, CPEB3 and Ngdn proteins colocalized only in the glomerular layer. BDNF and nAChR  $\alpha 7$  immunoreactivity was shown widely distributed in the hippocampus. CPEB3 and Ngdn immunoreactivity was detected in the dentate gyrus. Consequently, our study indicated that the potential effects of cholinergic system through nAChR  $\alpha 7$  may contribute to the maintenance of synaptic plasticity in the olfactory bulb and hippocampus since the receptor has regulatory effects on the protein expression levels of BDNF, CPEB3, Ngdn.

**Key Words:** CPEB3, Ngdn, nAChR  $\alpha 7$ , BDNF, MLA, synaptic plasticity

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2016-22337



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Memeli sinir sisteminde, sinaptik bağlantıların deneyimlere dayalı modifikasyonlarının (sinaptik plastisite) öğrenme ve belleğin altında yatan esas mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bu modifikasyonlar için sinapslarda uzun süreli potansiyasyona (USP) ihtiyaç duyulmaktadır (Udagawa ve ark., 2012).

Olfaktör sistem hem filogenetik açıdan ileri derecede korunmuş olması hem de memeli thalamo-kortikal yollarına kıyasla oldukça kısa ve basit yollara sahip olması ile belleğin nörobiyolojik süreçlerinin çalışılması için oldukça iyi bir model sistem oluşturmaktadır (Wilson ve ark., 2004). Olfaktör bulbus (OB) olfaktör epitel içerisindeki olfaktör reseptör nöronlardan gelen bilgiyi beyne ulaştıran ve işleyen bölgedir. Bu bilginin olfaktör bulbusa sinaptik girişi olfaktör glomerüllerde gerçekleşir. Olfaktör glomerül, olfaktör nöronun aksonu, mitral ve püsküllü (tufted) hücrelerin dentritleri, periglomerular hücrelerin dentritleri ve beyinin farklı bölgelerinde bulunan ve OB'ye uzanan nöronların aksonları olmak üzere 4 ana bileşenden oluşmaktadır (Liberia ve ark., 2013). Mitral hücreler OB'nin glutamaterjik nöronlarıdır ve sıçanda herbulbusda yaklaşık 100.000 adet mitral hücre bulunmaktadır. Mitral hücreler olfaktör reseptörden gelen bilgiyi olfaktör kortekse, amigdalya ve lateral entorhinal kortekse iletmektedir (Wilson ve ark., 2004; Eggerve Urban, 2006). OB beyindeki en plastik bölgelerden biridir. Her gün, yaklaşık 30.000 ila 40.000 yeni nöronal öncül hücre OB'ye ulaşır ve bunların hemen hemen yarısı olgunlaşarak bulbar ağa entegre olur. Bu nöronal öncül hücrelerin % 95'i granüler hücrelere (GH) farklılaşırken, diğerleri periglomerüler nöronlar (PG) haline gelir. GH'lerin % 10–15'inin ve PG'lerin % 30'unun erişkin dönemde yenilendiği düşünülmektedir (Hardy ve Saghatelian, 2017).

Birçok çalışma, erişkin dönemde oluşan nöronların, sinapsların yeniden düzenlenmesi ve koku bilgisinin işlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Olfaktör sistemde öğrenme ve koku deneyimleme ile birlikte kısa ve uzun süreli sinaptik plastisite, dentritik komplekslerin morfolojik değişimleri, deneyime bağlı nörogenez ve apoptoz gibi süreçler gerçekleşmektedir. Kısa süreli sinaptik plastisite olfaktör bulbus ve piriform kortekste meydana gelmektedir. Ayrıca, olfaktör sistemdeki kısa süreli sinaptik plastisite tekrarlanan veya uzun süreli uyarılmaya karşı adaptasyon için de önemli olabilir. Anterior piriform kortikal nöronlar glutamaterjik mitral hücrelerden gelen

korunmuş girdilerin yanısıra yeni kokulara da hızlıca adapte olurlar. Uzun süreli sinaptik plastisite olfaktör sistemde meydana gelen bir süreçtir. Omurgalılarda, olfaktör reseptör nöronlar, mitral hücreler ve piriform kortikal nöronlar glutamaterjik nöronlardır ve bu nöronların pekçok postsinaptik hedefinde NMDA reseptörleri ve diğer reseptörleri ifade edilir. İn vitro çalışmalar olfaktör reseptör nöron ile mitral hücreler arasındaki sinapslarda yüksek sıklıkta tekrarlanan uyarıların takiben USP meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Söz konusu sinapslarda hem dinlenme durumu hemde USP benzeri plastisite, Broca alanının diyagonal bandın horizontal uzantılarından (HDB) gelen asetilkolin ve Lokus Coeruleus' dan gelen norepinefrin gibi olfaktör sistem dışından gelen girdiler tarafından da düzenlenebilir (Wilson ve ark., 2004). Entorhinal korteks, medial temporal lob bellek sisteminin bir parçasıdır ve duyuların algılanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Lateral entorhinal korteks ise, olfaktör korteksin bir parçasıdır ve hem olfaktör bulbus hemde piriform korteksten girdiler almaktadır (Chapuis ve ark., 2013).

Asetilkolin memeli merkezi sinir sistemi boyunca salınarak; uyku-uyanıklık, dikkat ve bellek oluşumu gibi global beyin fonksiyonlarını etkilemektedir. Hippokampus, medyal septum ve Broca alanının diagonal bandından (MS/DBB) kolinerjik girdiler olarak uyarılır. Fonksiyonel olarak, asetilkolinin hippokampusta salınmasının, ekstrasellüler alandaki konsantrasyonuna bağlı olarak, belleğin oluşumu yada geri çağrılmasında yardımcı olduğu düşünülmektedir (McQuiston, 2014). Asetilkolin, nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) ve muskarinik asetilkolin reseptörlerine (mAChR) bağlanır (Lombardo ve Maskos, 2015). Nöronal nAChR'ları tüm beyinde ifade edilir ve birçok nörotransmitter yolağın sinaptik iletinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. nAChR  $\alpha 7$  olfaktör bulbus, serebral korteks, hippokampus, amigdala gibi bölgelerde oldukça yüksek seviyede ifade edilmektedir ve yüksek kalsiyum iyon geçirgenliği ve hızlı duyarsızlaşma eşiğine sahiptir (Koukouli ve Maskos, 2015). Presinaptik terminaldeki nAChR  $\alpha 7$  diğer nörotransmitterlerin salınmasını düzenlerken, postsinaptik ya da nöron somasında konumlanan nAChR  $\alpha 7$  intrasellüler  $Ca^{+2}$  seviyesinde önemli değişimlere neden olarak ikincil haberci sinyal yollarını aktive eder. Bu şekilde nöronal sağkalım ve gen ekspresyonu gibi hücrel süreçlere katılabilir. nAChR  $\alpha 7$ 'nin aktivitesi gelişim sırasında glutamaterjik sinapsların olgunlaşması için oldukça önemlidir (Lombardo ve Maskos, 2015). Ayrıca, ACh ve nAChR'nün koku

ayrılanması ve koku belleğinin düzenlenmesinde önemli görevleri olduğu ileri sürülmektedir (Hamamoto ve ark., 2017).

Sitoplazmik poliadenilasyon elementine bağlanan protein (CPEB), bir mRNA spesifik translasyon kontrol faktörüdür. Spesifik mRNA'larda bulunan 3'UTR sitoplazmik poliadenilasyon element (CPE) bölgesine bağlanarak translasyonu indirekt olarak aktive edici veya inhibe edici yönde kontrol etmektedir. CPEB aracılı translasyonun nöronal sinaptik plastisitede önemli olduğu bildirilmiştir. Sinaptik plastisite için gerekli olan sinaptik protein sentezini düzenleyen birden fazla mekanizma bulunmakla birlikte CPEB'in post sinaptik elektron yoğun bölgede konumlandığının gösterilmesi sitoplazmik poliadenilasyonun bu mekanizmalardan biri olduğuna işaret etmektedir (Richter, 2007; Kundel ve ark., 2009; Darnell ve Richter, 2012; Lee ve ark., 2016). Neuroguidin (Ngdn) ökaryotik translasyon başlatıcı faktöre (eIF4E) bağlanan neuronal bir proteindir ve CPEB proteiniyle etkileşim göstererek translasyonun başlangıç aşamasında baskılanmasında önemli rol oynamaktadır (Richter, 2007). Ngdn nöronlarda dentrit ve aksonlarda bulunmaktadır. Ayrıca büyüme konisi ve filapodlarda da tespit edilmiştir. Ngdn'nin CPE içeren mRNA ların translasyonunu düzenleyerek nöral tüb kapanması ve nöral krista hücrelerinin göçü gibi nöral gelişim süreçlerinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda Ngdn'nin hipokampal sinapslarda meydana gelen USP'yi inhibe ettiği ve dentat gyrus'da meydana gelen USP tarafından indüklenen protein sentezini kontrol ettiği bulunmuştur (Jung ve ark., 2006; Udagawa ve ark., 2012).

Beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) nörotrofik faktör ailesinin bir üyesi olup nöronal sağkalım, nörit gelişimi ve sinaptik plastisite gibi süreçlerde rol oynamaktadır. BDNF hipokampus, korteks ve bazal önbeyin gibi hafıza ve öğrenme ile ilgili beyin bölgelerinde oldukça aktiftir ve uzun süreli hafızanın oluşumunda kritik öneme sahiptir (Yamada ve Nabeshima, 2003; Diniz ve Teixeira, 2011). Nöronlarda, aktiviteye bağlı mRNA sentezi dentritlerdeki lokal protein sentezi vasıtasıyla sinaptik plastisitenin oluşumuna katılmaktadır ve ekstrasellüler uyaranlara karşı doğru bir cevap oluşturmak için önemlidir. Kısa 3'UTR'ye sahip BDNF mRNA translasyonu dentritlerde lokal translasyon kontrol ile düzenlenmektedir. Ayrıca, hipokampal nöronlarla yapılan çalışmalarda, BDNF mRNA'sının kısa 3'UTR bölgesindeki CPE benzeri dizilerin BDNF mRNA'sının hem sürekli hem de aktiviteye bağımlı translasyonunun kontrolü için CPEB

proteinin bağlandığı bölgeler olarak gerekli olduğu gösterilmiştir (Bekinschtein ve ark., 2008).

Sinaptik bölgedeki özgün proteinler ve reseptörler ile ilgili çalışmalar, nöronal aktivitenin ve nörolojik hastalıkların patogenezi ve yaşlanma gibi süreçlerin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında değerli bilgiler sunmaktadır. Sinaptik bölgelerdeki proteinlerin tanımlanması sinaps fonksiyonu hakkında yeni bilgiler sağlamaktadır. Bu sebeple, sinaptik bölgelerin izole edilerek araştırılması sinapslardaki proteinlerin ifadesindeki değişiklikleri gözlemlemek açısından yararlı bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Sinaptozomların izolasyonu, nörotransmitter salınması ve geri alınması, ikincil haberci sinyal yolları, sinaptik protein etkileşimleri ve kinaz aktivitesi gibi sinaptik membran ve postsinaptik yoğun bölgeler ile ilişkili nörokimyasal araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Villasana ve ark., 2006).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, kolinerjik aktivitenin sinaptik plastisitede rol oynayan sinaptik protein sentezi ile ilişkisini olfaktor bulbus ve hippocampusu içeren organotipik kesit kültürlerinde araştırmayı hedefledik. Bu amaçla, nAChR  $\alpha 7$ 'yi methyllycaconitine (MLA) ile inhibe ederek nAChR  $\alpha 7$ , BDNF, CPEB ve Ngdn proteinlerinin ifadelerindeki değişimleri ve yerleşimlerini Western blot ve immünohistokimyasal yöntemlerle saptamayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. OLFAKTÖR SİSTEM

Duyusal nörobiyolojinin ve sinirbilimin en önemli sorunlarından biri çevresel uyarıların beyinde algı olarak temsil edilmesini sağlayan yolların anlaşılması ve bu yolların davranışları nasıl yönlendirdiğinin anlaşılmasıdır. Bu sürecin ilk basamağı ileri derecede özelleşmiş reseptörleri ile fiziksel uyarıyı saptayabilen primer duyu nöronları ile ilişkilidir. Kokunun algılanması olfaktör epitel içinde bulunan olfaktör duyu nöronlarındaki reseptörlerin aktivasyonu ile başlar. Her bir olfaktör duyu nöronu (ODN) tek bir dendritini epitelin luminal yüzeyine uzatır ve buradaki hareketsiz siller sayesinde havadaki koku moleküllerini yakalar (DeMaria ve Ngai, 2010).

Memeli olfaktör sisteminde, koku molekülleri olfaktör duyu nöronları tarafından ifade edilen ~1000 farklı olfaktör reseptör tarafından tespit edilmektedir. Her bir olfaktör duyu nöronu tek tip olfaktör reseptör ifade eder ve aynı tip olfaktör reseptörü ifade eden olfaktör koku nöronları aksonlarını olfaktör bulbus içerisindeki glomerulus adı verilen küresel yapıların içine yöneltirler. Böylece glomerulus, olfaktör bulbus içinde tek tip olfaktör reseptörden gelen duyu girdiyi temsil eden fonksiyonel bir ünite oluşturur. Glomerulus içerisinde, koku bilgisi ikincil nöronlar olan mitral ve püsküllü (tufted) hücrelerine aktarılır. Bununla birlikte, olfaktör bulbus sadece bir geçiş bölgesi değildir; Mitral/püsküllü (tufted) hücreler büyük ölçüde intrabulbar ve beyin diğer bölgelerinden gelen sentrifugal girdiler ile düzenlenir (Imai, 2014).

#### 2.1.1. Olfaktör epitel ve Olfaktör duyu nöronları

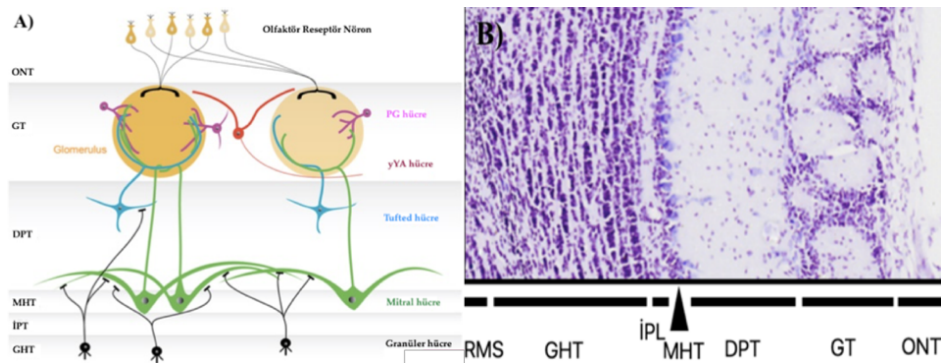
Olfaktör bilginin iletimi, olfaktör epitelde, burun boşluğunun yaklaşık yarısına uzanan nöron ve destekleyici hücre tabakasında meydana gelmektedir. Geri kalan yüzey nöronlardan yoksundur ve esas olarak koruyucu bir yüzey görevi gören solunum epiteli ile kaplıdır. Olfaktör epitel çeşitli hücre tiplerini içermektedir. Bunlardan en önemlisi, bipolar ve bazal yüzeyinde küçük çaplı miyelinsiz bir aksona sahip olan ve koku bilgilerinin iletiminde merkezi rol oynayan olfaktör reseptör nöronudur. Reseptör nöronların apikal yüzeyinde bulunan kalın bir mukus tabakasına uzanan olfaktör silyalar bulunmaktadır.

Nazal boşluğa uzanan olfaktör sillerin iyonik ortamını kontrol eden mukus, epitel altında bulunan salgı bezleri (Bowman bezi) tarafından üretilir. Diğer iki hücre tipi olan,

bazal hücreler ve destekleyici hücreler de olfaktör epitelde bulunmaktadır. Mukus tabakası, nöronal ve destekleyici hücrelerle birlikte epitelin oluşturduğu bu sisteme nazal mukoza adı verilmektedir (Purves, 2001).

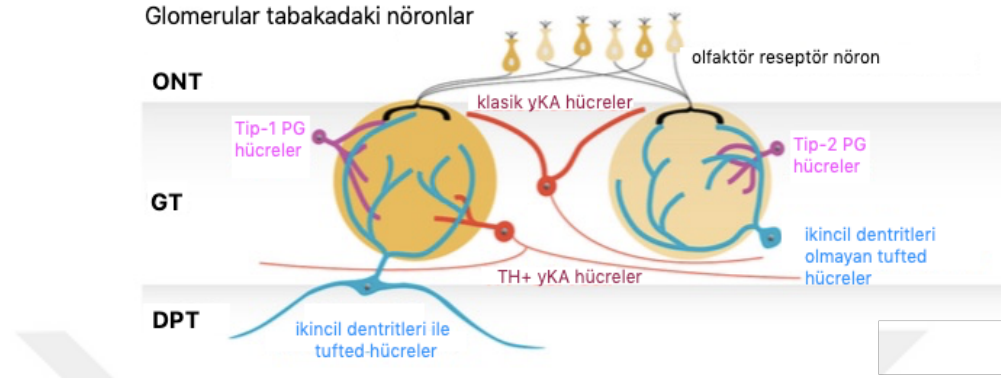
### 2.1.2. Glomerüller içerisindeki sinaptik iletim

Olfaktör duyu nöronları tarafından tespit edilen koku bilgisi ilk önce olfaktör bulbus içerisindeki glomerüllerde işleme alınır (Şekil 2-1). Tek tip olfaktör reseptör içeren olfaktör duyu nöronları aksonlarını tipik olarak olfaktör bulbus içerisinde, biri medial diğeri lateralinde olan iki farklı glomerüle uzatırlar. Her bir glomerül tek bir reseptör ifade eden olfaktör duyu nöronlarından akson girdisi alır. Farede, tipik bir glomerüle ~1000 olfaktör duyu nöronunun aksonu ulaşır. Olfaktör duyu nöronlarının akson terminallerinden postsinaptik nöronlara glutamate salınır. Post sinaptik nöronlar glutamaterjik nöronların iki ana tipi olan mitral hücreler ve püsküllü (tufted) hücreleri içermektedir. Buna ek olarak, jukstaglomerular hücreler olarak adlandırılan periglomerular hücreler ve kısa aksonlu hücreler de olfaktör duyu nöronlarından doğrudan girdi almaktadır. Tipik bir glomerül 20-50 adet mitral/ püsküllü (tufted) hücrenin primer dendritleri tarafından inerve edilir; Bunlardan 5-20 adedi mitral hücrelerdir. Bu nöronların her birinin tek bir apikal dendriti tek bir glomerüle kadar uzanır ve dendritik püskülleri glomerül içerisinde dağılır. Ayrıca, dış pleksiform tabaka (DPT) içerisine 1 mm ye kadar uzunluktaki lateral dendritlerini uzatarak GABAerjik internöronlar ile sinaps yaparlar (Imai, 2014).



**Şekil 2-1:** A) Olfaktör bulbus içerisindeki esas hüresel sistemler görünmektedir (Nagayama, Homma, ve Imamura, 2014). B) Olfaktör bulbus'dan alınan koronal kesit ile hücre katmanlarının gösterimi (Tseng ve ark., 2017).

Glomerüler tabakada bulunan nöronlar morfolojik olarak heterojen bir yapı gösterirler ve 3 farklı tipi tanımlanmıştır: Periglomerular (PG), yüzeysel kısa aksonlu hücreler (yKA) ve dış püsküllü (tufted) (DT) hücreler. Genel olarak morfolojik tipleri belirtilmediği zaman juksttaglomerular hücreler (JG) olarak adlandırılırlar (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Glomerüler tabakada bulunan nöronlar görünmektedir (Nagayama ve ark., 2014).

PG hücreler glomerüler tabakada en çok bulunan nöron tipidir. Bu hücreler 3 farklı morfolojik tip arasında en küçük hücre gövdesine (5–10 µm çapında) sahiptirler. PG hücreleri genellikle dendritlerini tek bir glomerüle uzatırlar ancak bazen birden fazla glomerülde de görünür. PG hücrelerinin dendritleri DT hücrelerine göre daha küçük bir bölgeye dağılır. PG hücrelerinin genellikle akson taşıdıkları düşünülür ama aksonu olmayan alt tipleri de mevcut olabilir. Aksonlarının uzunlukları değişkendir ve 5-6 glomerulus uzağa kadar uzanabilirler (~600 µm). PG hücrelerinin aksonları interglomerular alanda son bulurlar (Nagayama ve ark., 2014). PG hücrelerin fonksiyonel olarak ayrılmanması zor olsada, kalretinin pozitif ve kalbindin pozitif nöronlar olarak sınıflandırılabilirler. PG hücreler olfaktör duyu nöronları, mitral hücreler ve püsküllü (tufted) hücreler tarafından aktive olurlar ve buna karşılık komşu periglomerular hücrelerin yanısıra diğer hücrelere de GABAerjik inhibisyon gönderirler. Bu inhibitör sinapsların çoğu pre- ve post- sinaptik bölgelerde bulunan resiprokal sinapslar olarak bilinirler ve GABA salınımı aksiyon potansiyeli yerine dendritik  $Ca^{2+}$  dükensi artışları tarafından kontrol edilir (Imai, 2014).

yKA hücreler ilk kez Pinching ve Powell tarafından rapor edilmiştir. JG hücreler arasında yKA hücrelerinin yüzdesinin küçük olduğu düşünülmektedir. yKA hücrelerinin gövdeleri PG hücrelerinin gövdelerine göre daha büyüktür (8-12 µm). Bu hücreler

interglomerular alana uzanan dendritlere ve 1-2 glomerül uzağa uzanan aksonlara sahiptir. Bu populasyon içerisinde herhangi bir dendrodendritik bağlantı görünmemiştir.

DT hücreler, JG hücreler arasında en büyük hücre gövdesine (10–15 um) sahip olan hücrelerdir. DT hücrelerinin dendritleri, PG hücrelerine nazaran glomerül içerisinde daha fazla yer kaplamaktadır. Şimdiye kadar DT hücrelerinin morfolojik olarak birbirinden ayrılan 2 alt grubu bildirilmiştir. Birinci grup ikincil dendrit içermemektedir, hücre gövdesi sadece glomerular tabakada bulunur ve aksonları olfaktör bulbus içerisinde sınırlanır. Diğer grup ise DPT'ye uzanan ikincil dendritlere sahiptir ve hücre gövdeleri glomerular tabakanın 1/3 alt bölgesinde ya da glomerular tabaka ile bitişik olan DPT de bulunur. İkinci grubun aksonları aynı bulbusun diğer kısmında bulunan (medial-lateral) iç pleksiform tabakasına (İPT) yada anterior olfaktör nukleus (AON) pars externa'ya (pE) uzanırlar. AONpE sağ ve sol olfaktör bulbusta bulunan aynı koku reseptörünü ifade eden olfaktor duyu nöronlarından girdiyi alan homotipik glomeruliler ile ilişkili devreleri birbirine bağlar (Nagayama ve ark., 2014).

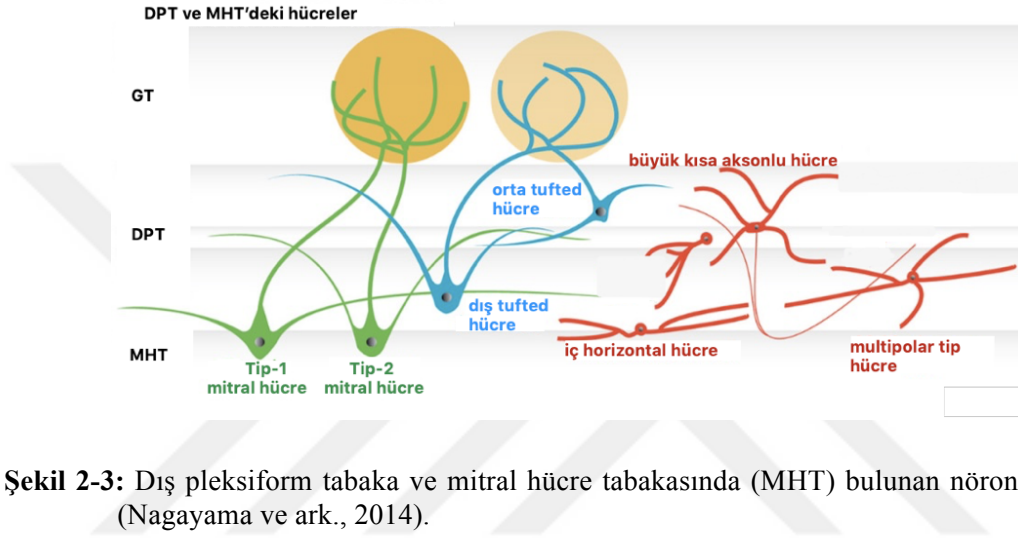
### **2.1.3. Mitral hücreler ve püsküllü (tufted) hücreler**

Ortak bir glomerül ile ilişkili olan mitral/ püsküllü (tufted) hücreler kardeş hücreler olarak adlandırılır. Kardeş Mitral/ püsküllü (tufted) hücrelerin primer dendritleri gap junctionlar ile elektriksel olarak eşleşmiştir. Böylece senkronize bir şekilde dikensi potansiyel oluşturması sağlanır. Bununla birlikte, kardeş mitral/ püsküllü (tufted) hücreler koku kodlamasında aynı değildirler. Koku uyarısına cevapları kardeş mitral hücreler arasında değişiklik gösterir. Bunun nedeni, kardeş mitral/ püsküllü (tufted) hücrelerin inhibitor granüler hücreler tarafından farklı bir şekilde module edilmesi olabilir.

Mitral/ püsküllü (tufted) hücrelerin her ikisi de primer dendritlerini tek bir glomerüle uzatarak uyarıcı girdiler alıp olfaktör kortekse aksonlarını uzatırlar ancak kokuyu kodlamaları ve bağlantıları farklıdır. Tipik bir püsküllü (tufted) hücresi DPT'de bulunur ve lateral dendritlerini DPT'nin dışına doğru uzatır. Püsküllü (tufted) hücreler, somalarının DPT'de bulunduğu bölgeye göre dış, orta ve iç püsküllü (tufted) hücre olarak alt gruplara ayrılabilir. Püsküllü (tufted) hücreler ayrıca kolesistokininin (CCK) ifade etmelerine göre de ayırt edilebilirler. Buna karşılık, tipik bir mitral hücre mitral hücre tabakasında yer alır ve lateral dendritlerini DPT'nin iç tabakalarına doğru uzatır. Mitral hücreler lateral dendritlerini püsküllü (tufted) hücrelere göre daha fazla uzatmaya



eğilimlidirler ve granüler hücrelerden daha fazla inhibe edici girdi alırlar. Püsküllü (tufted) hücreler düşük koku konsantrasyon eşliğinde aktive olurlar ve mitral hücrelere göre daha kısa cevap gösterirler. Püsküllü (tufted) hücrelere olfaktör duyu nöronlarından direkt girdiler ulaşırken mitral hücrelere gelen uyarıcı girdiler dolaylı yoldan gelmektedir: mitral hücreler çoğunlukla aynı glomerül ile ilişkili püsküllü (tufted) hücrelerin dendritlerinden uyarıcı girdiler alırlar. Böylelikle, mitral hücreler püsküllü (tufted) hücrelere göre daha fazla işlemden geçmiş bilgiye ulaşırlar (Şekil 2-3) (Imai, 2014).



