



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KRONİK MİYELOİD ERİTROLÖSEMİ HÜCRE SOYUNDA  
MUSKARNİK RESEPTÖR ARACILI MİTOJENLE AKTİVE OLAN  
PROTEİN KİNAZ AKTİVASYONUNDA EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖR  
RESEPTÖRÜNÜN ROLÜ**

SELDA GÜLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYO FİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hülya CABADAK

İSTANBUL-2016





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KRONİK MİYELOİD ERİTROLÖSEMİ HÜCRE SOYUNDA  
MUSKARNİK RESEPTÖR ARACILI MİTOJENLE AKTİVE OLAN  
PROTEİN KİNAZ AKTİVASYONUNDA EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖR  
RESEPTÖRÜNÜN ROLÜ**

SELDA GÜLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYO FİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hülya CABADAK

İSTANBUL-2016

## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans

Anabilim Dalı : Biyofizik

Tez Sahibi : Selda Güler

Tez Başlığı : İnsan kronik miyeloid eritrolösemi hücre soyunda muskarnik reseptör aracılı mitojenle aktive olan protein kinaz aktivasyonunda epidermal büyüme faktör reseptörünün rolü

Sınav Yeri : Biyofizik Ana Bilim Dalı

Sınav Tarihi : 19/07/2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Danışman

Doç. Dr. Hülya CABADAK

### Kurumu

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

### İmza

### Sınav Jüri Üyeleri

Doç. Dr. İlter GÜNEY

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Handan AKÇAKAYA

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...2-8-2016 tarih ve 54 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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 olmadığını beyan ederim.

SELDA GÜLER



**Sevgili Canım Ailem;**

## TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans süresince ve tezimin her aşamasında bana yardımını anlayışını eğitimim boyunca yoluma ışık tutan ve değerli zamanını desteğini hiç esirgemeyen her fırsatta yardım eden en başından beri kendisiyle çalışmak istediğim değerli çok sevdiğim hocam Sayın **Doç. Dr. Hülya CABADAK**'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim. Tezimin yürümesinde en başta anlayışını, herhangi bir hatamda beni yargılamayan tavrını, güler yüzünü ve desteğini esirgemeyen çalışmamın atardamarı olan Sayın hocam **Dr. Banu AYDIN**'a teşekkürü bir borç bilirim. Tecrübesi, güler yüzüyle çalışmalarım boyunca bana destek olan bölüm başkanımız değerli hocam **Doç. Dr. Ayşe İnan GARİP**'e, Tavrı, iyi bir aile babası olduğundan hep yapıcı yorumları ve saygısı, içtenliği, her daim esprileri ve bilgileriyle bana her zaman destekte bulunan çok kıymetli hocam **Yard. Doç. Dr. Cevdet NACAR**'a,

Desteğini her zaman hissettiğim canım ailem; Biricik Anneciğim iyikilerimin en başı olan canımın içi **Sema GÜLER**'e, sırtımı yasladığım koca çınarım Babacığım **Şahsivar GÜLER**'e, Emeğini ve desteğini en başta dualarıyla ve harçlıklarıyla hep hissettiren canım tonton şirin Annanem **Emine ŞEREMENT**'e, kız kardeşim; Can palem, ilk nefesimi aldığım saniyeden itibaren yanımda yol arkadaşım biricik kardeşim **Seda GÜLER**'e, ne zaman telefon açsam tamam abicim 'hallederiz' diyen hep güvendiğim sırtımı yaslamaktan hiç çekinmediğim Abiciğim **Serdar GÜLER**'e, ailemize yeni katılan yeni heceleyen neşesiyle destek olan yiğenim **Beren GÜLER**'e küçük annecik, düşünceli küçük gelinimiz bana destek olan **Duygu GÜLER**'e ve hep destek olup yanımda olduğu için tüm sevdiklerime ve aileme çok teşekkür ederim.

Arkadaşım, kardeşim gibi sevdiğim **Zehra KANLI**'ya unutmayacağım yardımları için çok teşekkür ederim. Takım arkadaşım İngilizce çevirileriyle bana destek olup yardım ettiği için **Yiğit Ant UĞURDAĞ**'a ve diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim. Dönem arkadaşım **Ayşe Melek Tanrıverdi**'ye ve **Begüm Çakıcı**'ya ve yanımda olup bana hep destek olan **Ali Zeynel Akkaya**'ya teşekkür ederim.

**TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı**'na yüksek lisansıma devam ederken verilen burstan dolayı teşekkürü borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER .....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
RESİM LİSTESİ .....	xv
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
<b>1.ÖZET</b> .....	1
<b>2.SUMMARY</b> .....	2
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	3
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
4.1. G protein bağı reseptörler (GPCR'ler) .....	4
4.2. Asetilkolin reseptörleri.....	7
4.3.Muskarinik reseptörlerin moleküler biyolojisi.....	9
4.4. Muskarinik reseptörlerin yapısal özellikleri.....	11
4.5. Muskarinik reseptör doku dağılımı ve fonksiyonları .....	12
4.6. Muskarinik reseptörlerin adlandırılması .....	15
4.7. Muskarinik reseptörlerin G proteinleri aracılı sinyal iletimi.....	17
4.8.Muskarinik reseptörler ve kanser ilişkisi .....	19
4.9. Muskarinik reseptörler ve lösemi.....	23
4.10. c-fos.....	24
4.11. Epidermal growth faktör .....	26
4.12. K562 hücre soyu .....	30
<b>5. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	30
5.1. Gereçler .....	311



5.1.1. Kimyasal maddeler.....	312
5.1.2. Cihazlar .....	35
5.1.3. Tampon ve çözeltilerin bileşimi.....	36
5.1.4. Elektroforez ve western emdirimi analizlerinde kullanılan çözeltiler.....	38
5.2. Yöntem.....	41
5.2.1. Çalışmada kullanılan hücrelerin hazırlanması ve çoğaltılması.....	41
5.2.2. Hücrelerin toplanması .....	42
5.2.3. İlaç etkileşim deneyleri .....	42
5.3.4. Hücre özütlerinin hazırlanması .....	42
5.3.5. Protein miktar tayini.....	43
5.3.6. SDS-PAGE (Elektroforez).....	43
5.3.7. Islak elektroforetik transfer düzeneği ile elektroforetik transfer.....	43
5.3.8. Western emdirimi analizi .....	43
<b>6. BULGULAR</b> .....	<b>43</b>
6.1. K562 hücrelerinde ERK fosforilasyonuna, karbakol ve EGF'nin Etkisi.....	44
6.2. K562 hücrelerinde c-fos ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi.....	45
6.3. K562 hücrelerinde EGFR ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi .....	46
6.4. K562 hücrelerinin epidermal büyüme faktörü (EGF), muskarinik reseptör agonisti (CCh), ERK (wortmanin) ve EGFR (PD153035) inhibitörleri ile muamelesi .....	47
6.5. K562 hücrelerinde EGFR ekspresyonuna, CCh, 4DAMP, EGF ve/veya EGFR inhibitörünün etkisi .....	48
6.6. K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol, EGF ve wortmaninin etkisi.....	48
6.7. K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin zamana bağlı etkisi .....	49

6.8. K562 hücrelerinde c-fos ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin zamana bağlı etkisi .....	51
6.9. K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin zamana bağlı etkisi .....	52
6.10. K562 hücrelerinde EGFR ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi .....	53
6.11. İstatistiksel Analiz.....	54
<b>7. TARTIŞMA .....</b>	<b>55</b>
<b>8.KAYNAKLAR .....</b>	<b>59</b>
<b>EK-1.....</b>	<b>75</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>78</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER

<b>