Şekil 2-3: Dış pleksiform tabaka ve mitral hücre tabakasında (MHT) bulunan nöron alt tipleri (Nagayama ve ark., 2014).

### Glomerüler devrenin kurulması

Her bir mitral/ püsküllü (tufted) hücre primer apikal dendritini tek bir glomerüle hedefler. Bu durum olfaktör bulbus içerisinde olfaktör reseptöre özel glomerüler modülün oluşturulması için temel oluşturur. Olfaktör sistemin ayırım gücünün en yüksek seviyede olması için, olfaktör duyu nöronu aksonlarının tek bir glomerüle uzanması ve mitral/ püsküllü (tufted) hücrelerin dendritlerinin de tek bir glomerüle hedeflenmesi oldukça önemlidir. Ancak, mitral/ püsküllü (tufted) hücrelerin dendritik hedeflenme mekanizması henüz yeterince açıklığa kavuşmamıştır.

Mitral/ püsküllü (tufted) hücresi başlangıçta birden fazla primer dendritini birden fazla glomerulusa uzatır ve daha sonra birinci postnatal hafta boyunca tek bir dendrit hariç diğerlerinin tamamen ortadan kalktığı bilinmektedir. Böylelikle primer dendritlerin bağlantı özgülüğü yönlendirilmiş bir rehberlik işlemi yerine budama işlemi ile olur. Bu nedenle, dendritik budanma mekanizmasını anlamak oldukça önemlidir. Ancak bu konu

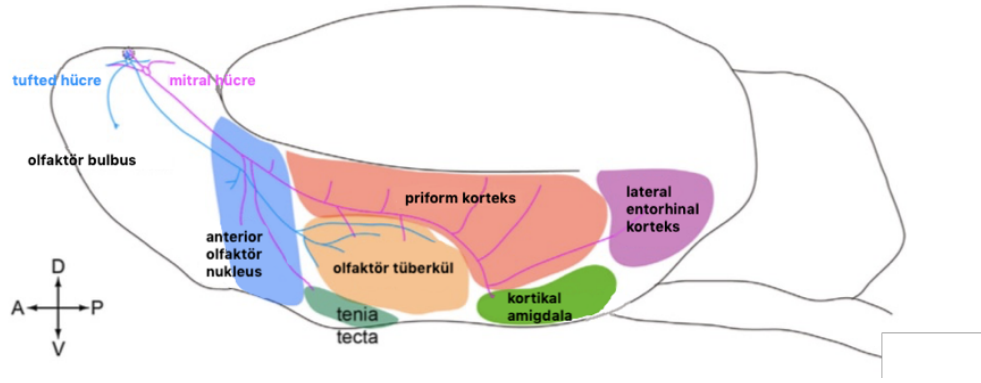
hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Budama işlemi süresince nöronal aktivitenin ne ölçüde rol oynadığı kesin olarak bilinmemektedir. Glomerüllere özgün moleküllerin sentezlenmesi de dahil olmak üzere glomerüler devrenin fonksiyonel olarak olgunlaşması için olfaktör duyu nöronu kaynaklı nöronal aktivite gereklidir (Imai, 2014).

#### **2.1.4. Granüler hücreler**

Granüler hücreler, olfaktör bulbus içerisindeki en büyük internöron popülasyonudur ve fonksiyonel ayrımları henüz iyi bir şekilde yapılmamış olsada, morfolojilerine göre çeşitli alttiplere ayrılabilirler. Periglomerular hücreler gibi granüler hücreler de resiprokal dendrodendritik sinapslar ve mitral/ püsküllü (tufted) hücrelerin inhibisyonunu yöneten dendritik  $Ca^{+2}$  dikensi artışları oluştururlar. Granüler hücrelerde yayılan dikensi potansiyeller ayrıca diğer mitral/ püsküllü (tufted) hücrelerin lateral inhibisyonunu yönetir. Bununla birlikte mitral/ püsküllü (tufted) hücreler ve granüler hücreler arasındaki bağlantı oldukça seyrekdir (Imai, 2014).

#### **2.1.5. Kortikal Uzantılar**

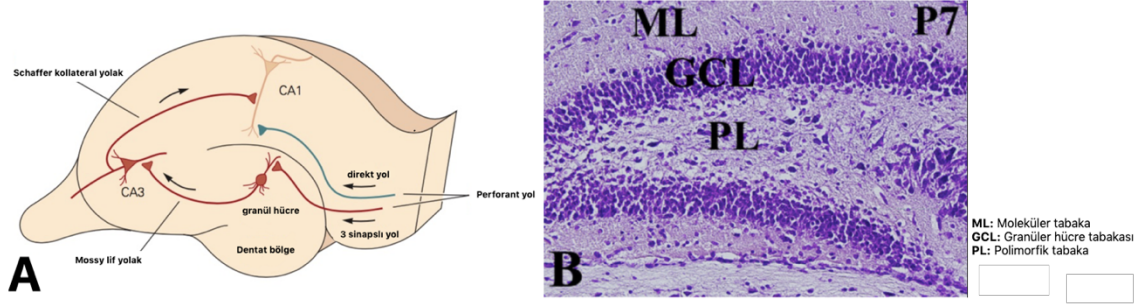
Mitral/ püsküllü (tufted) hücrelerin aksonları demet şeklinde dizilir ve lateral olfaktör yolağı oluştururlar. Bu hücreler; anterior olfaktör nukleus, olfaktör tuberkül, priform korteks, lateral enthorinal korteks, kortikal amigdala gibi olfaktör korteks içerisinde çeşitli bölgelere uzanan birçok kollateral uzatırlar. Mitral/ püsküllü (tufted) hücreler tek bir glomerulus ile ilişki kurduğu zaman, aksonları olfaktör korteksin neredeyse tüm alanını kaplar. Bunun anlamı, olfaktör bulbus içerisinde korunan topografinin, olfaktör korteks içerisinde priform kortekside kapsayan birçok alanda korunmadığıdır. Transsinaptik retrograde izleme ve fonksiyonel haritalama ile priform nöronların birçok glomerulusdan toplanan girdiyi aldığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, priform korteksin 2-foton kalsiyum görüntülenmesi yöntemi ile kokuların herhangi bir topografik dağılımının gösterilmesi mümkün olmamıştır. Priform korteksin koku ilişkili belleğin oluşumuna aracılık edebileceği öne sürülmüştür. Bununla birlikte, olfaktör kortekste bazı alanların da olfaktör bulbusun belirli alanlarından girdi aldığı da belirtilmelidir. Bu alanlar, kokuya karşı doğuştan gelen kalıplaşmış davranışlara yön verebilir (Şekil 2-4) (Imai, 2014).



**Şekil 2-4:** Mitral ve püsküllü (tufted) hücrelerinin kortikal uzantıları görünmektedir (Imai, 2014).

## 2.2. HİPPOKAMPAL SİSTEM

Hippokampal sistem, dentat gyrus, subiculum ve Cornu Ammonis (CA) adı verilen ve hüresel mimari olarak farklı 3 bölgeden oluşmaktadır. CA bölgesi; CA1, CA2 ve CA3 bölgelerine ayrılmaktadır. Hippokampal sisteme ait diğer bölgeler ise presubikulum, parasubikulum ve entorhinal kortekstir. Hippokampusun alt bölgeleri, entorhinal hippocampal döngüyü oluşturan ardışık uyarıcı uzantılar ile birbirine bağlanır. Perforant yol lifleri entorhinal korteksten dentat gyrus girdilerin çoğunu sağlar. Dentat gyrustaki ana hücre tipi olan dentat granül hücreleri geriye yönelik uzanmazlar ve aksonları (yosunsu lifleri) hippocampus içerisinde CA3 bölgesine uzanırlar. CA3 piramidal nöronları CA1 bölgesine Schaffer kollaterali olarak adlandırılan yolak üzerinden girdi oluştururlar fakat dentat gyrusa ile de geri sinaps yaparlar. CA1 nöronları ise subikulum bölgesi içine oldukça fazla uyarıcı girdiler oluşturmakla birlikte, entorhinal kortekse de uzanırlar (Leal ve ark., 2017). Birçok kortikal devrede olduğu gibi, hippocampal nöronlar glutamaterjik hücreler ve GABAerjik internöronlar olarak sınıflandırılırlar. Dentat gyrus glutamaterjik hücre tipine, granül hücrelere ve diğer hippocampal bölgelerden farklı olarak glutamaterjik yosunsu hücrelere de sahiptirler (Şekil 2-5) (Scharfman, 2016).



**Şekil 2-5: A) Hippokampal sistem (Kandel, 2012) ve B) Dentat gyrus histolojik kesiti (Jung ve ark., 2016).**

## 2.3. KOLİNERJİK SİSTEM

### 2.3.1. Asetilkolin ve Asetilkolin Reseptörleri

Asetilkolin ilk kez kalp dokusu üzerindeki etkileri ile Dale tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra, vagus sinirinden salındığı için başlangıçta Vagussto olarak adlandırılmış ve Loewi tarafından bir nörotransmitter olarak tanımlanmıştır. Kolinerjik sentez ve geri alım mekanizmaları nöronlarda oldukça iyi anlaşılmıştır (Maurer ve Williams, 2017). Asetilkolin (ACh), kolinin h ile asetilasyonunu katalize eden kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi ile sentezlenir. ACh, veziküler asetilkolin taşıyıcılar (VAcHT) tarafından sinaptik veziküller içine taşınır ve depolanır. Asetilkolinin sinaptik yarık içerisine salınması aksiyon potansiyeline bağlı  $Ca^{+2}$  girişi ile tetiklenen ekzositoz ile gerçekleşir. Daha sonra post-sinaptik muskarinik (mAChR) ve nikotinik (nAChR) reseptörlerinin her ikisine de bağlanır. ACh, asetilkolinesteraz (AChE) ya da butirikolinesteraz tarafından milisaniyeler içerisinde kolin ve asetik asite hidrolize edilerek geri alım ve yeniden sentezlenmek üzere hazırlanmış olur (Deiana ve ark., 2011).

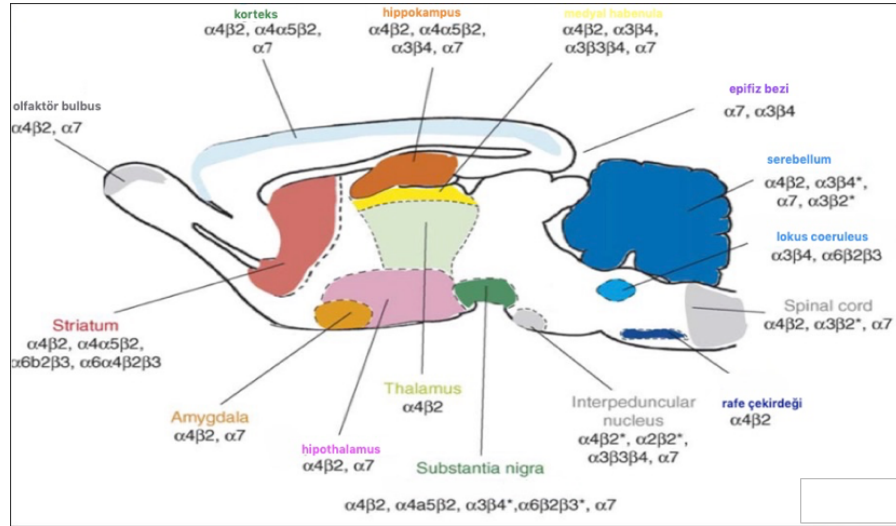
#### 2.3.1.1. Muskarinik Asetilkolin Reseptörü

Şimdiye kadar sıçanlarda mAChR kodlayan 5 adet gen bulunmuştur ve bu genler M1-5 ACh reseptörlerini üretmektedirler. Muskarinik reseptörler metabotropik reseptör ailesinin bir üyesidir ve G protein ilişkili 7 geçişli transmembran reseptörleridir ve ikinci haberciler olarak ya fosfolipaz C (M1, M3, M5) yada adenilsiklaz (M2, M4) ile eşleşirler. Sıçanlarda, M1 reseptörü sempatik ganglia ve ekzokrin bezlerde en çok bulunan reseptördür. Merkezi sinir sisteminde ise M1 reseptörü serebral korteks, hipokampus ve

amigdala bölgelerinde yaygın olarak dağılım göstermektedir. M2 reseptörleri miyokarda bol miktarda, olfaktör bulbus ve hipotalamusta ise az miktarda bulunmaktadır. M3 reseptörleri düz kas ve ekzokrin bezlerde yoğun bir şekilde bulunur aynı zamanda korteks, hipokampus ve thalamusda da yaygın şekilde ifade edilir. M4 reseptörlerinin korteks ve striatumda dağınık bir yerleşim gösterdiği, M5 reseptörlerinin hipokampus, habenula ve thalamusda yer aldığı bildirilmiştir (Deiana ve ark., 2011).

### 2.3.1.2. Nikotinik Asetilkolin Reseptörü/ ligand kapılı iyon kanalı

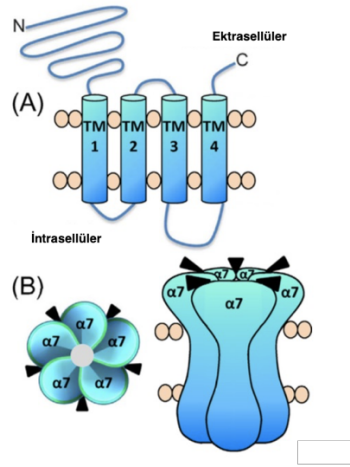
Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) ligand kapılı iyon kanalları süper ailesinin bir üyesi olup asetilkolin ile aktive olurlar. Ayrıca, nikotinik reseptör agonisti olan nikotin de dahil olmak üzere çeşitli ilaçlara cevap verirler. nAChR'lerinin kas dokusunda bulunan 5 adet alt tipi ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma/\epsilon$ ,  $\delta$ ) ve nöronlarda bulunan 12 adet alt tipi ( $\alpha 2-10$ ,  $\beta 2-4$ ) bulunmaktadır (Şekil 2-6) (Yang ve ark., 2017). nAChR'ü altünitelerinin bir merkezi por etrafında simetrik bir şekilde bir araya gelmesiyle oluşan pentamerik bir yapıya sahiptir. Bu altünitelerin aktivasyonu hücrenin  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^+$  geçirgenliğinde hızlı bir artışa, depolarizasyon ve uyarıma neden olur. Nikotine uzun süreli maruz kalma ise reseptörün şekil değişimine ve duyarsız hale gelmesine neden olur (Deiana ve ark., 2011).



**Şekil 2-6:** Nikotinik asetil kolin reseptörlerinin (nAChR) beyindeki dağılımı. Kemirgen beyininde bulunan nikotinik asetilkolin reseptör alttiplerinin bölgesel dağılımı (Gotti ve ark., 2006).

### nAChR $\alpha 7$ 'nin yapısı ve fonksiyonu

Nöronal nAChR alt tipleri arasında bulunan nAChR  $\alpha 7$  1990'larda ilk kez kuşlar ve kemirgenlerden izole edilmiştir. Homomerik pentamer bir yapıya sahip olup merkezi sinir sisteminde ve dalak ve lenf düğümlerinde geniş çapta dağılım göstermektedir. nAChR  $\alpha 7$  de 5 adet özdeş  $\alpha 7$  altünitesi merkezi bir por etrafında simetrik bir şekilde düzenlenmiştir. Her bir altünite büyük bir amino terminal ekstrasellüler bölge, 4 adet transmembran bölge (TM1–TM4) ve sitoplazmik bir bölgeden oluşmaktadır. Homomerik nAChR  $\alpha 7$  reseptörünün ekstrasellüler bölgesinde alt birimlerin arasındaki bölgelerde yer alan beş adet ACh bağlanma yeri bulunmaktadır (Şekil 2-7).

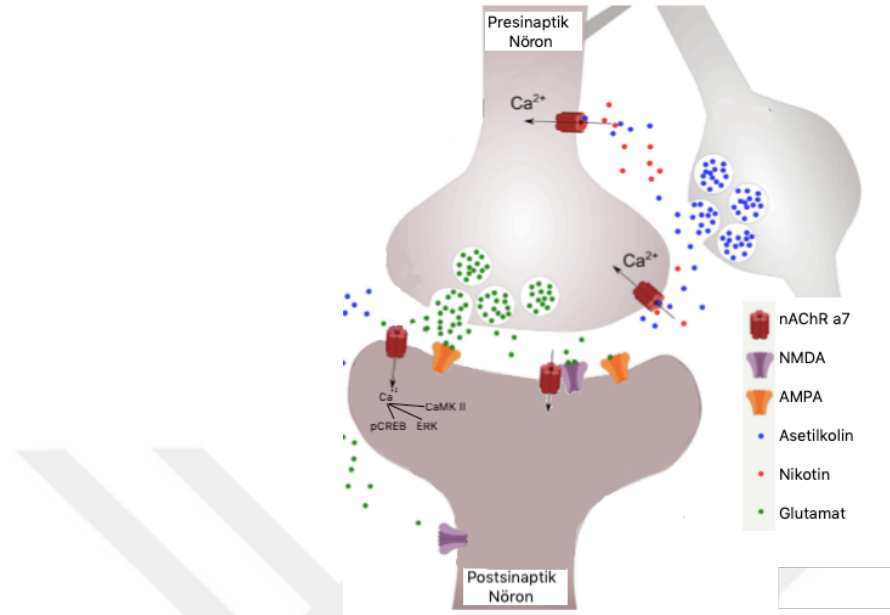


**Şekil 2-7:** nAChR  $\alpha 7$  reseptörünün şematik olarak gösterilmesi a) nAChR  $\alpha 7$  alt biriminin yapısı b) Homomerik pentamer nAChR  $\alpha 7$  reseptörü 5 adet asetilkolin (ACh) bağlanma bölgesi içerir (Quik ve ark., 2015).

Diğer nAChR tipleriyle karşılaştırıldığında, nAChR  $\alpha 7$  benzersiz işlevsel özellikler göstermektedir. Bu özellikler; 1) agonistler tarafından hızlı aktivasyon ve duyarsızlaşma (milisaniyeler içinde), 2) yüksek kalsiyum geçirgenliği ve 3)  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -Btx) ve methyllycaconitine (MLA) tarafından seçici olarak inhibisyonudur (Yang ve ark., 2017).

nAChR  $\alpha 7$  nöronlarda pre- ve post-sinaptik bölgelerde, dendritlerde, pre-terminal akson bölgelerinde, akson terminalinde ve somada yer almaktadır (Koukouli ve Maskos, 2015). nAChR  $\alpha 7$  serebellum, işitsel korteks, hipokampus ve diğer birçok beyin bölgelerinde glutamat salımını kolaylaştırmada önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 2-8). Buna ek olarak, nAChR  $\alpha 7$  reseptörü, astrositler, mikroglia, mikrovasküler endotel

hücreleri ve inflamasyon ve nöron korunmasında rol oynayan lenfositler de dahil olmak üzere beyindeki nöronal olmayan hücrelerde de ifade edilir (Yang ve ark., 2017).



**Şekil 2-8:** nAChR α7'nin pre- ve post-sinaptik nöronda konumlanması (Koukouli ve Maskos, 2015).

## 2.3.2. nAChR Agonist ve Antagonistleri

### 2.3.2.1. Agonistler

Agonistler, ACh bağlanma bölgesine bağlanırlar ve bir dizi şekil değişimi tetikleyerek kanalı dinlenim durumundan açık pozisyona çevirirler (Hurst ve ark., 2013).

### 2.3.2.2. Antagonistler

Antagonistler, ACh bağlanma bölgesinde yada yakınına bağlanırlar ve aynı bölgeye bağlanan agonistler ile sürekli yarış halindedirler. Bu tip antagonistler rekabetçi nAChR antagonistleri olarak bilinirler. Bunun aksine, rekabetçi olmayan antagonistler nAChR de çoğunlukla iyon iletim yolu içerisinde bir yere bağlanarak iyon akışını fiziksel olarak engellerler ve kanalın fonksiyonunu bloke ederler. Bazı durumlarda, agonistler de iyon kanalı içerisinde yer alan ikinci bir bölgeye bağlanırlar ve yüksek konsantrasyonlarda rekabetçi olmayan antagonistler gibi davranabilirler. Günümüzde bilinen nAChR antagonistlerinin çoğu, hem bitkilerde hem de hayvanlarda doğal savunma mekanizmaları olarak bulunan toksinlerdir. Bu doğal ürünlerin çoğunluğu

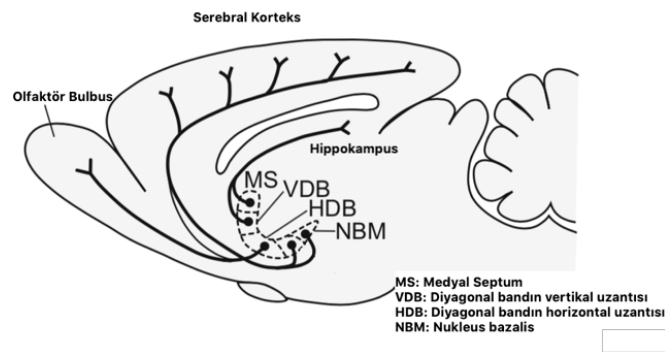
rekabetçi olmayan antagonistler iken, bazı sentetik non-nikotik anestetikler ve psikotropik ilaçlar nAChR'lerini rekabetçi olmayan bir şekilde inhibe edebilirler. Sınırlı sayıdaki doğal rekabetçi antagonistler arasında nAChR alt tiplerinin tanımlanması ve özelliklerinin belirlenmesi için etkili olan birkaç farmakolojik ajan bulunmaktadır. Örneğin,  $\alpha 7$  antagonisti Methylycaconitine,  $\alpha 4\beta 2$  antagonisti  $\beta$ -dihydroerythroidine,  $\alpha 7$  ve  $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$  antagonisti  $\alpha$ -bungarotoxin ve  $\alpha$ -conotoxin ImI, MII, PnIA, BuIA, ArIB, gibi birçok kanotoksin,  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 6\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$  yada  $\alpha 7$  için spesifik küçük peptid antagonistlerdir.

### 2.3.3. Kolinerjik Devreler

Merkezi sinir sisteminde, kolinerjik nöronlar 3 önemli bölgede bulunmaktadır: 1) Beyin sapında bulunan kolinerjik nöronlar riskten kaçınma durumunda fonksiyon gösterebilmektedirler. Bu bölgede bulunan kolinerjik d. 2) Striatumda bulunan kolinerjik internöronlar dopamin salınımını baskırlar. 3) Bazal önbeyin, esas olarak medial septum, diyagonal bandın vertikal uzantısı (MS / VDB), diyagonal bandın horizontal uzantıları (HDB) ve nukleus bazalis'den kaynaklanan kolinerjik nöronlar olfaktör bulbus, neokorteks, hippokampus ve amigdalaya uzantı verirler (Maurer ve Williams, 2017).

#### 2.3.3.1. Asetilkolin ve Olfaktör Bulbus

Olfaktör bulbus, basal ön beyinden Broca alanının diyagonal bandın horizontal uzantıları vasıtasıyla (HDB) oldukça fazla miktarda kolinerjik girdiler alır (Şekil 2-9). Bu girdiler olfaktör bulbusun granüler hücre ve glomerular tabakasını inerve etmektedir.



**Şekil 2-9:** Bazal ön beyindeki kolinerjik nöronlarının beyindeki farklı bölgelere uzantıları görülmektedir (Uchida ve Kagitani, 2018).



Asetilkolin olfaktör bulbusdaki nikotinic ve muskarinic ACh reseptörlerinin her ikisine de etki eder. Nikotinic reseptörler tipik olarak glomerular ve mitral hücre tabasında yer alırken, muskarinic reseptörler granüler hücre tabasında bulunur.

Yapılan in vitro çalışmalarda, nikotinic reseptörlerin aktivasyonunun mitral hücreleri depolarize ettiği gösterilmiştir. Daha önceki in vivo çalışmalarda ise nikotinic reseptörlerin aktivasyonunun periglomerular hücrelerdeki ateşlemeyi de arttıracakını ileri sürülmüştür. Muskarinic reseptörlerin aktivasyonu, direkt depolarizasyon ile granüler hücrelerin yanıt verme oranını artırır. Genel olarak, kolinerjik girdiler hem mitral hücre primer dendritlerinin periglomerular inhibisyonunu hem de mitral hücre ikincil dendritlerinin granüler hücre inhibisyonunu arttırmaktadır (Devore ve Linster, 2012).

### **2.3.3.2. Asetilkolin ve Hippokampus**

Asetilkolin öğrenme ve bellek süreçlerinde rol oynayan en önemli nörotransmitterlerden biridir. Nörogenezin gerçekleştiği iki önemli bölgeden biri olan o (Kaneko ve ark., 2006). Asetilkolin salınması, hippocampusta belleğin oluşumu ve geri çağırılması süreçlerine katıldığı bildirilmiştir. Kolinerjik girdiler hippocampus fonksiyonu üzerindeki etkilerini, dendritlerde, hücre gövdelerinde, piramidal nöronların akson terminallerinde inhibitör internöronlarda ve astrositlerde bulunan muskarinic ve nikotinic reseptörlerin aktive ederek gerçekleştirir (McQuiston, 2014).

## **2.4. SİNAPTİK PLASTİSİTE**

Sinaptik plastisite, kullanıma yada kullanılmamaya cevap olarak sinapsların güçlenme veya zayıflamasını ifade etmektedir. Sinaptik etkinlikteki uzun süreli değişimler çoğunlukla sinapslarda yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olur. MSS yolaklarının çoğunluğu sinaptik plastisite sergilemektedir ve bu olgu esas olarak uyarıcı ve inhibe edici sinapslarda çalışılmış olsa da mekanizmaları farklı olan birçok plastisite şekli bulunmaktadır. Plastisite, presinaptik bölgede nörotransmitter salınmasındaki değişikliklerde ya da postsinaptik bölgede nörotransmitter reseptörlerinin sayısı, tip ya da özelliklerinin değişmesi ve hücre içi sinyalleşme mekanizmalarına bağlı olarak yönetilebilir. Uzun süreli potansiyasyon (USP) sinaptik bilgiyi depolama süreçlerinin etkinliğini yansıtan sinaptik plastistenin temel bir formudur. Öğrenme ve belleğin hücresel korelasyonunu sağlamak üzere esas aday olarak tanımlanmıştır. USP, keşfinden bu yana, çeşitli beyin bölgelerinde ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sinaptik plastisitenin bu

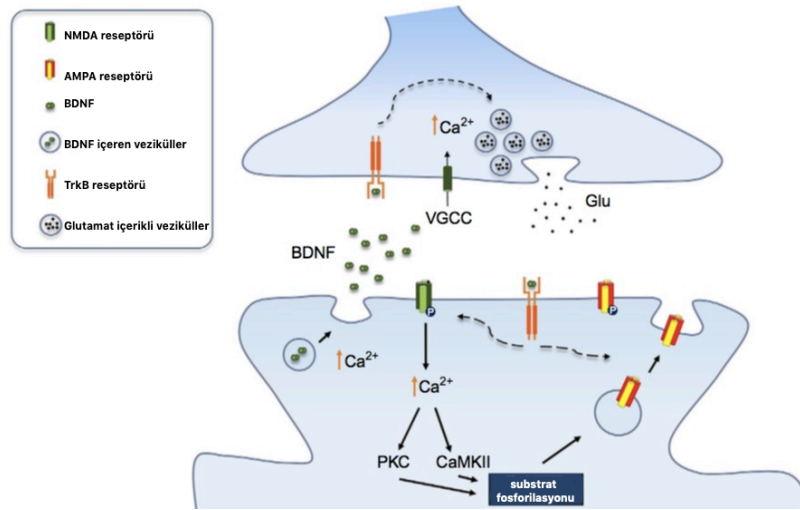
tipinin altında yatan moleküler mekanizmalar özellikle de hippocampusta büyük oranda açığa çıkarılmıştır. Hippokampusun düzenli hücre tabakalarına sahip olması, birçok girdinin bu tabakalara özgü dağılımı ile birlikte değerlendirildiğinde, sinaptik iletim üzerinde yapılacak çalışmalar için iyi bir memeli model sistemi oluşturmaktadır (Leal ve ark., 2017).

#### **2.4.1. Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF)**

Beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) öğrenme ve bellek süreçlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan nörotrofik bir faktördür. Merkezi sinir sisteminde sinaptik uyarıya karşı hızlı cevap ve uzun süreli plastisite oluşumuna katılır. Olgun BDNF sinapsları güçlendirirken, pro-BDNF sinapsları zayıflatır bu da pro-BDNF ve olgun BDNF oranını sinaptik plastisite için önemli yapmaktadır. BDNF ayrıca asetilkolinin sentezinden sorumlu olan kolin asetiltransferaz (ChAT) enziminin aktivitesini artırır ve medyal septumdaki nöronların sağkalmasını teşvik eder. Nörogenez sürecinde önemli rol oynar (Iulita ve ark., 2017).

BDNF hippocampal USP ve öğrenmede önemli rol oynamaktadır. USP'nin indüklenmesi ve sürdürülmesi, nörotransmitter salınmasındaki değişimlerin indüklenmesi, postsinaptik glutamat salınmasını modüle etmesi, sinapslarda protein sentezinin aktive edilmesi ve dentritik dikenlerdeki yapısal plastisitenin düzenlenmesini kontrol ettiği gösterilmiştir (Şekil 2-10) (Leal ve ark., 2017).

BDNF mRNA'sı yalnızca hücre gövdesinde bulunmaz ayrıca dentritlere de taşınır. 3'UTR bölgesinin dendritik lokalizasyondan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, kısa 3'UTR bölgesinde bulunan sitoplazmik poliadenilasyon bölgesinin (CPE) dendritik hedef elementi olarak fonksiyon göstermekte olduğu ve sitoplazmik poliadenilasyon bölgesine bağlanan elementin bu diziye direkt olarak bağlandığı gösterilmiştir. Nöronlarda lokal BDNF ekspresyonu çevresel BDNF ile tetiklenir ve bu da aktiviteye bağlı hızlı cevaba neden olur. Ancak, distal dendritlerde lokal olarak sentezlenen BDNF'nin post-translasyonel taşınımı hakkında oldukça az şey bilinmektedir (Oe ve ark., 2016).



**Şekil 2-10:** Erken USP sırasında uyarıcı sinapsların BDNF aracılı düzenlenmesi (Leal ve ark., 2017).

#### 2.4.2. Sinaptik Plastisitede Translasyonel Kontrol

Sinaptik bağlantıların aktiviteye bağlı olarak değişikliğe uğratılması ve nöronal bağlantı dinamiklerinin değişiminin altında yatan sinaptik plastisitenin uzun süreli bellek depolanması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Hafızanın ilgi çekici bir yönü de, öğrenmenin farklı tiplerinin sinaptik etkinliğin hem güçlendirilmesi (USP) hem de zayıflatılması (USD) ile ilişkili olmasıdır. Nöronal yolda tekrarlanan bir aktivite onun sinaptik bağlantılarının etkinliğini değiştirir. Örneğin, sık tekrarlanan aktivite ile, etkinlikteki artış (yani USP) saatler, günler yada haftalarca sürdürebilir. Bunun tersi de geçerlidir yani azalan aktivite sinaptik etkinliği azaltarak USP ile sonuçlanabilir. Her iki süreçte de yeni protein sentezine ihtiyaç olduğu bilinmektedir. Sinaptik aktivite NMDA veya TrkB reseptörlerini aktive ederek genel veya gene özgü translasyondaki değişikliklere yol açmaktadır. Translasyonun başlangıcını kontrol eden mekanizmalar 2'ye ayrılmaktadır: 1) Translasyon başlatma faktörlerinin (eIF2 $\alpha$  ve 4E-BP'ler gibi) fosforilasyonu yoluyla ribozomun mRNA'nın 5' ucuna toplanmasını düzenleyenler ve 2) mRNA'nın 3' ucunda poli-A'ya bağlanan proteinler (PABP) ile translasyonu kontrol eden ve mRNA'nın kendisini etkileyenler. Bunlara ek olarak, translasyon uzama aşamasında da düzenlenebilmektedir (Buffington ve ark., 2014).

### 2.4.2.1. eIF4E

bo (eIF4E), eIF4F şapka-bağlanan kompleksinin bir parçasıdır. mRNA'nın translasyonunun başlangıç aşamasında ve ayrıca nukleustan sitoplazmaya taşınması dahil olmak üzere gen ekspresyonunun birçok seviyesinde posttranskripsiyonel olarak önemli roller oynamaktadır (Goodfellow ve Roberts, 2008; Osborne ve Borden, 2015). eIF4F şapka bölgesine eIF4E altünitesi aracılığıyla bağlanır ve daha sonra 40S ribozomal altünitenin bağlanabilmesini kolaylaştırmak için mRNA'nın 5'UTR bölgesinin sekonder yapısını çözdüğü düşünülmektedir (Sonenberg, 2008).

### 2.4.2.2. CPEB

Sitoplazmik poliadenilasyon elementine bağlanan protein (CPEB) bir mRNA translasyon kontrol faktörüdür. CPEB germ hücresi gelişimi, hücre bölünmesi, hücre yaşlanması, sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek gibi pek çok biyolojik süreçlere katılır. Sinaptik plastisitenin bazı formları post sinaptik kompartmanda protein sentezini gerektirir. CPEB postsinaptik bölgede sitoplazmik poliadenilasyonu indükleyerek sinaptik protein sentezini düzenleyebileceği düşünülmektedir. CPEB'in nöron fonksiyonundaki önemi CPEB knock out farelerde sinaptik plastisitenin farklı formları olan uzun süreli potansiyasyon (USP) ve uzun süreli depresyonun (USD) bozulması ile gösterilmiştir (Richter, 2007).

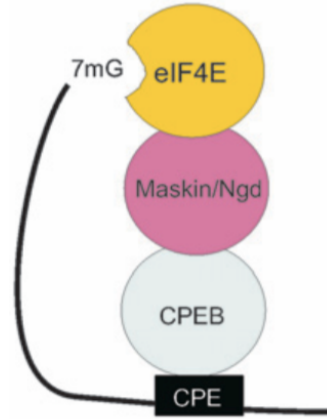
CPEB spesifik mRNA'ların 3' UTR sitoplazmik poliadenilasyon elementine (CPE) bağlanarak polyA kuyruk uzunluğunu ve sonuç olarak translasyonu kontrol eden birkaç ilişkili proteini bölgeye toplar (Şekil 8) (Darnell ve Richter, 2012). CPEB proteinlerinin omurgalılarda CPEB1, CPEB2, CPEB3 ve CPEB4 olmak üzere 4 üyesi bulunmaktadır ve hepsi beyinde ifade edilmektedir. Tüm CPEB proteinleri karboksil uçlarında RNA bağlanma bölgesi ve amino uçlarında ise düzenleyici bir bölge içermektedir. CPEB1'in düzenleyici bölgesi Aurora A tarafından fosforilasyonu takiben poliadenilasyona bağlı translasyonu teşvik eder. CPEB2-4 ilk olarak CPEB1'in RNA bağlama bölgesi ile %45 oranında benzerlik göstermesi ile saptanmıştır ancak bu proteinler CPEB1 ile amino uçlarında herhangi bir homoloji dizisi paylaşmamaktadırlar. CPEB1 ile dizi farklılıklarına rağmen, CPEB2-4 de translasyonu kontrol etmektedir ancak her birinin kullandığı mekanizma birbirinden farklıdır. Örneğin, CPEB1 *maskin/neuroguidine* bağlanarak eIF4E-eIF4G translasyonu başlatıcı kompleksin

biraraya toplanmasını önleyerek RNA translasyonunu önler. Thr171 fosforilasyonunu takiben, CPEB1 poliadenilasyonla indüklenen translasyon başlangıcını teşvik eder yani, RNA'nın uzayan poli-A kuyruğu daha fazla PABP ile bağlanarak, bölgeye eIF4E'ye bağlanmak için maskinle yarışan eIF4G'yi toplar. Buna karşılık, CPEB3 uzama faktörü eEF2'nin GTPaz aktivitesini azaltarak translasyonu baskılamaktadır. NMDA sinyali calpain-2 aracılı CPEB3 kesimini teşvik eder ve bu olay CPEB3 hedefindeki RNA'ların translasyonu ile sonuçlanır (W. H. Huang ve ark., 2014). CPEB3'ün çözülebilen ve küme oluşturan olmak üzere iki farklı şekli bulunmaktadır. CPEB3'ün kümeleşme oluşturabilmesi ve uzun süreli belleğin sürdürülebilmesi için N-terminal kısmı gereklidir. Nöronal uyarım, CPEB3'ün bir E3 ubiquitin ligaz olan Neurolyzed 1 aracılığı ile ubiquitinlenerek aktivasyonuna yol açar. CPEB3'ün küme oluşturan aktif formu, uzun süreli sinaptik plastisitede görev alan hedef mRNA'ların translasyonunu başlatabilmektedir (Drisaldi ve ark., 2015).

Suskun mRNA'ları aktive etme yeteneğine ek olarak, CPEB proteini, sinaptik plastisiteyi kararlı kılmak üzere onu sinapsa özgü bir belirteç yapan 3 ek özelliğe daha sahiptir. Bunlar; hücre dışı bir sinyal aracılığıyla aktive edilebilmesi, yerleşiminin mekansal olarak kısıtlanabilmesi ve CPEB tarafından hedeflenen bir dizi mRNA'nın, uzun süreli belleğin depolanması sırasında yeni sinaptik bağlantıların oluşması için gerekli süreçlerle ilişkili olmasıdır (Rayman ve Kandel, 2017).

#### **2.4.2.3. Neuroguidin**

Neuroguidin/maskin (Ngdn) CPEB ilişkili proteinlerden biridir ve mRNA şapka bölgesine bağlanan ökaryotik bir translasyon başlatıcı faktör olan eIF4E ile de etkileşir. Ayrıca, Ngdn mikrotübül ilişkili bir protein olduğu gösterilmiştir (Richter, 2007). Ngdn nöronlarda dentrit ve aksonlarda bulunmaktadır ayrıca büyüme konisi ve filapodlarda da tespit edilmiştir. Ayrıca, Ngdn'nin kültüre edilen nöronlarda büyüme konisinde eIF4E ile birlikte bulunduğu gözlenmiştir (Jung ve ark., 2006). Ngdn'nin CPE içeren mRNA ların translasyonunu düzenleyerek nöral tübün kapanması ve nöral krista hücrelerinin göçü gibi nöral gelişim süreçlerinde de kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Şekil 2-11) (Darnell ve Richter, 2012).



**Şekil 2-11:** Neuroguidin hem CPEB hemde eIF4E ile etkileşime girerek translasyonun düzenlenmesini sağlar (Richter ve Klann, 2009).

## 2.5. ORGANOTİPİK KESİT KÜLTÜRÜ

Organotipik kesit kültürleri uzun süreli sağ kalım ve orijinal dokuya ait farklı hücrelerin oluşturduğu doku mimarisinin korunmasını sağlayan koşullarda sinir sisteminin bölümleri üzerindeki çalışmalarda tercih edilen yöntemdir.

Kültürün uzun süreli sağ kalımı, kesitleri bir sıvı yüzeyinde, sürekli olarak rotasyonu ile veya yarı geçirgen bir membran üzerinde kültüre edilmesi ile başarılıdır. Kesitler herhangi bir beyin bölgesinden elde edilebilir. Aralarındaki en önemli fark, silindir-tüp kültürlerinin, tipik olarak bir tek-katman halinde, daha büyük ölçüde düzleşmesi, buna karşılık ara-yüz kültürlerinin daha kalın kalması ve bir dereceye kadar üç boyutlu yapıyı korumasıdır. Her iki kültür tekniği de, morfolojik ve fizyolojik özellikleri bakımından oldukça farklı sinir hücrelerini birarada sağlamaktadır. Bu kültürlerin çoğu, hücrel ve doku organizasyonunun nispeten gelişmiş olduğu doğum sonrası 1 haftalık hayvanlardan hazırlandığından, orijinal hücrel mimari genellikle dikkat çekici bir şekilde muhafaza edilmektedir. Ayrıca, glia ve sinir hücrelerinin birlikte bulunmalarının, nöronların farklılaşmasını kolaylaştıran bir mikro ortam sağladığı düşünülmektedir.

Kesit kültürlerinin hazırlanması için en çok fare ya da sıçandan alınan dokular kullanılmaktadır. Genel olarak, 0-7 günlük sıçanlar yapının korunması ve nöronal sağkalım açısından en iyi sonuçları vermektedir. Omurilik veya thalamus kültürleri için fetal hayvanlardan alınan dokular tercih edilir. Kural olarak, genç hayvanlar ile yapılan

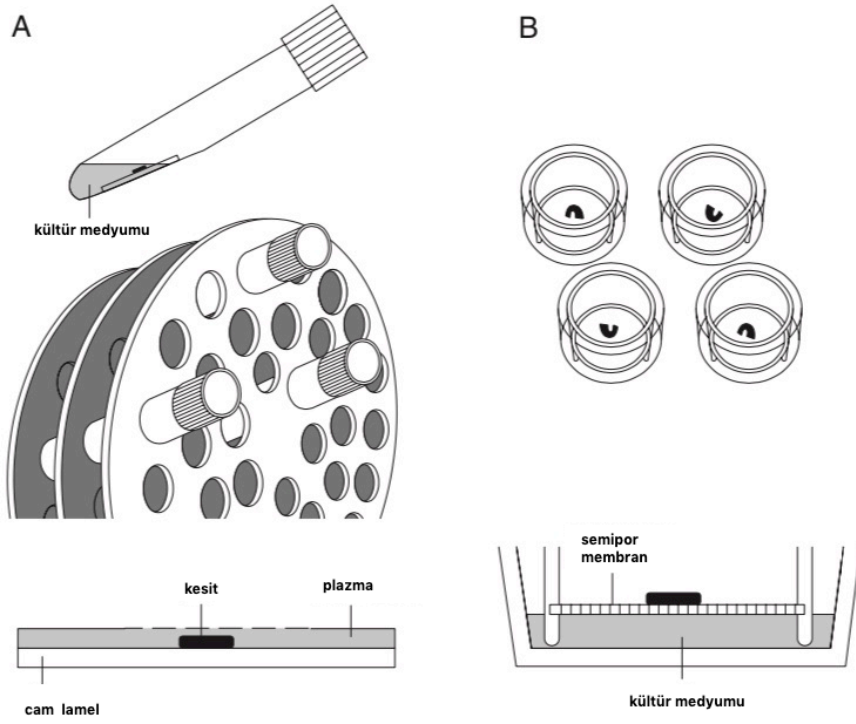
kültürlerde sağkalım daha iyidir fakat doku organizasyonu bazı nöronların hala göç fazında olması dolayısıyla tam olmamaktadır. Genellikle 5-6 günlük hayvanlar bu iki gereksinim açısından idealdir (Gahwiler ve ark., 2001).

Kesit kültürlerinin hazırlanmasının ilk basamakları kesit hazırlanması ile aynıdır. Dokudan vibtatom yada chopper ile 100-400 um arasında değişen kalınlıkta kesitler alınır ve dengelenmiş tuz çözeltisi içerisinde yıkanır. Bir sonraki adım, kesitlerin bir substrata tutunması ile uzun süreli kültüre edilmesini içerir. Bir çok alternatif yöntemler mevcuttur. Benzer kültür medyumları kullanılır fakat kültürün nasıl tutunduğu ve sürdürüldüğüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Şekil 2-12).

***Silindir-tüp kesit tekniğinde***, doku cam lamelle üzerindeki plazma pıhtısına yada kollajen matrikse gömülür ve daha sonra sürekli ve yavaş rotasyonla hareket ettirilir. Böylece kesitlerin oksijenlenmesi güvence altına alınır çünkü yavaş rotasyon hareketi sıvı-hava arayüzünün sürekli olarak değişmesine neden olur.

***Membran kültüründe ise***, kesitler hava-medyum ara yüzünü sağlayan Transwell yada Millicell semipor membranlar üzerine ekilir ve tüm kültür işlemi boyunca burada sabit tutulur. Oksijen üst kısımdan medyum ise alt kısımdan sağlanmış olur.

Tüm bu teknikler, dokunun karakteristik hücresel mimarisini büyük ölçüde koruyan ve mükemmel bir hücresel farklılaşmayı sergileyen kültürler verir. Bu teknikler arasındaki en önemli fark kesitlerin deney sonundaki kalınlıkları ve kültürde yaşadıkları süredir. Dokunun düzleşme derecesi dokunun anatomik kökeni ve elde edildiği hayvanın yaşına bağlı olmakla birlikte silindir-tüp tekniği ile hazırlanan kesit kültürlerinde doku kalınlığı her zaman membran tekniği ile hazırlanan dokuların kalınlığından daha incedir. In vitroda geçen birkaç hafta sonunda, hippocampus kesitleri silindir-tüp tekniği ile yapıldığında 400 um'den yaklaşık 50um'ye inerken, arayüz tekniği ile semipor membrane üzerine ekilen hippocampus kesitleri 100-150um kalınlıklara inmektedir. Her iki teknikle hazırlanan kültürler in vitro koşullarda birkaç hafta ve hatta aylarca sağ kalabilmektedir (Gahwiler ve ark., 1997).



**Şekil 2-12: Organotipik kültürün hazırlanması için kullanılan teknikler.** A) Silindir-tüp kesit tekniği B) Membran kültürü tekniği (Gahwiler ve ark., 1997).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 32 adet Sprague Dawley cinsi 7 günlük sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Deney Hayvanları Üretim Biriminden temin edildi. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen organotipik kesit kültürleri, *Methyllycaconitine* uygulamaları ve protein izolasyonları İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarında, Western Blot deneyleri aynı Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. Konfokal mikroskop görüntüleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsünde alındı.

#### 3.1. ORGANOTİPİK KESİT KÜLTÜRÜ

Hamilelik durumu takip altında tutulan dişi sıçanlardan doğumu takiben 7. günde ayrılan yenidoğan sıçanlar hafif eter anestezisi ile bayıltılıp hızlı bir şekilde dekapitasyon ile kurban edildi ve daha sonra beyinleri çıkartıldı. Organotipik kültür deneyleri bu beyinlerden hazırlandı.

##### 3.1.1. Kültürün Hazırlanması

Organotipik kesit kültürü 35 mm çapında 6 kuyulu petripler kullanılarak yapıldı. Diseksiyondan 1 saat önce, ekim yapılacak olan 6 kuyulu petriplerin her bir kuyusuna kültür medyumunu konuldu (Tablo 3-1). Steril Millicell semiporous membranlar (Millipore PICM0RG50) pens yardımı ile tutularak her bir kuyuya yerleştirilerek hava kabarcıklarının oluşması engellendi. Petripler 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 1 saat inkübe edildi.

**Tablo 3-1:** Kültür medyumunun içeriği

<b>Glukoz-D</b>	6,5 mg/ml final konsantrasyonda
<b>MEM+HEPES GlutaMAX™ Supplement</b>	%50
<b>HBSS</b>	%25
<b>HORSE SERUM New Zealand origin</b>	%25
<b>PENSTREP</b>	100X 500ul
<b>PH</b>	7.2

### 3.1.2. Diseksiyon

Diseksiyon öncesinde diseksiyon medyumunu geniş bir petriye konuldu ve buza yerleştirildi. Diseksiyon aletleri %70 etanol ile temizlendi. Postnatal 7 günlük sıçanlardan tüm beyin diseksiyonu gerçekleştirildi: Eter anestezisini takiben sıçanın kafası geniş bir makas ile tek hamleyle boyun hizasından kesilerek acı hissetmeleri engellendi. Kafa derisinin üzerine steril gazlı bez yardımıyla %70'lik etanol sürüldü. Kafa derisi ince uçlu makas yardımıyla serebellum yönünden başlayarak yanlardan kesilerek kaldırıldı. Kranial kemikler, ince uçlu kemik makası ile yine serebellum yönünden başlayarak yanlardan dikkatlice kesilerek açıldı. Pens yardımı ile beyin kaldırıldı ve diseksiyon başlangıcında buz içine yerleştirilmiş olan diseksiyon medyumuna konuldu (Tablo 3-2).

**Tablo 3-2:** Diseksiyon medyumunun içeriği

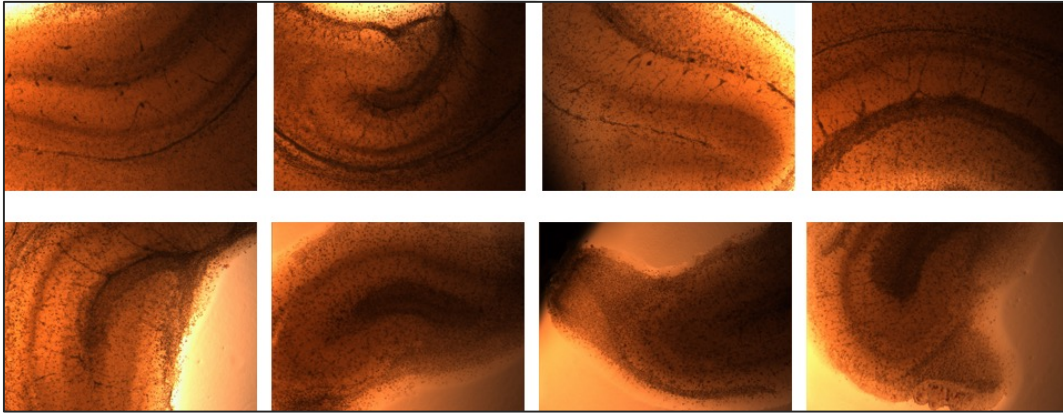
<b>HBSS calcium, magnesium Thermo-24020-117</b>	100ml
<b>D-GLUKOZ (%50 w/v)</b>	%1
<b>PENSTREP (100X)</b>	%1

### 3.1.3. Vibratom ile Kesit Alma

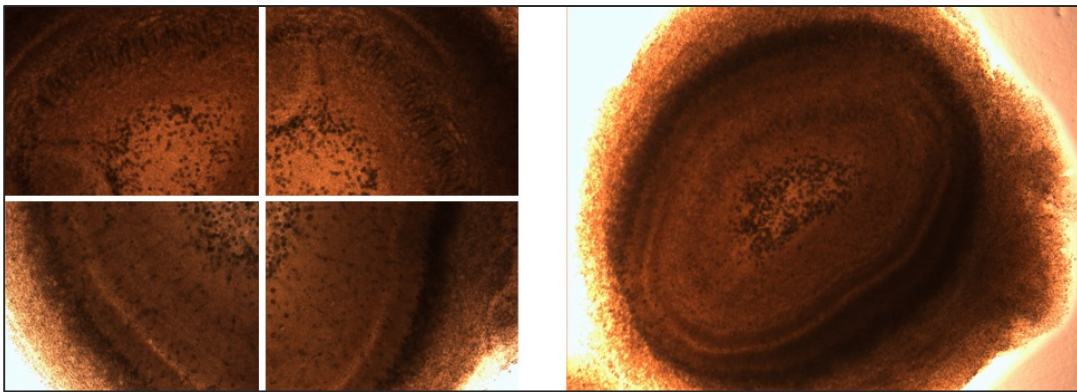
Disekte edilen beyinler, düşük sıcaklıkta eriyen %4 agaroz içerisine gömülerek agarozun donması beklendi. Bu şekilde kesit alma işlemi sırasında doku bütünlüğünün korunması sağlanmış oldu. Agaroz içerisindeki doku mikrotom tablasına yapıştırılarak Leica VT1000S vibrasyonlu mikrotom ile incelenmek istenen bölgeye göre kalınlığı 300 um kesitler alındı. Olfaktör bulbus ve hippokampustan alınan koronal kesitler soğuk diseksiyon medyumunu içerisinde biriktirildi. Daha sonra diseksiyon medyumunu içerisinde bulunan kesitler solusyonun fazlasından arındırılarak kültür medyumunu içeren ve üzerine millipore membranlar yerleştirilmiş petrilere dikkatli bir şekilde nakledildi ve 37 °C'de %5 CO2 içeren etüvde inkübe edildi. 2 günde bir kuyulardaki medyum tazelemeyle değiştirildi (Şekil 3-1, 3-2, 3-3).



**Şekil 3-1: Organotipik kesit kültürünün hazırlanması.** Diseksiyon, vibratomla kesit alma ve kesitlerin kültür medyumunu içeren petriler üzerindeki membrana yerleşimi.



**Şekil 3-2: Kültüre edilen hippocampus kesitlerinin ışık mikroskobu ile gösterilmesi.** Büyütme 4X.



**Şekil 3-3: Kültüre edilen olfaktör bulbus kesitlerinin ışık mikroskobu ile gösterilmesi.** Büyütme 4X.

### 3.2. METHYLLYCACONİTİNE (MLA) UYGULAMASI

Hazırlanan organotipik kesit kültürleri inkübatör içerisinde yaklaşık 7 gün muhafaza edildikten sonra aşağıda belirtilen uygulamalar yapıldı;

1. Kontrol grubu: Herhangi bir uygulanma yapılmayan grup.
2. MLA (SIGMA-M168) grubu:
  - 10 nM MLA uygulanarak nAChR-7'nin inhibe edildiği grup.
  - 20 nM MLA uygulanarak nAChR-7'nin inhibe edildiği grup.

### 3.3. WESTERN BLOT YÖNTEMİ

#### 3.3.1. Total Protein İzolasyonu

Organotipik kesit kültürlerinden stereomikroskop altında olfaktör bulbus ve hippocampus bölgeleri kontrol edilerek her iki bölgeden total protein izolasyonu aşağıdaki gibi yapıldı:

- Diseksiyonu yapılan olfaktör bulbus ve hippocampus kesitleri ayrı tüpler içerisinde toplandı.
- Üzerlerine M-PER (Thermo Scientific 78501, Thermo Fisher Scientific Inc. Illinois, USA), halt proteaz (Thermo Scientific 78429) ve fosfataz inhibitor kokteyli (Roche 4906845001) eklenerek dokular tüpün dibine çöktürüldü.
- Dokular pipetaj yapılarak mekanik olarak homojenize edildi.
- Daha sonra 10 dakika buz üstünde inkübe edildi.
- Tekrar pipetaj yapılarak 30 sn vorteklendi.
- 14000 g'de 10 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edildi ve üst sıvı toplandı.
- Elde edilen örnekler -80 C de muhafaza edildi.

#### 3.3.2. Sinaptik Protein İzolasyonu

Organotipik kesit kültürlerinden mikroskop altında ayrılmış olan olfaktör bulbus ve hippocampus bölgelerinden ayrı ayrı sinaptozom izolasyonu aşağıdaki gibi yapıldı:

- Kesitlerin alındığı tüpler buz üstünde bekletildi.
- Kullanmadan hemen önce Syn-PER (Thermo Scientific 87793, Thermo Fisher Scientific Inc. Illinois, USA) solusyonu içerisine fosfataz inhibitor kokteyli ve halt proteaz eklendi.
- Olfaktör bulbus ve hippocampuslar 6'şar kesit olarak biraraya getirildi.

- Üzerlerine Syn-PER (Thermo Scientific 87793, Thermo Fisher Scientific Inc. Illinois, USA), halt proteaz (Thermo Scientific 78429) ve fosfotaz inhibitör kokteyli (Roche 4906845001) eklenerek dokular tüpün dibine çöktürüldü.
- Dokular pipetaj yapılarak ve vortekslenerek mekanik olarak homojenize edildi.
- 1200 g 10 dk boyunca 4°C’de santrifüj edildi.
- Üst sıvı yeni bir tüpe transfer edildi ve 15000 g de 20 dk 4°C’de tekrar santrifüj edildi.
- Üst sıvı sinaptozom pelletten ayrıldı.
- Sinaptozom pellet üzerine Syn-PER solusyonu eklendi
- Elde edilen örnekler -80 C de muhafaza edildi.

### 3.3.3. Protein Miktarlarının Tayini

Protein miktarlarının ölçülmesi Qubit 2.0 Fluorometre ile kitte yazılı işlemler takip edilerek gerçekleştirildi.

İlk aşamada Qubit reaksiyon karışımı (Invitrogen, Q33211, Qubit protein reagent, USA) ve protein tamponundan (Invitrogen, Q33211, Qubit protein Buffer, USA) oluşan 1:200 oranındaki çalışma solusyonu hazırlandı. Bu solusyon; her bir örnek için 1ul reaksiyon karışımı ve 199ul tampon içermektedir. Standart eğri oluşturmak üzere 3 adet standartın hazırlanması için 3 adet ependorf tüpünün içerisine bu çalışma solusyonundan 190ul ve 10ul’de standart solusyonu (Invitrogen, Q33211, Qubit protein standart (1,2,3), USA) eklendi. Her bir standart tüp Qubit 2.0 Fluorometre içerisine yerleştirilerek ölçümü yapıldı ve standart grafiği elde edildi. Daha sonra, her bir protein örneği için hazırlanan ependorf tüplerinin içerisine 199ul hazırlanan solusyondan ve 1ul protein örneğinden alınıp, 2-3 saniye vortekslendi. Tüm tüpler 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra Qubit 2.0 Fluorometre (Invitrogen, USA) içerisine yerleştirilip ölçümleri yapıldı. Protein miktarları ug/ul cinsinden hesaplandıktan sonra tüm proteinler ayrı ayrı 40ug’a eşitlenerek her bir örnek eşit konsantrasyona getirildi. Böylelikle protein ifadesi kıyaslanabilir hale getirilmiş oldu.

### 3.3.4. Proteinlerin Jele Yüklenmesi ve Jel Elektroforezi

Miktarları ölçüldükten sonra eşit konsantrasyona getirilen tüm proteinlere, final konsantrasyonu 1X olacak şekilde beta-merkaptetanol ve SDS (sodyum dodesil sülfat) içeren 2X Laemmli çözeltisinden (BIORAD-1610747, USA) eklendi. Örnekler, 5 dakika

100°C'de kaynatıldı ve buz üzerine alındı. Western blot standardı (BIORAD-1610376, USA) ve örnekler Mini-PROTEAN TGX any kD (BIORAD-4569034, USA) jelle yüklenerek Mini-PROTEAN Tetra Cell ve PowerPac Universal power supply (BIORAD, USA) elektroforez sistemleri ile 70 voltta 15 dakika, 100 voltta 1 saat yürütüldü.

### 3.3.5. Proteinlerin Nitrosellüöz Membrana Aktarılması

Jeldeki proteinlerin nitrosellüöz membran (BIORAD-1704158, USA) üzerine aktarılması Trans-Blot Turbo Transfer System (BIORAD, USA) cihazı ile gerçekleştirildi.

### 3.3.6. Membranın Antikorlar ile İnkübe Edilmesi

Proteinlerin aktarıldığı nitrosellüöz membranlar miktarı saptanmak istenen proteinlere karşı oluşturulmuş antikorlar ile işaretlendi. Bunun için, öncelikle membranlar %5 yağsız süt tozu yada BSA solusyonu içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bloke edildi. Daha sonra, membranlar 3 kez TBST ile yıkandı. Membranlar, bloklama solusyonu ile ayrıca hazırlanan primer antikorlar ile +4°C'de 1 gece inkübe edildi (Tablo 3-3) ve tekrar 3 kez TBST ile yıkandı. HRP (horse raddish peroxidase) konjuge edilmiş ikincil antikorlar ile 2 saat inkübe edildikten sonra membran 3 kez TBST ile yıkanarak kemilüminesan substrat (Clarity Western ECl Substrate, BIORAD-1705060, USA) ilave edilerek 5 dakika inkübe edildi.

**Tablo 3-3:** Western Blot deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

<b>Kullanılan primer ve sekonder antikorlar</b>	
<b>BDNF</b>	28 kDa, 25699-1-AP
<b>nAChR a7</b>	≈56 kDa, ab24644
<b>CPEB3</b>	≈75 kDa, ab10883
<b>Ngdn</b>	36 kDa, 16524-1-AP
<b>ACTB</b>	42 kDa, ab8227
<b>Synaptophysin (SP11)</b>	MA5-14532
<b>Goat anti-Rabbit IgG (H+L) sekonder antikor, HRP</b>	65-6120
<b>Goat anti-Rat IgG (H+L) sekonder antikor, HRP</b>	AP136P

### 3.3.7. Membranın Kemilüminesan Görüntülenmesi

Membranlar MicroCheimi 4.2 MP görüntüleme cihazına (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) yerleştirildikten sonra farklı zaman aralıklarında görüntü alındı ve proteinlere ilişkin bant yoğunlukları ImageJ 1.52a (Wayne Rasband, Ulusal Sağlık Enstitüsü, USA) programı ile hesaplandı.

### 3.4. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

Organotipik kesit kültürlerinden elde edilen olfaktör bulbus ve hipokampus dokuları ile İmmünohistokimyasal boyamalar aşağıdaki gibi yapıldı. Deneyleerde kullanılan primer ve sekonder antikorlar Tablo 3-4'te belirtilmiştir.

- Dokular %3,7'lik paraformaldehit (Sigma 15,812-7. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içerisinde oda sıcaklığında 15 dakika fikse edildi.
- Dokular 3 defa 10'ar dakika 2 ml PBS ile yıkandı.
- Dokular % 0,3 triton X-100 (Sigma X-100. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içeren T-PBS içerisinde hazırlanan %5'lik normal keçi serumunda (Chemicon S26. Millipore Corp. California, USA) oda sıcaklığında 1 saat prfbekletildi.
- Dokular 1:100 oranında primer antikor ile işaretlendi. Primer antikor % 0,3 T-PBS içinde hazırlanan %5'lik keçi serumu ile sulandırıldı, gece boyu +4°C'de bekletildi.
- Dokular 3 kere 10'ar dakika oda sıcaklığındaki PBS ile yıkandı.
- Bu aşamadan sonraki tüm işlemler karanlıkta gerçekleşti. Dokular %5 keçi serumu % 0,3 T-PBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılan Alexa Fluor sekonder antikorunu ile 1,5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Dokular 3 kere 10'ar dakika oda sıcaklığındaki PBS ile yıkandı.
- Dokular % 0,3 triton X-100 içeren T-PBS içerisinde hazırlanan %5'lik normal keçi serumunda oda sıcaklığında yarım saat bekletildi.
- Dokular hızlıca 3 kere oda sıcaklığındaki PBS ile yıkandı.

- Dokular 1:100 oranında ikinci primer antikor ile işaretlendi. Primer antikor % 0,3 T-PBS içinde hazırlanan %5'lik keçi serumu ile sulandırıldı 1,5 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Dokular 3 kere 10'ar dakika oda sıcaklığındaki PBS ile yıkandı.
- Dokular %5 keçi serumu % 0,3 T-PBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılan Alexa Fluor sekonder antikorunu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Dokular 1:15.000 oranında dH<sub>2</sub>O ile sulandırılmış DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) solüsyonu içinde 15 saniye bekletildi.
- Dokular 3 kere 10'ar dakika oda sıcaklığındaki PBS ile yıkandı.
- Kapama medyumunu ile kapatıldı.

**Tablo 3-4:** İmmünohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer ve sekonder antikorlar

<b>Kullanılan primer ve sekonder antikorlar</b>	
<b>BDNF</b>	25699-1-AP
<b>nAChR a7</b>	ab24644
<b>CPEB3</b>	ab10883
<b>Ngdn</b>	16524-1-AP
<b>Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488</b>	a-11006
<b>Goat Anti-Rabbit IgG H&amp;L (Alexa Fluor® 568) (500 µg)</b>	a-11034
<b>Goat Anti-Rabbit IgG H&amp;L (Alexa Fluor® 488) (500 µg)</b>	ab150077

### 3.5. GÖRÜNTÜLEME

Görüntüler, Leica TCS SP8 konfokal mikroskobunda LasX yazılımıyla 20x objektif kullanılarak ve Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobunda (Biotek) Gen5 (Biotek) yazılımıyla 4x objektif kullanılarak elde edildi. Her bir doku için görüntüleme alanları montaj, z-yığın (z-stack) ve dekonvolüsyon işlemleri izlenerek birleştirildi.

### 3.6. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Deney verilerinin gruplar arası karşılaştırılması GraphPad Prism 7.0a (GraphPad Software, Inc. San Diego USA) program kullanılarak datanın normal dağılıp



dağılmamasına ve elde edilen standart sapmaların arasındaki farkın anlamlı olup olmamasına göre, önce one-way ANOVA, takibinde çoklu karşılaştırma için Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testleri ile veya önce Kruskal Wallis, sonrasında çoklu karşılaştırma için Dunn's çoklu karşılaştırma testleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi.  $p < 0.05$  istatistiksel açıdan anlamlı fark olarak kabul edildi.



## 4. BULGULAR

Çalışmamızda olfaktör bulbus ve hippocampus organotipik kesit kültürlerine bir nAChR  $\alpha 7$  antagonisti olan MLA uygulanarak nAChR  $\alpha 7$  inhibisyonunun BDNF, nAChR  $\alpha 7$ , CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin ifadesi üzerindeki etkilerini araştırdık. İki farklı konsantrasyonda (10 nM ve 20 nM) MLA uygulanarak 6 saat, 24 saat ve 48 saat sonra söz konusu proteinlerin total ve sinaptik seviyelerindeki değişimleri western blot analizi ile saptadık. Ayrıca, hedef proteinlerin olfaktör bulbus ve hippocampusdaki dağılımlarını immünfloresan yöntemi ile belirledik.

### 4.1. WESTERN BLOT ANALİZİ İLE SAPTANAN PROTEİN EKSPRESYON SONUÇLARI

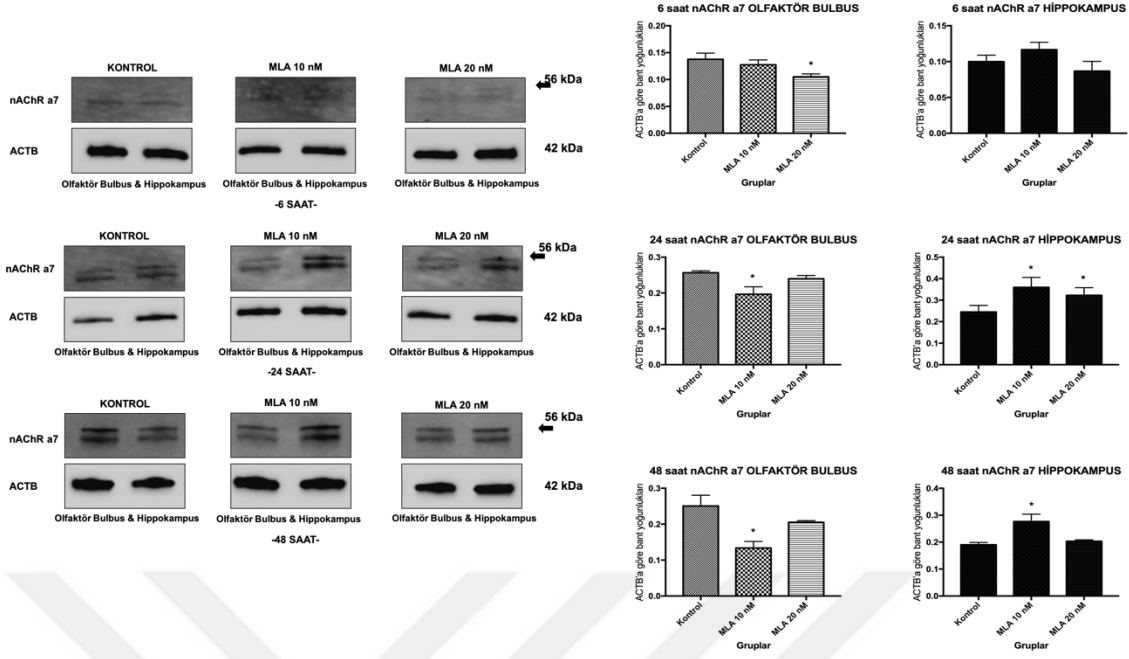
#### 4.1.1. nAChR Seviyeleri

Olfaktör bulbus ve hippocampus kesitlerine 10 nM ve 20 nM MLA'nın 6, 24 ve 48 saat süreyle uygulanması sonucu total ve sinaptik protein izolasyonu yapılarak nAChR  $\alpha 7$  protein ekspresyonundaki değişimler belirlendi.

##### 4.1.1.1. Total nAChR $\alpha 7$ Seviyeleri

Olfaktör bulbusda, nAChR  $\alpha 7$  protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p=0.7446$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.002$ ). nAChR  $\alpha 7$  protein seviyesinde 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0004$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p=0.2349$ ). 48 saatlik uygulama sonrasında ise nAChR  $\alpha 7$  protein seviyesinde kontrol grubuna kıyasla 10 nM MLA uygulanan grupta anlamlı derecede azaldı ( $p<0.0003$ ).

Hippokampusda, nAChR  $\alpha 7$  protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p=0.1344$ ;  $p=0.5430$ ). 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p<0.0001$ ;  $p=0.0015$ ). 48 saatlik uygulama sonrasında ise nAChR  $\alpha 7$  protein seviyesi kontrol grubuna kıyasla 10 nM MLA uygulanan grupta anlamlı derecede arttı ( $p=0.0005$ ) (Şekil 4-1).



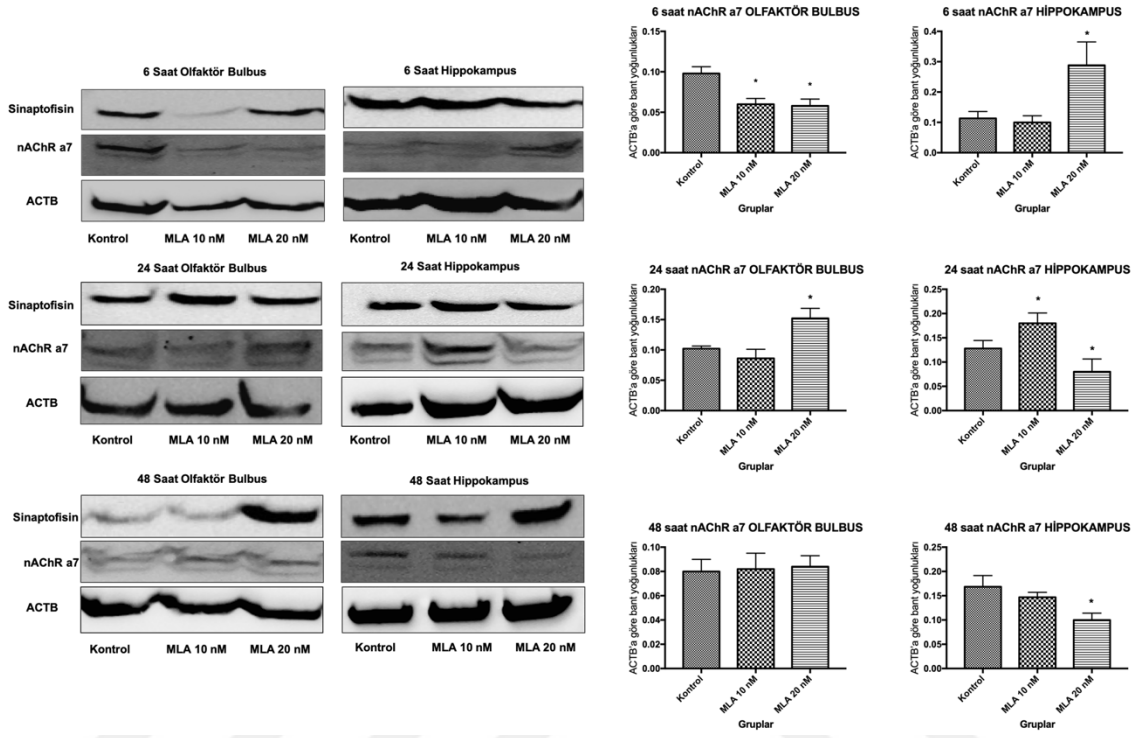
**Şekil 4-1:** MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampustaki nAChR a7 protein seviyesindeki değişimler görülmektedir \*  $p < 0.05$ .

#### 4.1.1.2. Sinaptik nAChR a7 Seviyeleri

Olfaktör bulbusda, sinaptik nAChR a7 protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p < 0.0001$ ). Sinaptik nAChR a7 protein seviyesinde 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p = 0.1750$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p < 0.0002$ ). 48 saatlik uygulama sonrasında ise sinaptik nAChR a7 protein seviyesinde kontrol grubuna kıyasla MLA uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu ( $p > 0.9999$ ).

Hippokampusda, sinaptik nAChR a7 protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık yokken ( $p = 0.8807$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p < 0.0001$ ). Sinaptik nAChR a7 protein seviyesi 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken ( $p = 0.0069$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p = 0.0115$ ). 48 saat uygulama sonrasında ise sinaptik nAChR a7 protein seviyesinde 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre

farklılık yokken ( $p=0.0968$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p<0.0001$ ) (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki sinaptik nAChR α7 protein seviyesindeki değişimler görülmektedir \*  $p<0.05$ .

#### 4.1.2. BDNF Seviyeleri

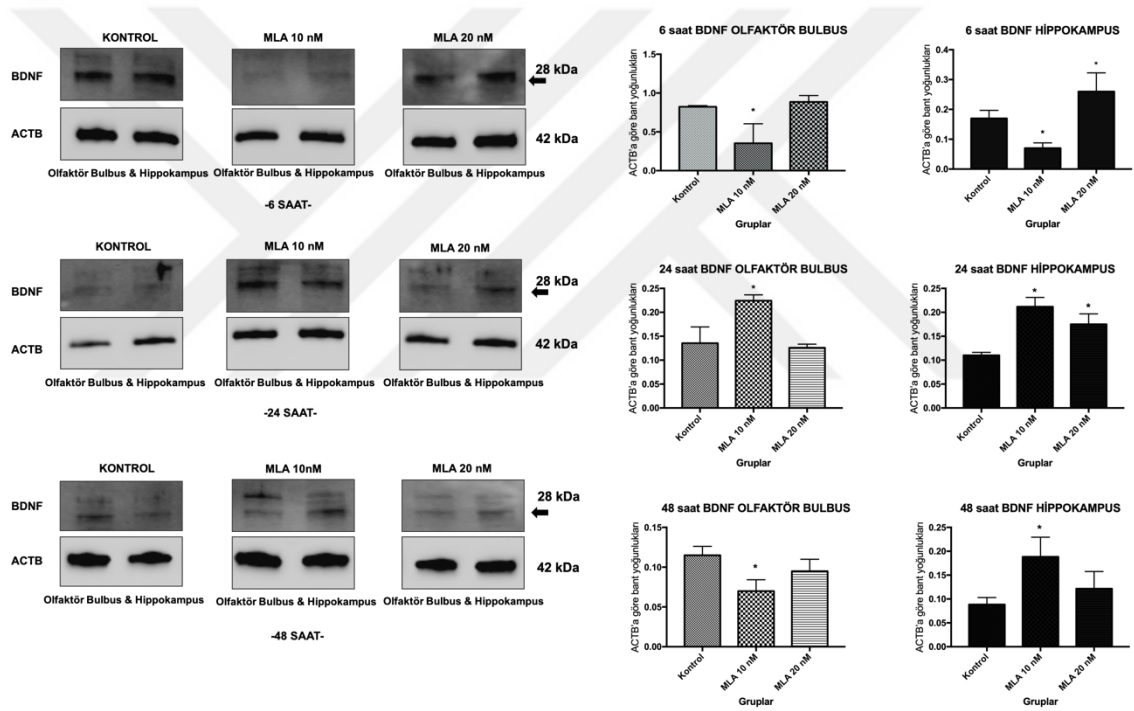
Olfaktör bulbus ve hippocampus kesitlerine 10 nM ve 20 nM MLA'nın 6, 24 ve 48 saat süreyle uygulanması sonucu total ve sinaptik protein izolasyonu yapılarak BDNF protein ekspresyonundaki değişimler belirlendi.

##### 4.1.2.1. Total BDNF Seviyeleri

Olfaktör bulbusda, BDNF protein ifadesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0137$ ) ancak 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p=0.77$ ). BDNF protein seviyesinde 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken ( $p=0.0006$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p>0.05$ ). 48

saatlik uygulama sonrasında ise BDNF protein seviyesinde kontrol grubuna kıyasla 10 nM MLA uygulanan grupta anlamlı derecede azalma görüldü ( $p=0.0005$ ).

Hippokampusda, 6 saatlik 10 nM MLA uygulanan grupta, BDNF protein seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0019$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış saptandı ( $p=0.0024$ ). BDNF protein seviyesi 10 nM ve 20 nM MLA'nın 24 saatlik uygulama sonrasında kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttı ( $p<0.0001$ ). 10 nM MLA'nın 48 saat uygulandığı grupta ise BDNF protein seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı ( $p=0.0002$ ) (Şekil 4-3).



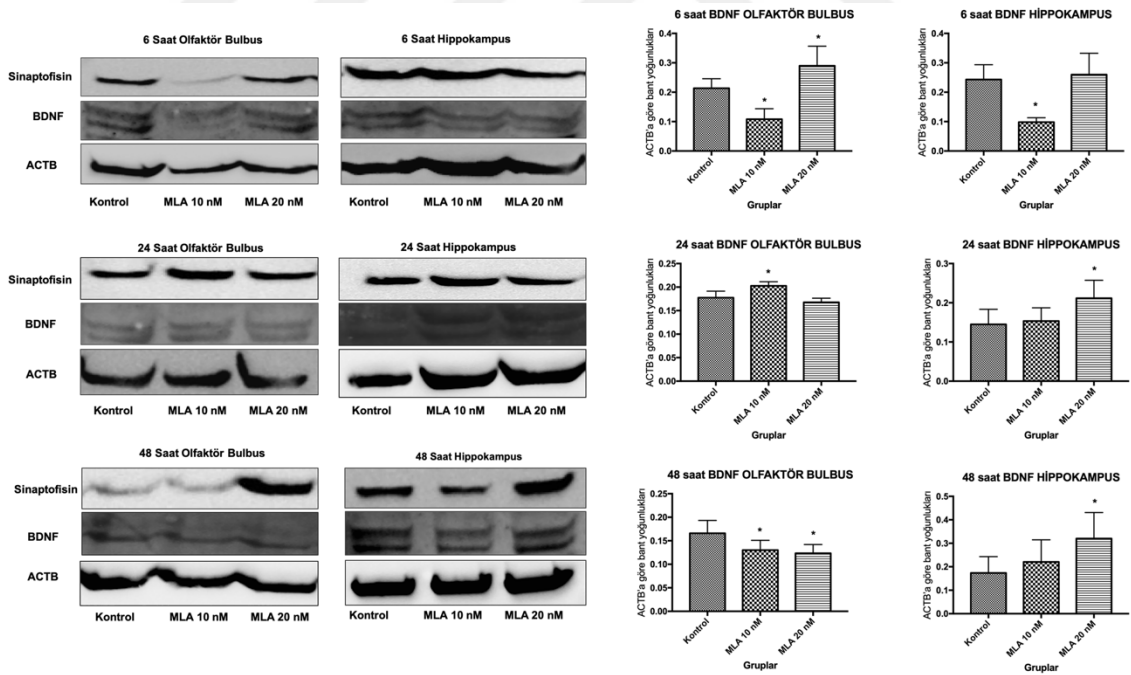
**Şekil 4-3:** MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki BDNF protein seviyesindeki değişimler görülmektedir \*  $p<0.05$ .

#### 4.1.2.2. Sinaptik BDNF seviyeleri

Olfaktör bulbusda, sinaptik BDNF protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı, 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p=0.0044$ ;  $p=0.0342$ ). Sinaptik BDNF protein seviyesinde 10 nM MLA uygulanan grupta 24 saatlik uygulama sonrasında kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p=0.0227$ ), 20 nM

MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p=0.7446$ ). 48 saatlik uygulama sonrasında ise sinaptik BDNF protein seviyesi kontrol grubuna kıyasla 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0366$ ;  $p=0.0134$ ).

Hippokampusda, sinaptik BDNF protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken ( $p=0.0006$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık yoktu ( $p=0.8428$ ). Sinaptik BDNF protein seviyesinde 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim bulunmadı ( $p=0.9299$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış görüldü ( $p=0.0272$ ). 48 saatlik uygulama sonrasında ise sinaptik BDNF protein seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla 20 nM MLA uygulanan grupta anlamlı derecede artış görüldü ( $p=0.0394$ ) (Şekil 4-4).



**Şekil 4-4:** MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki sinaptik BDNF protein seviyesindeki değişimler görülmektedir \*  $p<0.05$ .

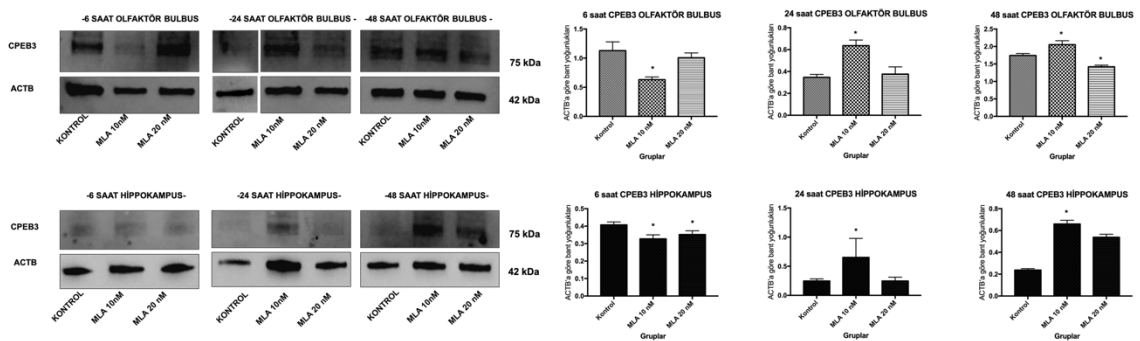
### 4.1.3. CPEB3 Seviyeleri

Olfaktör bulbus ve hippocampus kesitlerine 10 nM ve 20 nM MLA'nın 6, 24 ve 48 saat süreyle uygulanması sonucu total ve sinaptik protein izolasyonu yapılarak CPEB3 protein ekspresyonundaki değişimler belirlendi.

#### 4.1.3.1. Total CPEB3 Seviyeleri

Olfaktör bulbusda, CPEB3 protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0014$ ) ancak 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p=0.8257$ ). 24 saatlik uygulama sonrasında CPEB3 protein seviyesinde kontrol grubuna kıyasla 10 nM MLA uygulanan grupta anlamlı derecede artmıştı ( $p=0.0047$ ). 48 saat uygulama sonrasında ise CPEB3 protein seviyesinde 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p<0.0001$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p<0.0001$ ).

Hippokampusda, CPEB3 protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplar kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0001$ ;  $p=0.0028$ ). CPEB3 protein seviyesi 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta anlamlı derecede artmıştı ( $p=0.0181$ ). 48 saat uygulama sonrasında ise CPEB3 protein seviyesinde 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p=0.0011$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p=0.2273$ ) (Şekil 4-5).

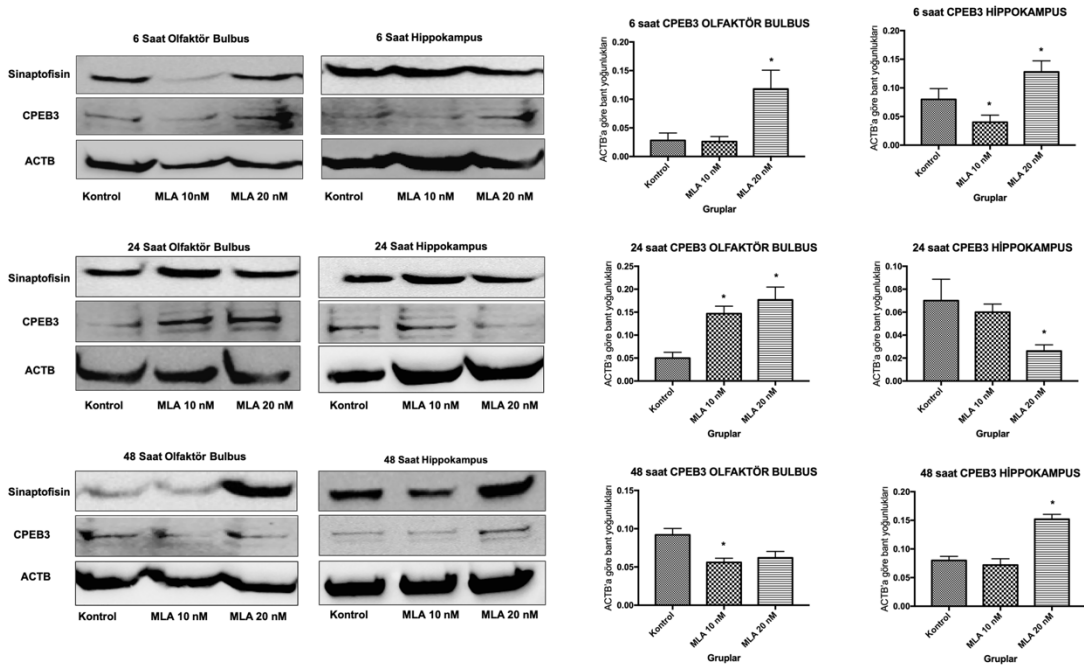


**Şekil 4-5:** MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki CPEB3 protein seviyesindeki değişimler görülmektedir \*  $p<0.05$ .

#### 4.1.3.2. Sinaptik CPEB3 Seviyeleri

Olfaktör bulbusda, sinaptik CPEB3 protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yokken ( $p>0.05$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p=0.0204$ ). Sinaptik CPEB3 protein seviyesinde 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görünmüştü ( $p<0.0001$ ). 48 saat uygulama sonrasında ise sinaptik CPEB3 protein seviyesinde 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0055$ ).

Hippokampusda, sinaptik CPEB3 protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken ( $P=0.0009$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p=0.0002$ ). Sinaptik CPEB3 protein seviyesi 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yokken ( $p>0.05$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0075$ ). 48 saatlik uygulama sonrasında ise sinaptik CPEB3 protein seviyesi kontrol grubuna kıyasla 20 nM MLA uygulanan grupta anlamlı derecede artmıştı ( $p<0.0001$ ) (Şekil 4-6).



**Şekil 4-6:** MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki sinaptik CPEB3 protein seviyesindeki değişimler görülmektedir \* $p<0.05$ .



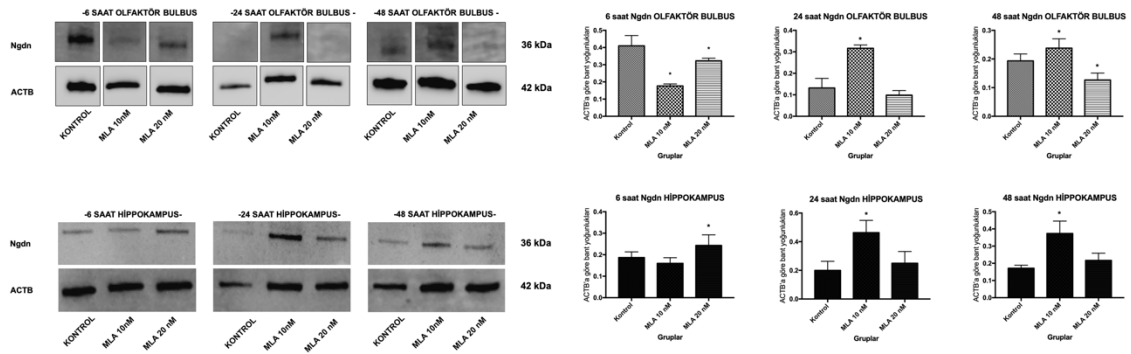
#### 4.1.4. Ngdn Seviyeleri

Olfaktör bulbus ve hippocampus kesitlerine 10 nM ve 20 nM MLA'nın 6, 24 ve 48 saat süreyle uygulanması sonucu total ve sinaptik protein izolasyonu yapılarak Ngdn protein ekspresyonundaki değişimler belirlendi.

##### 4.1.4.1. Total Ngdn Seviyeleri

Olfaktör bulbusda, Ngdn protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p<0.0001$ ). Ngdn protein seviyesinde 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken ( $p<0.0001$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p=0.1661$ ). 48 saat uygulama sonrasında ise Ngdn protein seviyesinde 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p=0.0315$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0020$ ).

Hippokampusda, Ngdn protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişimi yoktu ( $p=0.4191$ ) ancak 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p=0.0372$ ). Ngdn protein seviyesi 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p<0.0001$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p=0.5178$ ). 48 saat uygulama sonrasında ise Ngdn protein seviyesinde 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p<0.0001$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p=0.2847$ ) (Şekil 4-7).

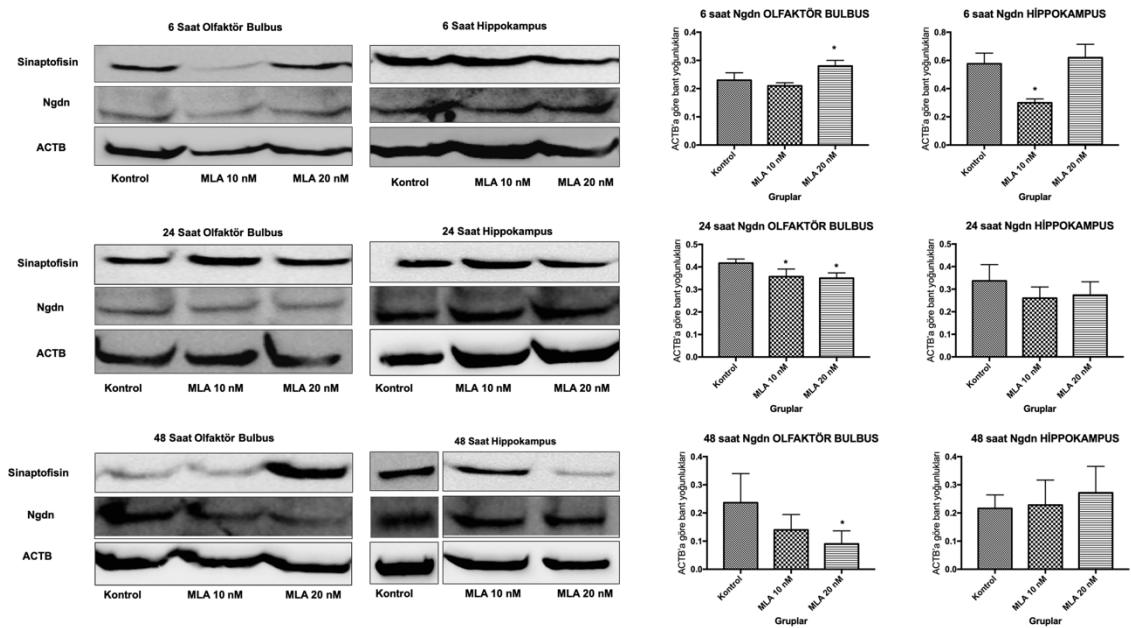


Şekil 4-7: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki Ngdn protein seviyesindeki değişimler görülmektedir \*  $p<0.05$ .

#### 4.1.4.2. Sinaptik Ngdn Seviyeleri

Olfaktör bulbusda, sinaptik Ngdn protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre farklılık yoktu ( $p=0.2261$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı ( $p=0.0016$ ). Sinaptik Ngdn protein seviyesinde 24 saatlik uygulama sonrasında 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0265$ ;  $p=0.0097$ ). 48 saatlik uygulama sonrasında ise sinaptik Ngdn protein seviyesinde kontrol grubuna kıyasla 10 nM MLA uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu ( $p=0.3751$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0065$ ).

Hippokampusda, sinaptik Ngdn protein seviyesi 6 saatlik uygulama sonrasında 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı ( $p=0.0142$ ), 20 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim yoktu ( $p>0.05$ ). Sinaptik Ngdn protein seviyesinde 24 saatlik uygulama sonrasında kontrol grubuna kıyasla MLA uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu ( $p=0.2623$ ). 48 saatlik uygulama sonrasında ise sinaptik Ngdn protein seviyesinde kontrol grubuna kıyasla MLA uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu ( $p>0.05$ ) (Şekil 4-8).

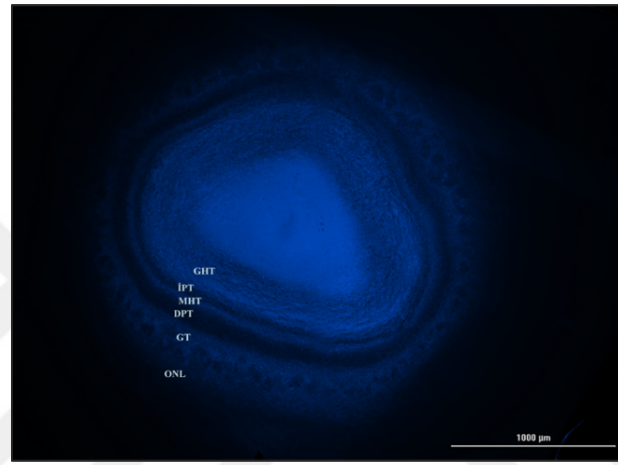


Şekil 4-8: MLA uygulamalarından sonra Olfaktör Bulbus ve Hippokampusdaki sinaptik Ngdn protein seviyesindeki değişimler görülmektedir \*  $p<0.05$ .

## 4.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL SONUÇLAR

### 4.2.1. nAChR $\alpha 7$ ve BDNF'nin Olfaktör Bulbusdaki Dağılımı

Organotipik kesit kültürlerine, 10 nM ve 20 nM MLA'nın 24 ve 48 saatlik uygulanması sonrasında BDNF ve nAChR  $\alpha 7$  proteinlerinin Olfaktör Bulbus'daki lokalizasyonları immünohistokimya (İHK) tekniği ile belirlendi. Olfaktör bulbusun genel morfolojik değerlendirmesi için DAPI ile nükleus boyası boyaması yapıldı (Şekil 4-9).



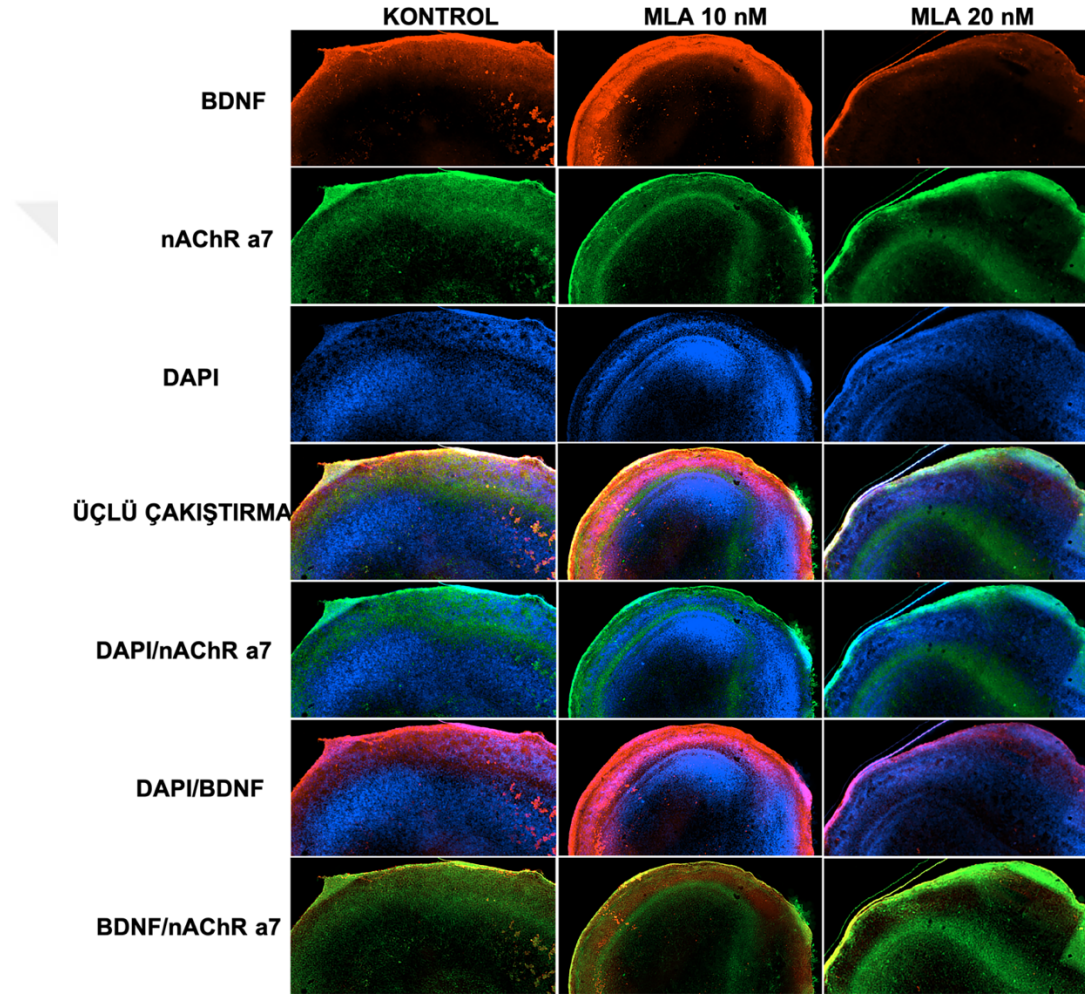
**Şekil 4-9: Olfaktör Bulbus'un organotipik kesitteki genel görünümü.** ONT: Olfaktör Nöron Tabakası. GT: Glomerular Tabaka. DPT: Dış Pleksiform Tabaka. MHT: Mitral Hücre Tabakası. İPT: İç Pleksiform Tabaka. GHT: Granüler Hücre Tabakası. Boyama: DAPI nükleus boyası. Büyütme 4X, Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskop.

24 saat herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda nAChR  $\alpha 7$  için yaygın bir immünopozitif işaretlenme vardı ve bu işaretlenme DPT'de daha şiddetli iken, GHT'de ise noktasal işaretlenme şeklinde görüldü. 10 nM MLA uygulanan grupta, 24 saatlik uygulama sonrasında nAChR  $\alpha 7$  immünopozitifliği ONT, GT, DPT, İPT'de görüldü. Ayrıca, DPT'de nAChR  $\alpha 7$  için kuvvetli immünopozitiflik gözlenirken GHT'de noktasal işaretlenme görüldü. 20 nM MLA uygulanan grupta 24 saatlik uygulama sonrasında nAChR  $\alpha 7$  immünopozitifliği ONT, DPT de görüldü.

24 saat herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda BDNF immünopozitifliği en dış tabakada olan olfaktör nöron tabakasında (ONT) ve glomerular tabakada görüldü. 10 nM MLA uygulanan grupta, 24 saat sonra BDNF immünopozitifliği yine ONT ve GT'de mevcuttu, glomerular tabakada kontrol grubuna göre pozitif işaretlenmenin daha kuvvetli olduğu görüldü. Dış pleksiform tabaka (DPT), mitral hücre

tabakası (MHT), iç pleksiform tabaka (İPT) ve granüler hücre tabakasında (GHT) her iki grupta pozitif işaretlenme görülmedi. 20 nM MLA uygulanan grupta ise BDNF immünpozitifliği ONT'de görüldü.

BDNF ve nAChR  $\alpha 7$ , 24 saat herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda ONT ve GT'de birlikte yerleşim gösterdi. 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan grupta ONT'de kolokalizasyon görüldü (Şekil 4-10).



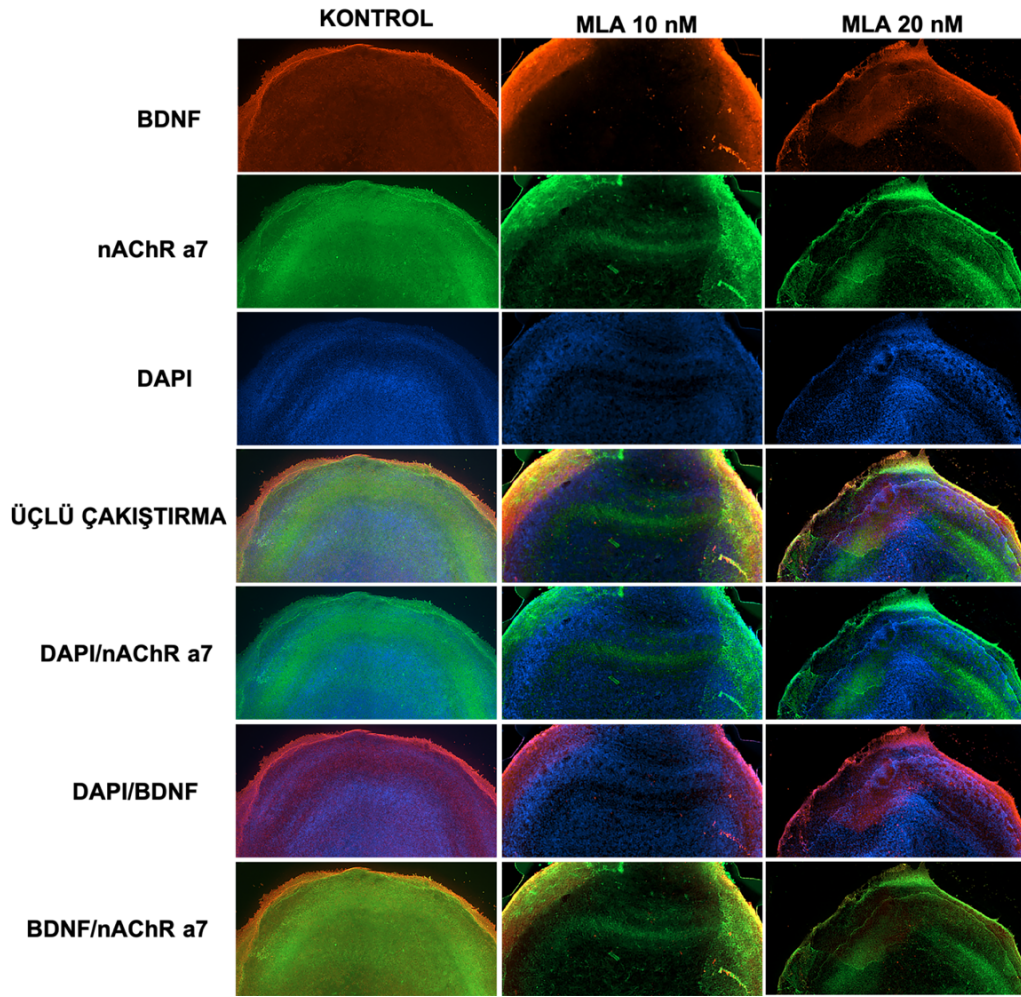
**Şekil 4-10:** 24 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan grupta, uygulamadan 24 saat sonra, BDNF ve nAChR  $\alpha 7$  proteinlerinin olfaktor bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. BDNF (kırmızı; Alexa Fluor® 568); nAChR  $\alpha 7$  (yeşil; Alexa Fluor® 488) nucleus (mavi; DAPI). Büyütme 4X Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskop.

48 saat herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda nAChR  $\alpha 7$  için olfaktor bulbusda yaygın bir işaretlenme görüldü ve bu işaretleme DPT'de kuvvetli pozitif idi. 10nM MLA uygulanan grupta 48 saatlik uygulama sonrasında nAChR  $\alpha 7$

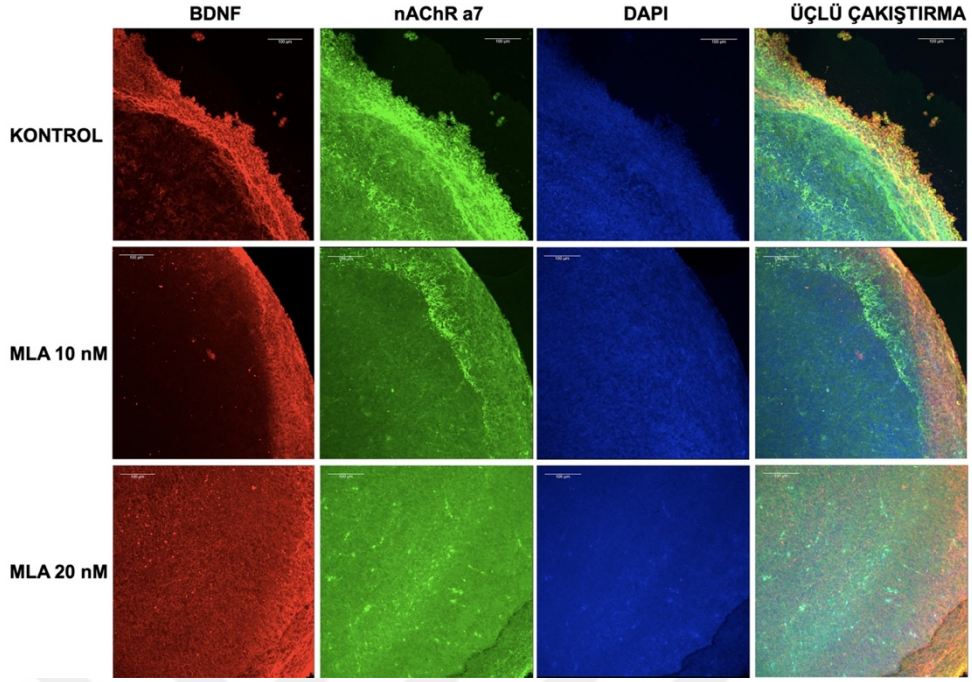
immünpozitifliği ONT, GT, DPT ve İPT’de görüldü. 20 nM MLA uygulanan grupta 48 saatlik uygulama sonrasında ise nAChR  $\alpha 7$  immünişaretlenmesi ONT,GT, DPT ve İPT’de mevcut olmakla birlikte, DPT ve İPT’de daha kuvvetli pozitiflik görüldü.

48 saat herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda BDNF immünpozitifliği olfaktor bulbusun tüm katmanlarında görüldü. 10 nM MLA uygulanan grupta, BDNF immünpozitifliği ONT ve GT’de görüldü. İç kısımlarda (DPT, MHT, IPT, GHT) BDNF işaretleme negatif olarak gözlemlendi. 20 nM MLA uygulanan grupta ise, BDNF immünpozitifliği ONT’de ve GT’de görüldü. İç kısımlara doğru ilerledikçe BDNF işaretleme negatif olarak görüldü.

BDNF ve nAChR  $\alpha 7$ , 48 saat herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda DPT’de birlikte yerleşim gösterdi. 10 nM MLA uygulanan grupta ise ONT’de kolokalizasyon olarak görüldü. 20 nM MLA uygulanan grupta BDNF ve nAChR  $\alpha 7$  kolokalizasyonu ONT ve GT’de görüldü (Şekil 4-11, 4-12).



**Şekil 4-11:** 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, BDNF ve nAChR  $\alpha 7$  proteinlerinin olfaktor bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. BDNF (kırmızı; Alexa Fluor® 568); nAChR  $\alpha 7$  (yeşil; Alexa Fluor® 488) nucleus (mavi; DAPI). Büyütme 4X, Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskop.



**Şekil 4-12:** 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, BDNF ve nAChR  $\alpha 7$  proteinlerinin olfaktor bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. BDNF (kırmızı; Alexa Fluor® 568); nAChR  $\alpha 7$  (yeşil; Alexa Fluor® 488) nucleus (mavi; DAPI). Büyütme 20X, Leica TCS SP8 Konfokal Mikroskop.

#### 4.2.2. CPEB3 ve Ngdn'in Olfaktör Bulbusdaki Dağılımı

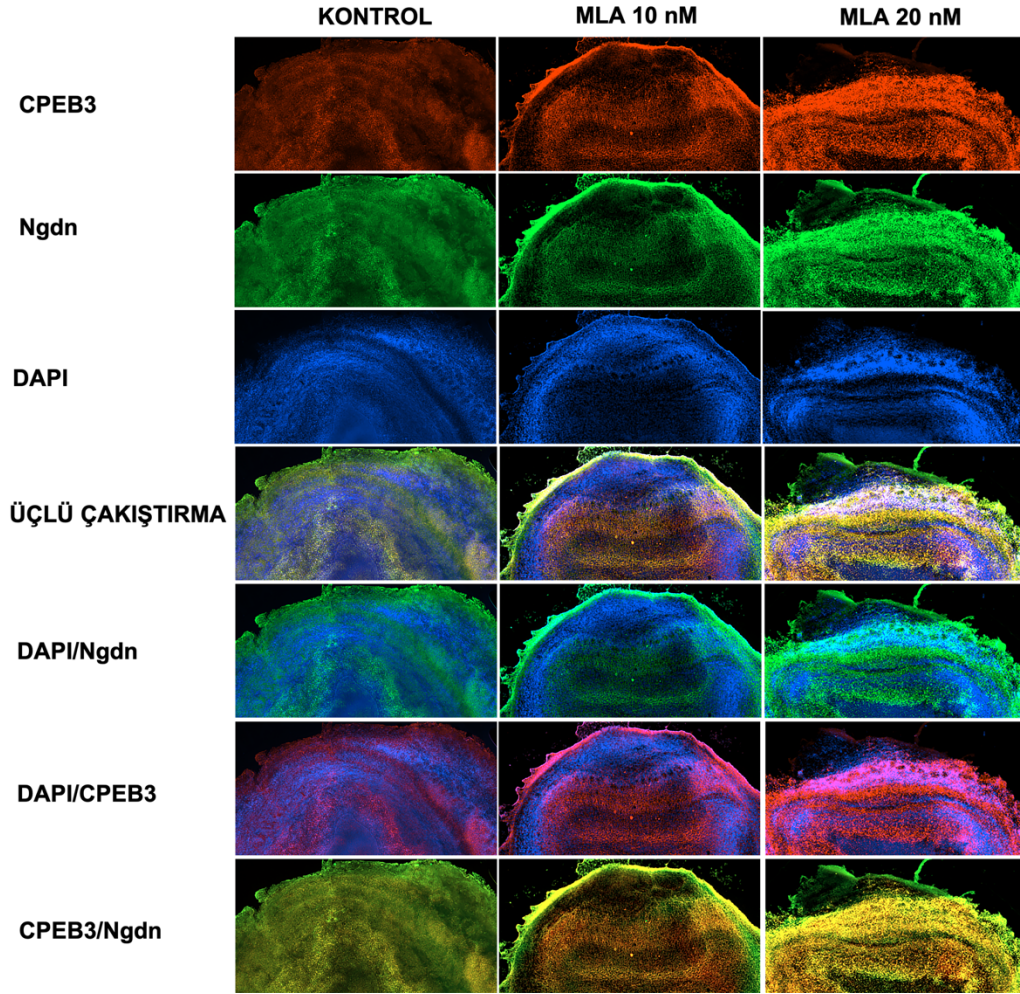
Organotipik kesit kültürlerine, 10nM ve 20nM MLA'nın 24 ve 48 saatlik uygulanması sonrasında CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin Olfaktör Bulbus'daki yerleşimi İHK işaretleme tekniği ile belirlendi.

24 saat herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda CPEB3 immünpozitifliği tüm katmanlarda görüldü. 10 nM MLA uygulanan grupta 24 saatlik uygulama sonrasında CPEB3'ün GT ve MHT hariç diğer katmanlarda bulunduğu görüldü. 20 nM MLA uygulanan grupta ise, CPEB3 için GT'de kuvvetli immün pozitiflik görüldü.

24 saatlik uygulama sonrasında Ngdn immünpozitifliğinde, tüm gruplarda CPEB3 ile benzer bir dağılım görüldü.

CPEB3 ve Ngdn'in, 24 saat herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda tüm katmanlarda birlikte yerleştiği görüldü. 10 nM MLA uygulanan grupta 24 saatlik uygulama sonrasında CPEB3 ve Ngdn, ONT ve GT hariç diğer katmanlarda birlikte

yerleşim gösterdi. 20 nM MLA uygulanan grupta ise CPEB3 ve Ngdn'in birlikte yerleşimi GT, DPT, İPT ve GHT'de görüldü (Şekil 4-13).



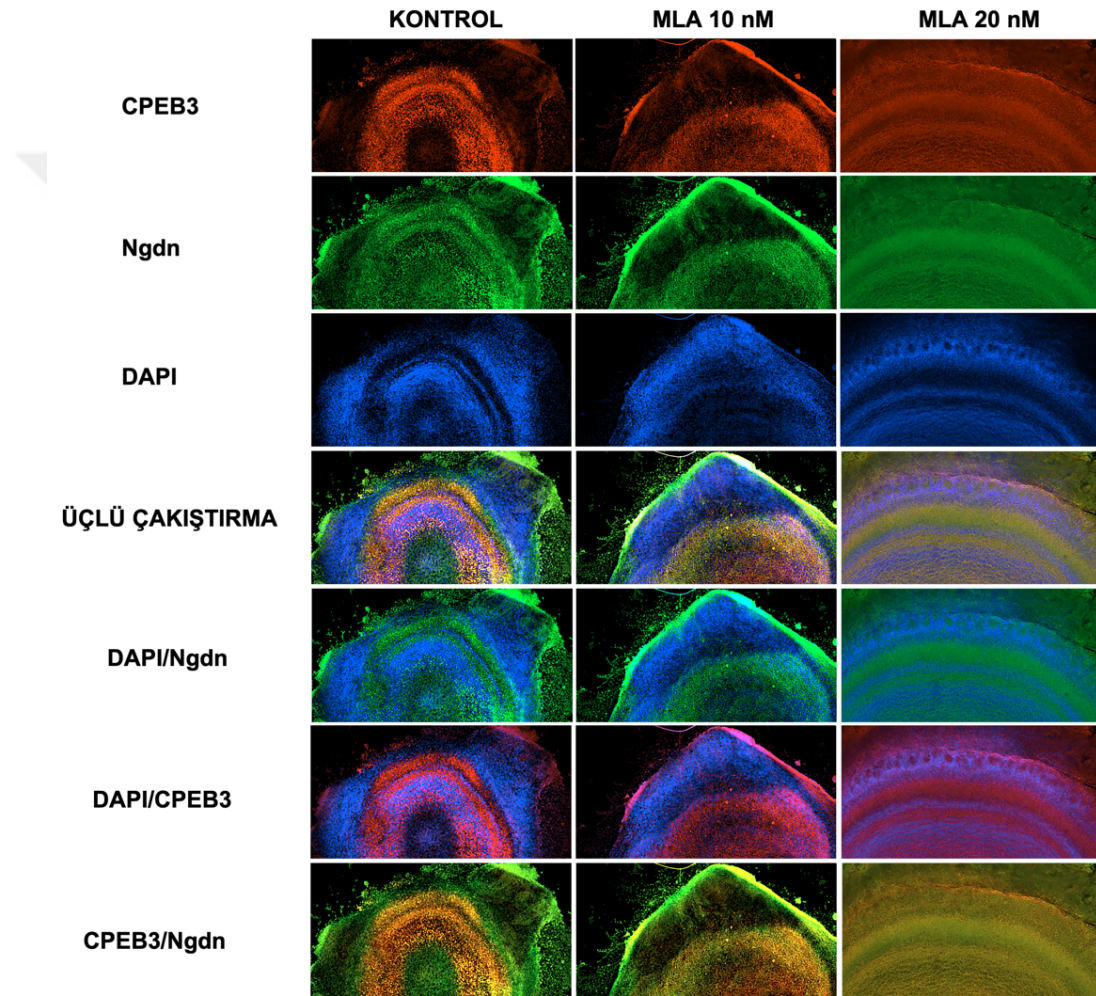
**Şekil 4-13:** 24 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 24 saat sonra, CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin olfaktor bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. CPEB3 (Alexa Fluor® 568); NGDN (Alexa Fluor® 488); nucleus (DAPI). Büyütme 4X, Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskop.

48 saat herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda CPEB3 işaretlenmesi, ONT ve GT'de hafif pozitifken, DPT, İPT ve GHT'de kuvvetli pozitif idi. MHT'de ise işaretlenme yoktu. 10 nM MLA uygulanan grupta 48 saatlik uygulama sonrasında, kontrole benzer şekilde CPEB3, ONT'de ve GT'de hafif immünpozitiflik gösterdi. Daha iç katmanlarda CPEB3 için pozitif işaretlenme görüldü. MHT'de ise işaretlenme yoktu. 20 nM MLA uygulanan grupta 48 saatlik uygulama sonrasında CPEB3 immünpozitifliği MHT hariç tüm katmanlarda görüldü. Ayrıca, GT'da glomerüllerin iç kısmında da pozitif bir işaretleme gözlemlendi.

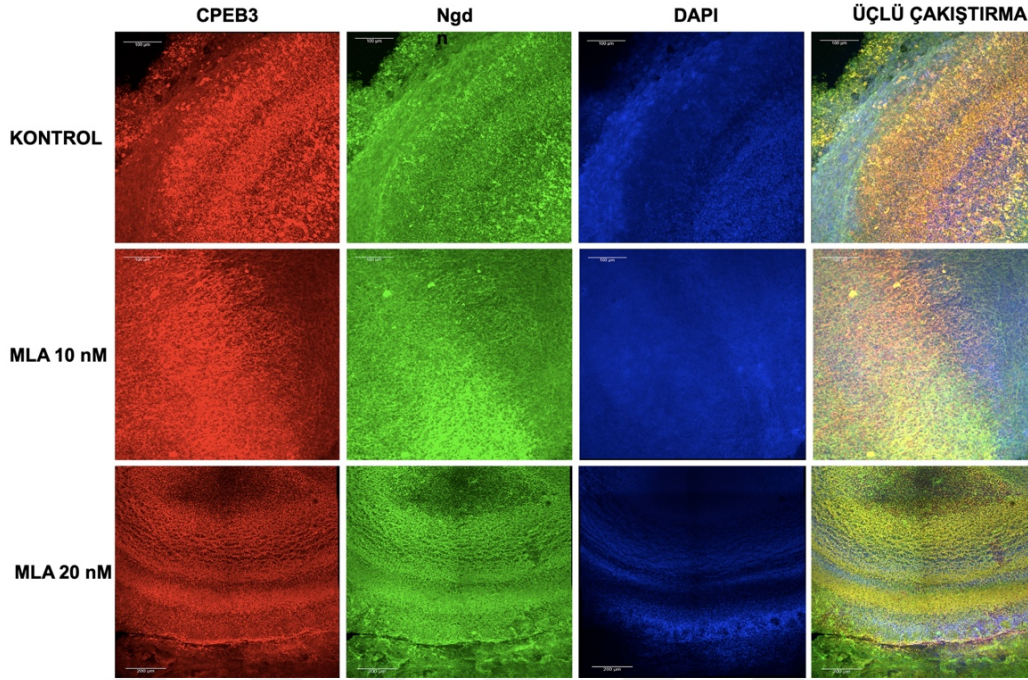


Ngdn herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda DPT ve İPT’de kuvvetli olmakla birlikte tüm katmanlarda immünpozitiflik gösterdi. 10 nM MLA uygulanan grupta Ngdn immünpozitifliği kontrole benzer şekilde görüldü. 20 nM MLA uygulanan grupta MHT hariç tüm katmanlarda görüldü.

CPEB3 ve Ngdn’in, 48 saat herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunda ve MLA uygulanan gruplarda 48 saatlik uygulama sonrasında DPT, İPT ve GHT’de birlikte yerleştiği görüldü (Şekil 4-14, 4-15).



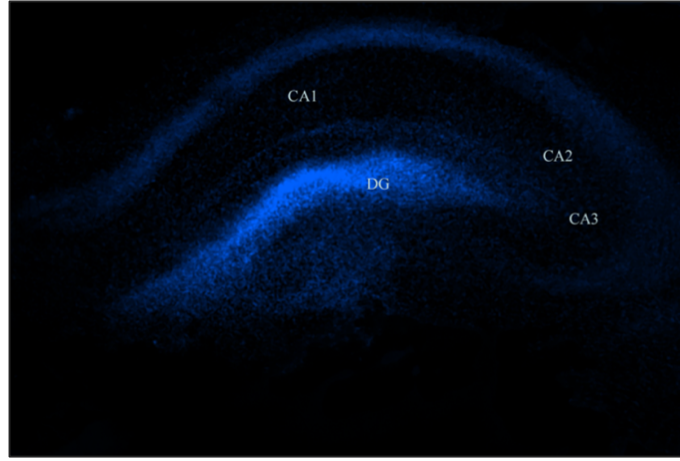
**Şekil 4-14:** 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin olfaktor bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. CPEB3 (Alexa Fluor® 568); Ngdn (Alexa Fluor® 488); nükleus (DAPI). Büyütme 4X, Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskop.



**Şekil 4-15:** 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin olfaktor bulbusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. CPEB3 (Alexa Fluor® 568); Ngdn (Alexa Fluor® 488); nukleus (DAPI). Büyütme 20X, Leica TCS SP8 Konfokal Mikroskop.

#### 4.2.3. nAChR $\alpha 7$ ve BDNF'nin Hippokampusdaki Dağılımı

Organotipik kesit kültürlerine, 10 nM ve 20 nM MLA'nın 48 saatlik uygulanması sonrasında nAChR  $\alpha 7$  ve BDNF proteinlerinin hippocampusdaki dağılımları İHK işaretleme tekniği ile belirlendi. Hippokampusun genel morfolojisini göstermek üzere nukleus boyası olan DAPI ile işaretleme yapıldı (Şekil 4-16).

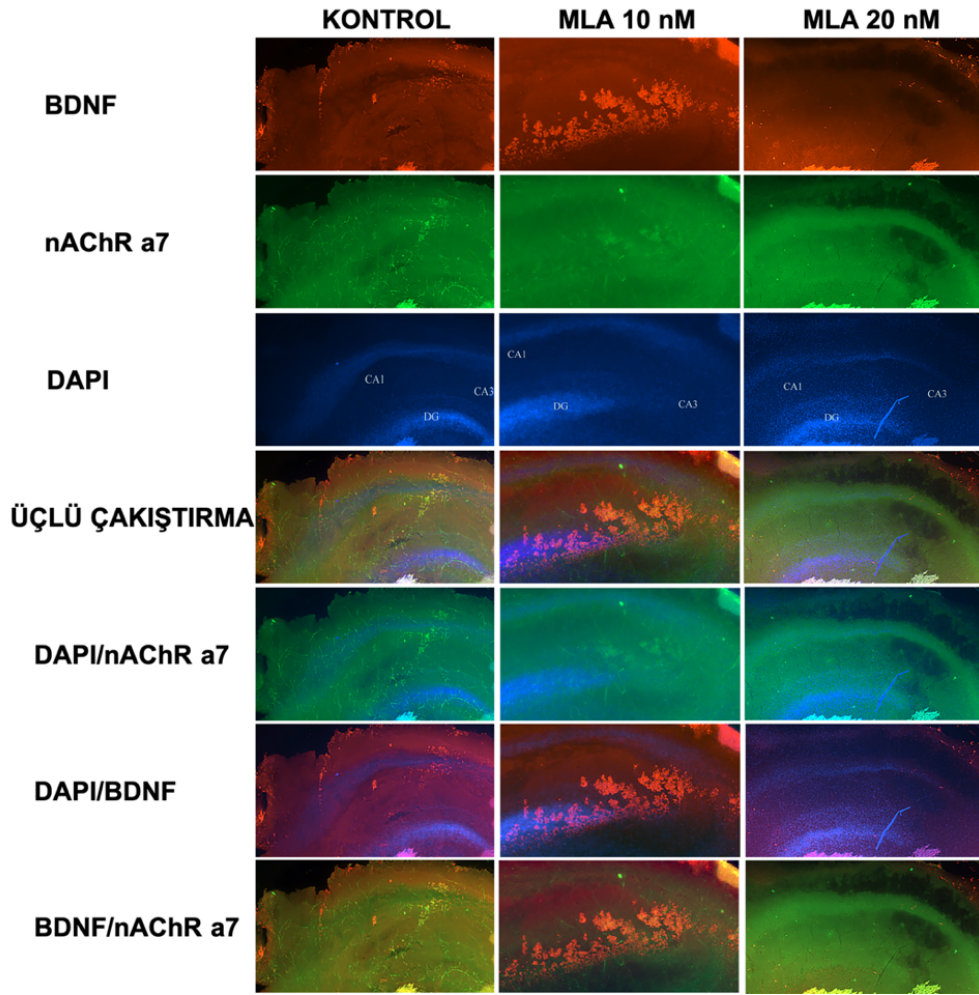


**Şekil 4-16: Hippokampusun organotipik kesit kültüründeki genel görünümü.** CA: Cornu Amonis. DG: Dentat gyrus. Boyama: DAPI nukleus boyası. Büyütme 4X.

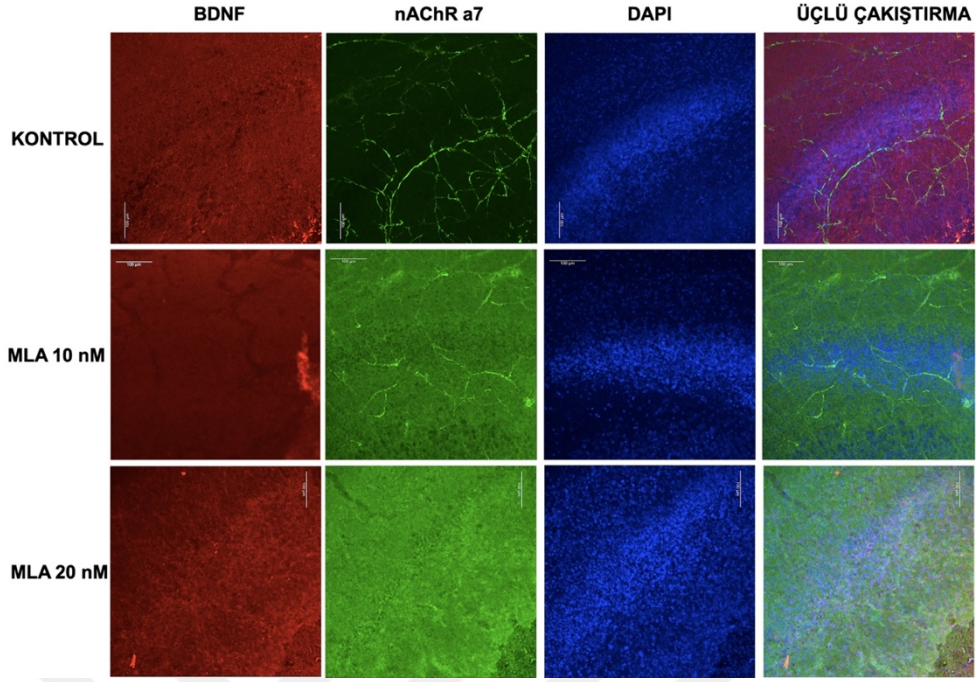
48 saatlik uygulama sonrasında tüm deney gruplarında nAChR  $\alpha 7$  için immün işaretlenme hippocampusun CA3, CA1 ve dentat gyrus bölgelerinde görüldü. 10 nM MLA uygulanan grupta nAChR  $\alpha 7$  immünpozitifliği CA3 bölgesinde kuvvetli görünürken, 20 nM MLA uygulanan grupta bu işaretlenme CA1 bölgesinde daha kuvvetli olarak görüldü.

48 saatlik uygulama sonrasında BDNF immünişaretlenmesi tüm deney gruplarında pozitif olarak görüldü. 10 nM MLA uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla immünpozitiflik CA1 bölgesinde daha kuvvetli idi. 20 nM MLA uygulanan grupta BDNF işaretlenmesi kontrol grubuna yakın olarak gözlemlendi.

BDNF ve nAChR  $\alpha 7$ 'nin birlikte yerleşimi kontrol grubunda CA3, CA1 ve dentat gyrusda görüldü. 10 nM MLA uygulanan grupta CA3 bölgesinde, 20 nM MLA uygulanan grupta ise CA1 bölgesinde birlikte yerleştiği görüldü (Şekil 4-17, 4-18).



**Şekil 4-17:** 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, BDNF ve nAChR  $\alpha 7$  proteinlerinin hipokampusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. BDNF (kırmızı; Alexa Fluor® 568); nAChR  $\alpha 7$  (yeşil; Alexa Fluor® 488) nucleus (mavi; DAPI). Büyütme 4X, Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskop.



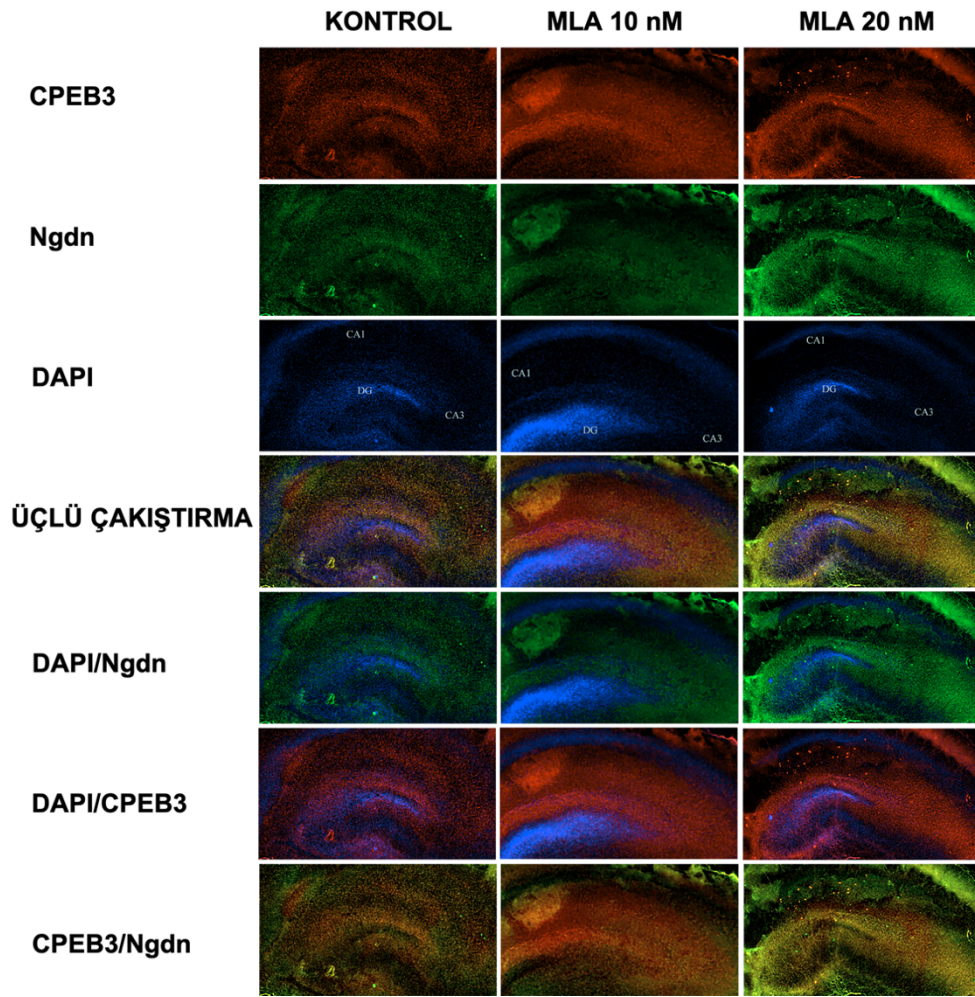
**Şekil 4-18:** 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, BDNF ve nAChR  $\alpha 7$  proteinlerinin hippocampus Dentat gyrus bölgesinde dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. BDNF (kırmızı; Alexa Fluor® 568); nAChR  $\alpha 7$  (yeşil; Alexa Fluor® 488) nucleus (mavi; DAPI). Büyütme 20X, Leica TCS SP8 Konfokal Mikroskop.

#### 4.2.4. CPEB3 ve Ngdn'in Hippokampusdaki Dağılımı

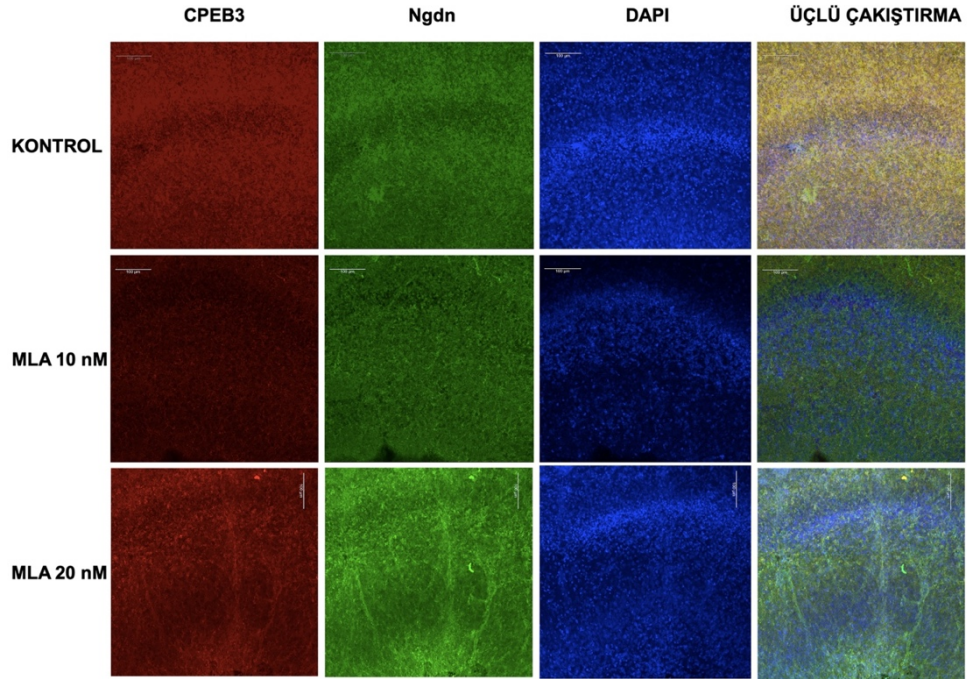
48 saat deney ve kontrol gruplarında CPEB3 için yaygın immün pozitiflik gözlemlendi. Kontrol grubunda Dentat gyrus (DG) bölgesinde CPEB3 daha kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi. 10 nM MLA uygulanan grupta, CPEB3 immünpozitifliği DG bölgesinde artmış şekilde görüldü. 20 nM MLA uygulanan grupta ise DG'de kontrol grubuyla benzer şekilde immün işaretlenme gözlemlendi.

48 saat deney ve kontrol gruplarında Ngdn için tüm alanlarda immün pozitiflik gözlemlendi. 10 nM MLA uygulanan grupta Ngdn için immün işaretlenme kontrol grubuyla benzer şekilde gözlemlendi. 20 nM MLA uygulanan grupta ise Ngdn immün işaretlenmesi dentat gyrus bölgesinde kuvvetli pozitif olarak görüldü.

CPEB3 ve Ngdn'in birlikte yerleşimi tüm gruplarda dentat gyrus da görüldü (Şekil 4-19, 4-20).



**Şekil 4-19:** 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin hippocampusdaki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. CPEB3 (Alexa Fluor® 568); Ngdn (Alexa Fluor® 488); nukleus (DAPI). Büyütme 4X, Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskop.



**Şekil 4-20:** 48 saat süreyle herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile, 10 nM ve 20 nM MLA uygulanan gruplarda, uygulamadan 48 saat sonra, CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin hipokampusun Dentat gyrus bölgesindeki dağılımlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. CPEB3 (Alexa Fluor® 568); Ngdn (Alexa Fluor® 488); nükleus (DAPI). Büyütme 20X, Leica TCS SP8 Konfokal Mikroskop.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda koku uyarımı ile oluşan uzun süreli hafızanın moleküler yolaklarının anlaşılmasına katkı yapmak amacıyla, olfaktör sistem ve hippocampusta önemli düzenleyicilerden olan asetilkolin reseptörü nAChR  $\alpha 7$ 'yi inhibe ederek sinaptik plastisite düzenleyicileri üzerindeki etkilerini araştırdık. Bu amaçla doku mimarisinin korunmasını sağlayarak farklı beyin bölgeleri ve hücre tipleri arasındaki etkileşimi incelememize olanak veren organotipik kesit kültürleri kullandık. Olfaktör bulbus ve hippocampustan alınan organotipik kesit kültürlerine nAChR  $\alpha 7$  antagonisti olan methyllycaconitine (MLA) uygulayarak, hem reseptörün hem de sinaptik plastisite için gerekli bir nörotrofik faktör olan BDNF ve sinaptik lokal protein sentezini kontrol eden CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin düzeyleri ve bu bölgelerdeki dağılımları üzerindeki etkisini inceledik.

Koku bilgileri olfaktör duyu nöronlarında (ODN) bulunan koku reseptörleri tarafından alınır. ODN'ler aksonlarını olfaktör bulbusa girişi sağlayan olfaktör glomerüllere doğru uzatırlar. Daha sonra, bu bilgi olfaktör bulbustan, mitral/(püsküllü) tufted hücreler ile korteksteeki ilgili bölgeye iletilir. Bazal önbeyinde bulunan kolinerjik nöronların, aksonlarını olfaktör bulbusa uzattığı bilinmektedir. Olfaktör sistem içerisindeki kolinerjik aktivite benzer kokuların ayrırılması ve öğrenme ile ilişkilendirilmiştir (Hamamoto ve ark., 2017). Kolinerjik girdilerin inhibisyonu bellek ve öğrenmeyi anlamlı düzeyde bozduğu bildirilmiştir (Kaneko ve ark., 2006). nAChR reseptör alt tipleri arasında nAChR  $\alpha 7$ 'nin, diğer reseptör tiplerine göre  $Ca^{2+}$  geçirgenliği daha yüksektir ve asetilkolin ve nikotinin yüksek konsantrasyonlarında hızlı bir şekilde duyarsızlaşmaktadır (Guerra-Alvarez ve ark., 2015). nAChR  $\alpha 7$ , nöron somasında, pre- ve post-sinaptik bölgelerde, dentritlerde, pre-terminal akson bölgelerinde ve akson terminallerinde bulunmaktadır. nAChR  $\alpha 7$ 'nin voltaj bağımlı  $Ca^{2+}$  kanalları ve NMDA reseptörleri ile birlikte konumlanması, sinaptik plastisitedeki rolünü desteklemektedir (Koukouli ve Maskos, 2015). Hippokampusun CA1 bölgesinde yapılan immün-altın işaretleme çalışmaları, hem GABAerjik hem de glutamaterjik sinapsların pre- ve post-sinaptik bölgelerinde nAChR  $\alpha 7$ 'nin bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Pre-sinaptik bölgede konumlanan nAChR  $\alpha 7$  glutamat salınmasını teşvik ederken, post sinaptik



bölgede konumlanan nAChR  $\alpha 7$  kolinerjik sinaptik iletimi düzenlemektedir (Cheng ve Yakel, 2015).

Çalışmamızda, olfaktör bulbus ve hippocampus kesit kültürlerinde nAChR  $\alpha 7$ 'nin MLA uygulaması ile inhibe edildiği koşullarda, total ve sinaptozomal nAChR  $\alpha 7$  protein ifadesindeki değişiklikler araştırıldı. MLA'nın, nAChR  $\alpha 7$ 'nin olfaktör bulbusda hem sinaptozomal hem de total protein fraksiyonundaki nAChR  $\alpha 7$  seviyesinde doza ve süreye bağlı olarak değişmekle birlikte azalmaya neden olduğu gösterildi. Hippokampusta ise düşük dozda MLA uygulamasının hem total proteinde hem de sinaptozomlarda nAChR  $\alpha 7$  ifadesinin artmasını indüklediği, daha yüksek dozda uygulamanın ise sinaptozomlardaki nAChR  $\alpha 7$  ifadesinde önce artış sonra azalma şeklinde bir değişikliğe neden olduğu saptandı.

Yapılan bazı çalışmalarda MLA'nın nAChR  $\alpha 7$  altünitesine karşı seçici inhibisyonu, mikromolar seviyede (Ward ve ark., 1990) ve nanomolar seviyede araştırılmıştır (Albuquerque ve ark., 2009; Wang ve ark., 2016; Aracri ve ark., 2017). Yapılan farklı çalışmalarda nAChR antagonistlerinin reseptörün artışı uyarma veya önleme yeteneklerinin, antagonistin dozuna ve reseptörün alt tipine göre değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Peng ve ark. SH-SY5Y nöroblastoma hücre soyları ile yaptıkları çalışmada uzun süreli yüksek doz nikotin uygulamasının nAChR  $\alpha 7$  ifadesini arttırdığını, bir nAChR  $\alpha 7$  reseptör antagonisti olan mecamylamine uygulamasının ise nikotine bağlı reseptör ifadesindeki artışı bloke ettiğini göstermişlerdir. Söz konusu uygulamalar nAChR  $\alpha 7$  mRNA ifadesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığından reseptör ifadesindeki değişikliklerin post transkripsiyonel mekanizmalar ile kontrol edildiği öne sürülmüştür (Peng ve ark., 1997). Çalışmamızda söz konusu çalışmalarla uyumlu olarak nAChR  $\alpha 7$  reseptör antagonisti olan MLA uygulamasının olfaktör bulbusda nAChR  $\alpha 7$  ifadesinin azalmasına neden olduğu gösterildi. Diğer bir çalışmada ise Ridley ve ark. kültürdeki hippocampal nöronlara 7 gün boyunca yüksek doz MLA uygulamasının nAChR  $\alpha 7$  ifadesini arttırdığını bildirmişlerdir (Ridley ve ark., 2001). Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki hippocampus nAChR  $\alpha 7$  total protein seviyeleri ile ilgili her iki doza ait bulgularımızla paralellik göstermektedir. Bulgularımız özet olarak nAChR  $\alpha 7$ 'nin MLA ile inhibisyonunun nAChR  $\alpha 7$  total ve sinaptik ifadesini doza, süreye ve bölgeye bağlı olarak değiştirdiğini göstermiştir.

Olfaktör bulbus içerisinde glomerüller en yüksek düzeyde kolinerjik aktivasyon sergilerler ve bu aktivasyonun glomerüller içindeki dağılımı koku etkinliği tarafından şekillendirilir. Otoradyografik çalışmalarda glomerüllerin yüksek derecede nAChR pozitifliği sergilediği ve dış pleksiform tabakanın da nAChR'leri için immün pozitif olduğu gösterilmiştir (Le Jeune ve ark., 1995). Yine Alkondon ve ark. OB da glomerüllerde, dış pleksiform ve iç pleksiform tabakalarda nAChR immün pozitifliğinin daha yoğun olarak görüldüğünü bildirmiştir (Alkondon ve ark., 1996). Diğer bir çalışmada ise, nAChR'nin glomerüllerdeki aktivasyonunun dış püsküllü (tufted) hücreleri depolarize ettiği ve spontan postsinaptik GABAerjik uyarı sıklığını arttırdığı gösterilmiştir. Söz konusu reseptörler, heteromerik nAChR  $\alpha 3\beta 4$  ve nAChR  $\alpha 4\beta 2$  alt tiplerine aittir (D'Souza ve ark., 2013; D'Souza ve Vijayaraghavan, 2014). Ancak, nAChR  $\alpha 7$  reseptör alt tipinin olfaktör bulbusdaki rolü hakkında yapılan çalışmalar yetersizdir.

İmmün işaretleme çalışmalarımızda, nAChR  $\alpha 7$ 'nin olfaktör bulbusda glomerüllerde, dış pleksiform ve iç pleksiform tabakalarında yoğunlaştığı gözlenmiştir. Bu bulgularımız, daha önce yapılmış olan immün işaretleme çalışmalarının sonuçları ile uyumlu olup nAChR  $\alpha 7$ 'nin glomerular mikroçevre modulasyonunda önemli rolleri olabileceği fikrini desteklemektedir. Hippokampusta, nAChR  $\alpha 7$  mRNA dağılımının, dentat gyrus (DG), CA3 ve CA1 bölgeleri boyunca yaygın olduğu bildirilmiştir (Cheng ve Yakel, 2015). Çalışmamızda, benzer şekilde nAChR  $\alpha 7$  proteininin de kontrol ve deney gruplarında DG, CA3 ve CA1 bölgelerinde yaygın dağılım gösterdiği saptanmıştır.

BDNF mRNA'larının dendritlerdeki lokal translasyonu sinaptik bağlantıların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Oe ve Yoneda, 2010). BDNF mRNA'larının dendritlerde konumlanmasını sağlayan ise mRNA'ların kısa 3'UTR bölgeleridir (Timmusk ve ark., 1993). Kısa 3'UTR içeren mRNA'ların dendritlere yönelmesinin, mRNA dizisi içerisinde sitoplazmik poliadenilasyon element (CPE) benzeri motiflerin varlığına dayandığı düşünülmektedir. Sitoplazmik poliadenilasyon elementine bağlanan protein (CPEB), nöronlarda poliadenilasyon, translasyonun baskılanması yada aktive edilmesi ve CPE içeren mRNA'ların taşınması gibi işlevleri ile tanımlanmıştır (Oe ve Yoneda, 2010). Ma ve ark. çalışmalarında, BDNF mRNA'sının CPEB1 proteiniyle birlikte yerleşim gösterdiğini primer kortikal nöronlarda ve kesit kültürlerinde göstermişlerdir (Ma ve ark., 2010). Vicario ve ark. ise BDNF transkriptlerinin CPEB1'e bağlanarak aktiviteye bağımlı olarak dendritlere yönlendirildiğini bildirmişlerdir (Vicario

ve ark., 2015). Tseng ve arkadaşları çalışmalarında CPEB4'ün erken postnatal dönemde olfaktör bulbus granüler hücreleri için bir sağkalım faktörü olarak rol oynadığını göstermişlerdir. Ayrıca, CPEB4'ün c-Fos mRNA translasyonunu uyararak BDNF sentezini düzenlediği de gösterilmiştir (Tseng ve ark., 2017). CPEB1 ve CPEB4'ün BDNF ile ortaya konmuş olan ilişkilerine karşın CPEB3 ve BDNF ilişkisine ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. CPEB3 birbirinden farklı fonksiyon gösteren, çözülebilen ve küme oluşturabilen iki forma sahiptir. Küme oluşturan aktif formu, uzun süreli sinaptik plastisitede görev alan hedef mRNA'ların translasyonunu başlatabilmektedir (Driscaldi ve ark., 2015).

Jung ve arkadaşları çalışmalarında Neuroguidin'in (Ngdn) hipokampal nöronlarda ve glia hücrelerinde ifade edildiğini ve nöron somasında ve nöritlerde konumlandığını göstermişlerdir. Fare beyin kesitleri ile yapılan immünohistokimyasal çalışmalarında ise Ngdn'in hipokampusun tüm bölgelerinde, özellikle dentat gyrusda ve ayrıca serebellumda bulunduğu saptanmıştır (Jung ve ark., 2006). Ancak, Ngdn'nin olfaktör bulbusda ifade edilip edilmediği ve lokalizasyonu hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Olfaktör bulbusda düşük doz MLA uygulamasından sonra BDNF'nin sinaptozomal protein seviyelerinin azaldığı saptanmıştır. Doz arttırıldığında ise BDNF, CPEB3 ve Ngdn seviyelerinin erken dönemde artarken, deney süresiyle birlikte BDNF ve Ngdn'nin azaldığı, CPEB3'ün seviyesinde ise değişiklik olmadığı saptanmıştır. Olfaktör bulbus total protein seviyelerinde düşük doz MLA uygulaması erken dönemde BDNF, CPEB3 ve Ngdn seviyelerinde azalmaya neden olurken deney süresi arttıkça CPEB3 ve Ngdn ifadeleri birlikte artış göstermiştir. Doz arttırıldığında ise uygulamanın geç döneminde CPEB3 ve Ngdn seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, ilk kez olarak Ngdn'nin olfaktör bulbusda ifade edildiğini gösterdik. MLA uygulaması ile nAChR  $\alpha 7$ 'nin inhibisyonunun olfaktör bulbusdaki Ngdn ifadesini doza ve süreye bağımlı olarak etkilediğini saptadık.

Düşük doz MLA uygulanarak nAChR  $\alpha 7$  inhibisyonunun hipokampusta hem sinaptozomal hem de total protein fraksiyonlarında BDNF ve CPEB3 ifadelerini farklı zaman aralıklarında birbirine paralel olarak etkilediğini gösterdik. Olfaktör bulbusda ise total proteinde BDNF ve CPEB3 ifadeleri erken dönemde paralellik gösterirken, sinaptozomal fraksiyonda daha geç dönemde paralellik gösterdiğini saptadık. BDNF ve

CPEB3 ifadelerinin birlikte azalma ve/veya artma göstermesi CPEB3'ün CPEB1 ve CPEB4'e benzer şekilde BDNF ile ilişkisi olabileceğine işaret etmektedir.

BDNF'nin kemirgen olfaktör bulbusunda düşük seviyelerde ifade edildiği ve glomerular tabaka, dış pleksiform tabaka ve yüzeyel granüler hücre tabakasında konumlandığı bildirilmiştir. Daha derin granüler hücre tabakalarında ise çok daha düşük seviyelerde ifade edildiği saptanmıştır (McDole ve ark., 2015). Diğer yandan, olfaktör bulbusdaki BDNF dağılımı ile ilgili çalışmalar mitral hücrelerde çelişkili sonuçlar içermektedir (Biju ve ark., 2008; Clevenger ve ark., 2008). Imamura ve ark. immünohistokimyasal çalışmaları sonucunda erken postnatal dönemde BDNF reseptörlerinden biri olan TrkB'nin mitral hücrelerde ifade edildiğini göstermişlerdir. Bu bulgu erken postnatal dönemde özellikle mitral hücre dentritlerinin hızlı bir şekilde büyüme ve farklılaşma göstermesini açıklar niteliktedir (Imamura ve Greer, 2009).

Biz de immünohistokimyasal çalışmamızda, olfaktör bulbusun olfaktör nöron tabakası (ONT) ve glomerular tabakasında (GT), BDNF için immün işaretlenme saptadık. CPEB3 ve Ngdn proteinlerinin ise olfaktör bulbusda GT, DPT, IPT ve GHT de birlikte yerleşim gösterdiğini tespit ettik. CPEB3 ve Ngdn'in özellikle dış pleksiform tabakada (DPT) birlikte konumlanmış olması söz konusu mitral hücre dentritleri ve/veya püsküllü (tufted) hücrelerde ifade edildiğini desteklemektedir. Nitekim, Huang ve ark. çalışmalarında CPEB3'ü mitral hücre dendritlerinde göstermişlerdir (Y. S. Huang ve ark., 2006).

Çalışmamızda, Ngdn'nin olfaktör bulbusda tabakalara özgü yerleşimini ayrıca CPEB3'ün olfaktör bulbusda mitral hücreler dışındaki diğer bölgelerde de ifade edildiği literatürde ilk olarak gösterilmiştir. Çalışmamızda BDNF, CPEB3 ve Ngdn'nin sadece OB glomerüllerinde birlikte yerleşim göstermesi, bu proteinlerinin ifadelerinin düzenlenmesinde farklı bölgelerde farklı mekanizmaların devreye girebileceğini göstermektedir. Bu mekanizmalar arasında, mitral hücrelerin glomerüllerin içinde yer alan apikal dentritleri üstünde bulunan ve olfaktör reseptör nöronlardan gelen girdileri birleştirerek glomerular bölgede mitral hücrelerin senkronize bir şekilde uyarılmasını sağlayan gap junctionlar (Migliore ve ark., 2005), nöronal uyarımı etkileyen ve nörotransmitter salınması üzerinde etkili olan hiperpolarize siklik nükleotid kapılı kanalların düzenlenmesi (Nakashima ve ark., 2013) gibi mekanizmalar sayılabilir. Bu

mekanizmaların herbirinin aydınlatılması olfaktor sistem içerisindeki sinaptik plastisitenin anlaşılmasına önemli bir katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızda, MLA'nın farklı konsantrasyonları kullanılarak nAChR  $\alpha 7$  inhibe edildi. Farklı doz ve saat aralıklarında hedef proteinlerin ifadelerinde farklı etkilenmeler gözlemlendi. Bu durum MLA'nın inhibe edici etkisinin geçici olması ve/veya hedef proteinlerin translasyonunun farklı hücresel yollar tarafından kontrol edilmesi ile açıklanabilir. nAChR  $\alpha 7$  reseptörünün hedef proteinleri etkileyerek nasıl fonksiyon gösterdiğini daha iyi anlaşılabilmesi için CRISPR cas9 gibi sistemler kullanılarak embriyonik dönemde reseptör genin ifadesinin baskılanması, yok edilmesi veya artırılması gibi müdahaleler sonrasında hedef genlerin GFP, dt-tomato gibi floresan boyalarla işaretlenerek görüntülenmesi gibi yaklaşımlar katkı sağlayabilir. Böylece, söz konusu hedef proteinlerin hem doku içerisindeki dağılımları hem de ifadelerindeki değişimlerin nasıl etkilendiği tespit edilebilir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar daha sonra gerçekleştirmeyi planladığımız olfaktor bulbus araştırmalarımız için temel oluşturarak yol gösterici nitelikte olmuştur. Olfaktor bulbus mitral hücrelerinde erken postnatal dönemde meydana gelen dendritik budama işlemi bu hücrelerin gelişimsel süreci için oldukça önemlidir. Bu çalışmada araştırdığımız proteinlerden, CPEB3'ün mitral hücre dendritik budama mekanizması üzerinde ne gibi rolleri olduğunu ve gelişimsel süreçte önemli olan NMDA alt ünitelerinden GRIN2A, GRIN2B ve GRIN3A'nın budama işlemi sırasında nAChR  $\alpha 7$  ile etkileşimlerini araştırılması konuya önemli katkılar sağlayacaktır.

Öte yandan hippocampusda düşük doz MLA uygulamasından sonra erken dönemde BDNF, CPEB3 ve Ngdn'nin sinaptosomal protein seviyelerinin azaldığı, yüksek doz MLA uygulamasının geç döneminde ise BDNF ve CPEB3 seviyesinin arttığı saptanmıştır. Hippocampusda düşük doz MLA uygulamasının erken dönemlerinde BDNF ve CPEB3'ün total protein seviyesini azalttığı, deney süresinin artmasıyla BDNF ve CPEB3 ile birlikte Ngdn seviyesinin de arttığı saptanmıştır. MLA dozu artırıldığında ise erken dönemde sadece BDNF ve Ngdn ifadesinin arttığı görülmüştür.

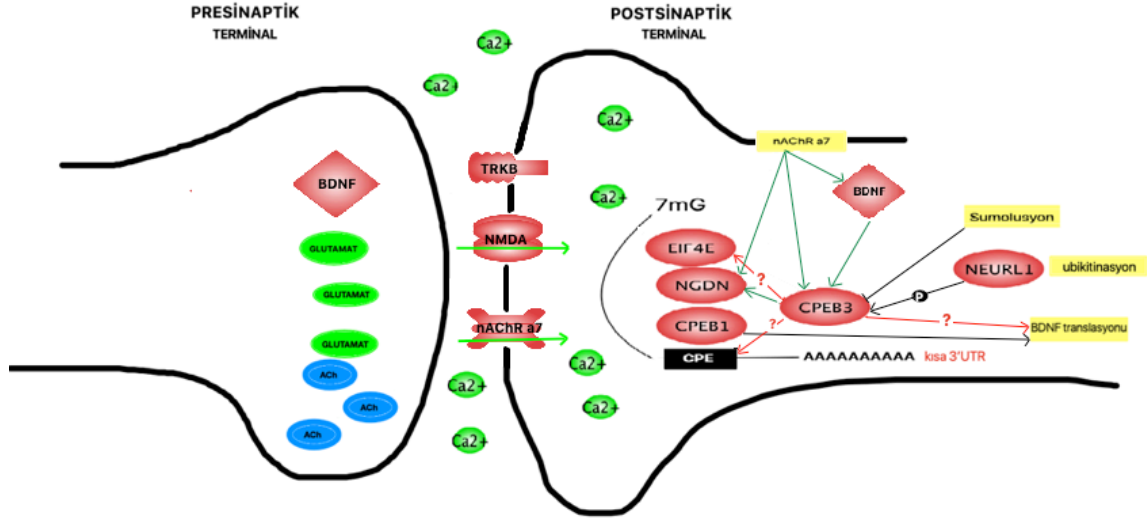
Hippokampal nöron kültürleri ile yapılan bir çalışmada, CPEB, Ngdn, Gld2, PARN gibi translasyonu kontrol edici faktörlerin dağılımının hücre gövdesi ve distal dendritlerde olduğu saptanmış ve hippocampal nöronlardan elde edilen sinaptozomlarda bu proteinlerin ifade edildiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, shRNA-aracılı Gld2 ve

Ngdn susturmasının dentat gyrus granüler hücre sinapslarında uzun süreli potansiyel artışını azalttığı bildirilmiştir (Udagawa ve ark., 2012). Diğer bir çalışmada ise BDNF uygulanan hippocampal nöronlarda nAChR  $\alpha 7$ 'nin ifadesinin arttığı yönünde çalışmalar mevcuttur (Massey ve ark., 2006). Bir diğer önemli nokta ise, erişkin beyninde nörogenezin dentat gyrus'un subgranüler zonunda ve lateral ventrikülün subventriküler zonunda devam etmekte olması ve subventriküler zondan rostral göç yolunu izleyerek olfaktör bulbusa gelen nöroblastların internöronlara farklılaşmasıdır. DG ve OB'deki söz konusu nörogenez süreçleri erişkin beyninde bilişsel işlevlerde rol oynamaktadır. Bazal ön beynin kolinerjik sisteminin, bu bölgelerde öğrenme ve hafıza düzenlemesinin yanı sıra nörogenezde de rol oynadığı bildirilmiştir. Kaneko ve ark çalışmalarında, normal ve stress koşulları altında kolinerjik sistemin aktivasyonunun, nörogenezin devam ettiği bu iki bölgede yeni doğan nöronların sağkalımını sağladığını göstermişlerdir (Kaneko ve ark., 2006).

Çalışmamızda, BDNF'nin hippocampusta genel bir dağılım gösterdiği, Ngdn'nin ise CPEB3 ile birlikte hippocampusun dentat gyrus bölgesinde daha yoğun bir yerleşim gösterdiği saptanmıştır. Hippokampus sinaptosomal fraksiyonunda, düşük doz MLA uygulaması CPEB3 ve Ngdn ifadelerinde paralel cevaplar oluşturmuştur. Total protein fraksiyonunda ise CPEB3 ve Ngdn ifadeleri uygulamanın daha ileri dönemlerinde birlikte artış göstermiştir. Bu bulgularımız, söz konusu iki proteinin kolinerjik aktivite ile düzenlendiğine işaret etmektedir. Ayrıca, erişkin nörogenezin gerçekleştiği dentat gyrus bölgesindeki yerleşimleri Ngdn ve CPEB3'ün nörogenez sürecinde de rolleri olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada sinaptik plastisiye katılan lokal protein sentezini kontrol eden proteinlerden olan CPEB3 ile Ngdn'nin ve sinaptik bir düzenleyici olan BDNF'nin nAChR  $\alpha 7$  inhibisyonu yapılan olfaktör bulbus ve hippocampus organotipik kesit kültürlerindeki yerleşimi ve protein ifadelerindeki değişimler literatürde ilk kez gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda CPEB3, Ngdn ve BDNF arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir sonuca rastlanmamıştır. Ayrıca, nAChR  $\alpha 7$  inhibe edildiğinde BDNF ifadesindeki değişimler hem olfaktör bulbusda hemde hippocampusta ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Bu proteinlerin birlikte nasıl fonksiyon gösterdiğinin daha iyi bir şekilde anlaşılması için protein protein etkileşim analizleri yapılarak daha kapsamlı olarak araştırılması gerekmektedir (Şekil 5-1). Diğer taraftan, nAChR  $\alpha 7$ 'nin yüksek

kalsiyum geçirgenliğine sahip olduğu bilinse de, hücre içi kalsiyum artışı diğer kanallar ve endoplazmik retikulumda bulunan kalsiyum depoları ile de düzenlenmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda MLA uygulamasının nAChR  $\alpha 7$  üstündeki etkilerinin gösterilmesi, agonist uygulamasını takiben antagonist uygulaması yapılarak reseptörün nasıl etkilendiği gibi sorulara karşı sınırlılıklar içermektedir.



**Şekil 5-1: Presinaptik ve postsinaptik bölgelerde sinaptik protein sentezinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinler ve ilişkili şematik gösterim.** Yeşil oklar bu çalışmada ilk olarak ortaya konan sonuçları göstermektedir: nAChR  $\alpha 7$  inhibisyonu BDNF, CPEB3 ve NGDN ifadelerini etkilemektedir. CPEB3, NGDN ile etkileşmektedir. CPEB3, CPEB1 gibi lokal protein sentezinde rol oynayabilir. Kırmızı oklar çalışmamızın sonuçlarının işaret ettiği ve daha fazla araştırılması gerekli yolları göstermektedir: CPEB3, eIF4E ile etkileşiyor olabilir. CPEB3'ün, BDNF transkripsiyonunu kontrolünde rolü alabilir.

Elde ettiğimiz sonuçlar nAChR  $\alpha 7$ 'nin uzun süreli belleğin oluşturulması ve geri çağırmasında görev alan proteinlerin katıldığı yolların moleküler mekanizmasının anlaşılmasına ve bu konudaki mevcut literatür bilgisine katkı sağlamıştır.

## KAYNAKLAR

- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, *89*(1), 73-120. doi:10.1152/physrev.00015.2008
- Alkondon, M., Rocha, E. S., Maelicke, A., & Albuquerque, E. X. (1996). Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. V. alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in olfactory bulb neurons and presynaptic modulation of glutamate release. *J Pharmacol Exp Ther*, *278*(3), 1460-1471.
- Aracri, P., Meneghini, S., Coatti, A., Amadeo, A., & Becchetti, A. (2017). alpha4beta2(\*) nicotinic receptors stimulate GABA release onto fast-spiking cells in layer V of mouse prefrontal (Fr2) cortex. *Neuroscience*, *340*, 48-61. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.10.045
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katzev, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Medina, J. H., . . . Medina, J. H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(7), 2711-2716. doi:10.1073/pnas.0711863105
- Biju, K. C., Mast, T. G., & Fadool, D. A. (2008). Olfactory sensory deprivation increases the number of proBDNF-immunoreactive mitral cells in the olfactory bulb of mice. *Neurosci Lett*, *447*(1), 42-47. doi:10.1016/j.neulet.2008.09.050
- Buffington, S. A., Huang, W., & Costa-Mattioli, M. (2014). Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annu Rev Neurosci*, *37*, 17-38. doi:10.1146/annurev-neuro-071013-014100
- Chapuis, J., Cohen, Y., He, X., Zhang, Z., Jin, S., Xu, F., & Wilson, D. A. (2013). Lateral entorhinal modulation of piriform cortical activity and fine odor discrimination. *J Neurosci*, *33*(33), 13449-13459. doi:10.1523/JNEUROSCI.1387-13.2013
- Cheng, Q., & Yakel, J. L. (2015). The effect of alpha7 nicotinic receptor activation on glutamatergic transmission in the hippocampus. *Biochem Pharmacol*, *97*(4), 439-444. doi:10.1016/j.bcp.2015.07.015
- Clevenger, A. C., Salcedo, E., Jones, K. R., & Restrepo, D. (2008). BDNF promoter-mediated beta-galactosidase expression in the olfactory epithelium and bulb. *Chem Senses*, *33*(6), 531-539. doi:10.1093/chemse/bjn021
- D'Souza, R. D., Parsa, P. V., & Vijayaraghavan, S. (2013). Nicotinic receptors modulate olfactory bulb external tufted cells via an excitation-dependent inhibitory mechanism. *J Neurophysiol*, *110*(7), 1544-1553. doi:10.1152/jn.00865.2012
- D'Souza, R. D., & Vijayaraghavan, S. (2014). Paying attention to smell: cholinergic signaling in the olfactory bulb. *Front Synaptic Neurosci*, *6*, 21. doi:10.3389/fnsyn.2014.00021
- Darnell, J. C., & Richter, J. D. (2012). Cytoplasmic RNA-binding proteins and the control of complex brain function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *4*(8), a012344. doi:10.1101/cshperspect.a012344
- Deiana, S., Platt, B., & Riedel, G. (2011). The cholinergic system and spatial learning. *Behav Brain Res*, *221*(2), 389-411. doi:10.1016/j.bbr.2010.11.036
- DeMaria, S., & Ngai, J. (2010). The cell biology of smell. *J Cell Biol*, *191*(3), 443-452. doi:10.1083/jcb.201008163
- Devore, S., & Linster, C. (2012). Noradrenergic and cholinergic modulation of olfactory bulb sensory processing. *Front Behav Neurosci*, *6*, 52. doi:10.3389/fnbeh.2012.00052



- Diniz, B. S., & Teixeira, A. L. (2011). Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: physiopathology and beyond. *Neuromolecular Med*, *13*(4), 217-222. doi:10.1007/s12017-011-8154-x
- Drisaldi, B., Colnaghi, L., Fioriti, L., Rao, N., Myers, C., Snyder, A. M., . . . Kandel, E. R. (2015). SUMOylation Is an Inhibitory Constraint that Regulates the Prion-like Aggregation and Activity of CPEB3. *Cell Rep*, *11*(11), 1694-1702. doi:10.1016/j.celrep.2015.04.061
- Egger, V., & Urban, N. N. (2006). Dynamic connectivity in the mitral cell-granule cell microcircuit. *Semin Cell Dev Biol*, *17*(4), 424-432. doi:10.1016/j.semcdb.2006.04.006
- Gahwiler, B. H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R. A., & Thompson, S. M. (1997). Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci*, *20*(10), 471-477.
- Gahwiler, B. H., Thompson, S. M., & Muller, D. (2001). Preparation and maintenance of organotypic slice cultures of CNS tissue. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 6, Unit 6 11. doi:10.1002/0471142301.ns0611s09
- Goodfellow, I. G., & Roberts, L. O. (2008). Eukaryotic initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol*, *40*(12), 2675-2680. doi:10.1016/j.biocel.2007.10.023
- Gotti, C., Zoli, M., & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci*, *27*(9), 482-491. doi:10.1016/j.tips.2006.07.004
- Guerra-Alvarez, M., Moreno-Ortega, A. J., Navarro, E., Fernandez-Morales, J. C., Egea, J., Lopez, M. G., & Cano-Abad, M. F. (2015). Positive allosteric modulation of alpha-7 nicotinic receptors promotes cell death by inducing Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum. *J Neurochem*, *133*(3), 309-319. doi:10.1111/jnc.13049
- Hamamoto, M., Kiyokage, E., Sohn, J., Hioki, H., Harada, T., & Toida, K. (2017). Structural basis for cholinergic regulation of neural circuits in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol*, *525*(3), 574-591. doi:10.1002/cne.24088
- Hardy, D., & Saghatelian, A. (2017). Different forms of structural plasticity in the adult olfactory bulb. *Neurogenesis (Austin)*, *4*(1), e1301850. doi:10.1080/23262133.2017.1301850
- Huang, W. H., Chao, H. W., Tsai, L. Y., Chung, M. H., & Huang, Y. S. (2014). Elevated activation of CaMKIIalpha in the CPEB3-knockout hippocampus impairs a specific form of NMDAR-dependent synaptic depotentiation. *Front Cell Neurosci*, *8*, 367. doi:10.3389/fncel.2014.00367
- Huang, Y. S., Kan, M. C., Lin, C. L., & Richter, J. D. (2006). CPEB3 and CPEB4 in neurons: analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA. *EMBO J*, *25*(20), 4865-4876. doi:10.1038/sj.emboj.7601322
- Hurst, R., Rollema, H., & Bertrand, D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther*, *137*(1), 22-54. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.08.012
- Imai, T. (2014). Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol*, *35*, 180-188. doi:10.1016/j.semcdb.2014.07.012
- Imamura, F., & Greer, C. A. (2009). Dendritic branching of olfactory bulb mitral and tufted cells: regulation by TrkB. *PLoS One*, *4*(8), e6729. doi:10.1371/journal.pone.0006729

- Iulita, M. F., Bistue Millon, M. B., Pentz, R., Aguilar, L. F., Do Carmo, S., Allard, S., . . . Cuello, A. C. (2017). Differential deregulation of NGF and BDNF neurotrophins in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, *108*, 307-323. doi:10.1016/j.nbd.2017.08.019
- Jung, M. Y., Lorenz, L., & Richter, J. D. (2006). Translational control by neuroguidin, a eukaryotic initiation factor 4E and CPEB binding protein. *Mol Cell Biol*, *26*(11), 4277-4287. doi:10.1128/MCB.02470-05.
- Jung HY, Yim HS, Yoo DY, Kim JW, Chung JY, Seong JK, Yoon YS, Kim DW, Hwang IK. Postnatal changes in glucose transporter 3 expression in the dentate gyrus of the C57BL/6 mouse model. *Lab Anim Res*. 2016 Mar;*32*(1):1-7.
- Kaneko, N., Okano, H., & Sawamoto, K. (2006). Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes Cells*, *11*(10), 1145-1159. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.01010.x
- Koukouli, F., & Maskos, U. (2015). The multiple roles of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in modulating glutamatergic systems in the normal and diseased nervous system. *Biochem Pharmacol*, *97*(4), 378-387. doi:10.1016/j.bcp.2015.07.018
- Kundel, M., Jones, K. J., Shin, C. Y., & Wells, D. G. (2009). Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein regulates neurotrophin-3-dependent beta-catenin mRNA translation in developing hippocampal neurons. *J Neurosci*, *29*(43), 13630-13639. doi:10.1523/JNEUROSCI.2910-08.2009
- Le Jeune, H., Aubert, I., Jourdan, F., & Quirion, R. (1995). Comparative laminar distribution of various autoradiographic cholinergic markers in adult rat main olfactory bulb. *J Chem Neuroanat*, *9*(2), 99-112.
- Leal, G., Bramham, C. R., & Duarte, C. B. (2017). BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Vitam Horm*, *104*, 153-195. doi:10.1016/bs.vh.2016.10.004
- Lee, J. H., Wei, L., Deveau, T. C., Gu, X., & Yu, S. P. (2016). Expression of the NMDA receptor subunit GluN3A (NR3A) in the olfactory system and its regulatory role on olfaction in the adult mouse. *Brain Struct Funct*, *221*(6), 3259-3273. doi:10.1007/s00429-015-1099-3
- Liberia, T., Blasco-Ibanez, J. M., Nacher, J., Varea, E., Lanciego, J. L., & Crespo, C. (2013). Two types of periglomerular cells in the olfactory bulb of the macaque monkey (*Macaca fascicularis*). *Brain Struct Funct*, *218*(4), 873-887. doi:10.1007/s00429-012-0435-0
- Lombardo, S., & Maskos, U. (2015). Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*, *96*(Pt B), 255-262. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.11.018
- Ma, B., Culver, B. P., Baj, G., Tongiorgi, E., Chao, M. V., & Tanese, N. (2010). Localization of BDNF mRNA with the Huntington's disease protein in rat brain. *Mol Neurodegener*, *5*, 22. doi:10.1186/1750-1326-5-22
- Massey, K. A., Zago, W. M., & Berg, D. K. (2006). BDNF up-regulates alpha7 nicotinic acetylcholine receptor levels on subpopulations of hippocampal interneurons. *Mol Cell Neurosci*, *33*(4), 381-388. doi:10.1016/j.mcn.2006.08.011
- Maurer, S. V., & Williams, C. L. (2017). The Cholinergic System Modulates Memory and Hippocampal Plasticity via Its Interactions with Non-Neuronal Cells. *Front Immunol*, *8*, 1489. doi:10.3389/fimmu.2017.01489

- McDole, B., Isgor, C., Pare, C., & Guthrie, K. (2015). BDNF over-expression increases olfactory bulb granule cell dendritic spine density in vivo. *Neuroscience*, *304*, 146-160. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.056
- McQuiston, A. R. (2014). Acetylcholine release and inhibitory interneuron activity in hippocampal CA1. *Front Synaptic Neurosci*, *6*, 20. doi:10.3389/fnsyn.2014.00020
- Migliore, M., Hines, M. L., & Shepherd, G. M. (2005). The role of distal dendritic gap junctions in synchronization of mitral cell axonal output. *J Comput Neurosci*, *18*(2), 151-161. doi:10.1007/s10827-005-6556-1
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits*, *8*, 98. doi:10.3389/fncir.2014.00098
- Nakashima, N., Ishii, T. M., Bessho, Y., Kageyama, R., & Ohmori, H. (2013). Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels regulate the spontaneous firing rate of olfactory receptor neurons and affect glomerular formation in mice. *J Physiol*, *591*(7), 1749-1769. doi:10.1113/jphysiol.2012.247361
- Oe, S., Miki, H., Nishimura, W., & Noda, Y. (2016). Mechanism of the Dendritic Translation and Localization of Brain-derived Neurotrophic Factor. *Cell Struct Funct*, *41*(1), 23-31. doi:10.1247/csf.15015
- Oe, S., & Yoneda, Y. (2010). Cytoplasmic polyadenylation element-like sequences are involved in dendritic targeting of BDNF mRNA in hippocampal neurons. *FEBS Lett*, *584*(15), 3424-3430. doi:10.1016/j.febslet.2010.06.040
- Osborne, M. J., & Borden, K. L. (2015). The eukaryotic translation initiation factor eIF4E in the nucleus: taking the road less traveled. *Immunol Rev*, *263*(1), 210-223. doi:10.1111/imr.12240
- Peng, X., Gerzanich, V., Anand, R., Wang, F., & Lindstrom, J. (1997). Chronic nicotine treatment up-regulates alpha3 and alpha7 acetylcholine receptor subtypes expressed by the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Mol Pharmacol*, *51*(5), 776-784.
- Quik, M., Zhang, D., McGregor, M., & Bordia, T. (2015). Alpha7 nicotinic receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*, *97*(4), 399-407. doi:10.1016/j.bcp.2015.06.014
- Rayman, J. B., & Kandel, E. R. (2017). Erratum: Functional Prions in the Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *9*(8). doi:10.1101/cshperspect.a033597
- Richter, J. D. (2007). CPEB: a life in translation. *Trends Biochem Sci*, *32*(6), 279-285. doi:10.1016/j.tibs.2007.04.004
- Richter, J. D., & Klann, E. (2009). Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation. *Genes Dev*, *23*(1), 1-11. doi:10.1101/gad.1735809
- Ridley, D. L., Rogers, A., & Wonnacott, S. (2001). Differential effects of chronic drug treatment on alpha3\* and alpha7 nicotinic receptor binding sites, in hippocampal neurones and SH-SY5Y cells. *Br J Pharmacol*, *133*(8), 1286-1295. doi:10.1038/sj.bjp.0704207
- Scharfman, H. E. (2016). The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat Rev Neurosci*, *17*(9), 562-575. doi:10.1038/nrn.2016.87
- Sonenberg, N. (2008). eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem Cell Biol*, *86*(2), 178-183. doi:10.1139/O08-034

- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., & Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*, *10*(3), 475-489.
- Tseng, C. S., Chao, H. W., Huang, H. S., & Huang, Y. S. (2017). Olfactory-Experience- and Developmental-Stage-Dependent Control of CPEB4 Regulates c-Fos mRNA Translation for Granule Cell Survival. *Cell Rep*, *21*(8), 2264-2276. doi:10.1016/j.celrep.2017.10.100
- Uchida, S., & Kagitani, F. (2018). Effect of basal forebrain stimulation on extracellular acetylcholine release and blood flow in the olfactory bulb. *J Physiol Sci*, *68*(4), 415-423. doi:10.1007/s12576-017-0542-z
- Udagawa, T., Swanger, S. A., Takeuchi, K., Kim, J. H., Nalavadi, V., Shin, J., . . . Richter, J. D. (2012). Bidirectional control of mRNA translation and synaptic plasticity by the cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol Cell*, *47*(2), 253-266. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.016
- Vicario, A., Colliva, A., Ratti, A., Davidovic, L., Baj, G., Gricman, L., . . . Tongiorgi, E. (2015). Dendritic targeting of short and long 3' UTR BDNF mRNA is regulated by BDNF or NT-3 and distinct sets of RNA-binding proteins. *Front Mol Neurosci*, *8*, 62. doi:10.3389/fnmol.2015.00062
- Villasana, L. E., Klann, E., & Tejada-Simon, M. V. (2006). Rapid isolation of synaptoneuroosomes and postsynaptic densities from adult mouse hippocampus. *J Neurosci Methods*, *158*(1), 30-36. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.05.008
- Wang, J., Wang, Y., Guo, F., Feng, Z., Wang, X., & Lu, C. (2016). Nicotinic modulation of Ca<sup>2+</sup> oscillations in rat cortical neurons in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol*, *310*(9), C748-754. doi:10.1152/ajpcell.00197.2015
- Ward, J. M., Cockcroft, V. B., Lunt, G. G., Smillie, F. S., & Wonnacott, S. (1990). Methyllycaconitine: a selective probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites. *FEBS Lett*, *270*(1-2), 45-48.
- Wilson, D. A., Best, A. R., & Sullivan, R. M. (2004). Plasticity in the olfactory system: lessons for the neurobiology of memory. *Neuroscientist*, *10*(6), 513-524. doi:10.1177/1073858404267048
- Yamada, K., & Nabeshima, T. (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci*, *91*(4), 267-270.
- Yang, T., Xiao, T., Sun, Q., & Wang, K. (2017). The current agonists and positive allosteric modulators of alpha7 nAChR for CNS indications in clinical trials. *Acta Pharm Sin B*, *7*(6), 611-622. doi:10.1016/j.apsb.2017.09.001

## ETİK KURUL KARARI



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı: 2016/ **52**

27 / 05 /2016

Sayın Prof. Dr. Selma YILMAZER  
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

**Karar No** 2016/ **52****Basvuru** : 20.05.2016

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Msc İrem L. ATASOY'a** ait "nAChR alfa-7'nin Sinaptik Plastisite Üzerine Etkilerinin Olfaktör Bulbus ve Hippokampus Organotipik Kesit Kültürlerinde İncelenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Dişi/Erkek
	Sayısı	<b>32</b>
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		01.07.2016/29.12.2017

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ  
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK  
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY  
Üye

Prof.Dr. İlhan İLKILIÇ  
Üye

Doç.Dr. Alper OKYAR  
Üye

Yard.Doç.Dr Altan ARMUTAK  
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ  
Üye

Dr. Burak OLGUN  
Mak.Yük. Müh.  
Üye

Avukat Selma DEMİR  
Üye

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

nAChR  $\alpha 7$ 'NİN SİNAPTİK PLASTİSİTE ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
OLFAKTÖR BULBUS VE HİPPOKAMPUS ORGANOTİPİK  
KESİT KÜLTÜRLERİNDE İNCELENMESİ

### ORJİNALLİK RAPORU

<b>%2</b>	<b>%1</b>	<b>%1</b>	<b>%2</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>Submitted to Istanbul University</b> Öğrenci Ödevi	<b>%2</b>
<b>2</b>	<b>www.science.gov</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>3</b>	<b>tbgder.org</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>4</b>	<b>d-nb.info</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>5</b>	<b>pdfs.semanticscholar.org</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>6</b>	<b>www.jstage.jst.go.jp</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>7</b>	<b>www.readperiodicals.com</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Irem Lutfiye	<b>Soyadı</b>	ATASOY
<b>Doğ.Yeri</b>	Bakırköy	<b>Doğ.Tar.</b>	26.09.1987
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	17651099222
<b>Email</b>	irem_aatasoy@yahoo.com	<b>Tel</b>	05300932496

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mez. Yılı</b>
<b>Doktora</b>	Istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.	2018
<b>Yük.Lis.</b>	Istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.	2013
<b>Lisans</b>	Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji AD.	2009
<b>Lise</b>	Eyüp Lisesi (YDA)	2005

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>	<b>Yökdil</b>
<b>İngilizce</b>	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	82,5

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	72,9	74,2	66,8

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
Microsoft Office	Çok iyi

## Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

### Yayımlar:

1. Gezen-Ak, D, I. L. Atasoy, E. Candas, M. Alaylioglu and E. Dursun. The Transcriptional Regulatory Properties of Amyloid Beta 1-42 may Include Regulation of Genes Related to Neurodegeneration. *Neuromolecular Med.* 20(3): 363-375, 2018
2. Metin-Armağan D, Gezen-Ak D, Dursun E, Atasoy İL, Karabay A, Yilmazer S, Öztürk M. Okadaic acid-induced tau hyperphosphorylation and the downregulation of Pin1 expression in primary cortical neurons. *J Chem Neuroanat.* May 31;92:41-47. doi: 10.1016/j.jchemneu.2018.05.006, 2017
3. Atasoy İL, Dursun E, Gezen-Ak D, Metin-Armağan D, Öztürk M, Yilmazer S: Both secreted and the cellular levels of BDNF attenuated due to tau hyperphosphorylation in primary cultures of cortical neurons. *J Chem Neuroanat* 80:19-26, 2017.
4. Gezen-Ak, D., I. L. Atasoy, E. Candas, M. Alaylioglu, S. Yilmazer and E. Dursun. Vitamin D Receptor Regulates Amyloid Beta 1-42 Production with Protein Disulfide Isomerase A3. *ACS Chem Neurosci* 8(10): 2335-2346, 2017.
5. Gezen-Ak D, Alaylioglu M, Genc G, Gunduz A, Candas E, Bilgic B, Atasoy İL, Apaydin H, Kiziltan G, Gurvit H, Hanagasi H, Ertan S, Yilmazer S, Dursun E: GC and VDR SNPs and Vitamin D Levels in Parkinson's Disease: The Relevance to Clinical Features. *Neuromolecular Med* 19:24-40, 2017.
6. Gezen-Ak D, Atasoy İL, Candas E, Alaylioglu M, Yilmazer S, Dursun E: Vitamin D Receptor Regulates Amyloid Beta 1-42 Production with Protein Disulfide Isomerase A3. *ACS Chem Neurosci* 8:2335-2346, 2017.
7. Dursun E, Alaylioglu M, Bilgic B, Hanagasi H, Lohmann E, Atasoy İL, Candas E, Araz OS, Onal B, Gurvit H, Yilmazer S, Gezen-Ak D: Vitamin D deficiency might pose a greater risk for ApoEε4 non-carrier Alzheimer's disease patients. *Neurol Sci* 37:1633-1643, 2016.
8. Dursun E, Gezen-Ak D, Hanagasi H, Bilgic B, Lohmann E, Ertan S, Atasoy İL, Alaylioglu M, Araz OS, Onal B, Gunduz A, Apaydin H, Kiziltan G, Ulutin T, Gurvit H, Yilmazer S: The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 283:50-57, 2015.
9. Gezen-Ak D, Dursun E, Hanagasi H, Bilgic B, Lohman E, Araz OS, Atasoy İL, Alaylioglu M, Onal B, Gurvit H, Yilmazer S: BDNF, TNFα, HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 37:185-195, 2013.



**Kurs ve Konferanslar:**

1. Poster Presentation at the *Alzheimer's Association International Conference* in London, United Kingdom, 2017.
2. Neural Development and Neurodevelopmental Disorders, NENS and IBRO training course, Turin, Italy, 2014.
3. Attendance of Oral Presentation at the National Neuroscience Congress in İstanbul Bahçeşehir University, 2014.
4. Attendance of Poster Presentation at the *Alzheimer's Association International Conference* in Boston, United States, 2013.
5. Certificate of Attendance- EMBO Young Scientists' Forum Yeditepe University, 2012.
6. LLP-Erasmus-Intensive Programme Classic and Modern Methods for Molecular Diagnostic in Human Pathology/ Brasov-2011.
7. Embo Workshop: Development and Function of the Nervous system Bogazıcı University, 2011.

**Yurt Dışı Laboratuar Stajları:**

1. Visiting Student, Department of Developmental Neurophysiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Imai Lab, Fukuoka, Japan, 2017: 2 ay
2. Visiting student, McGill University, Cell information system group Mckinney lab, Montreal Canada, 2015: 4 hafta

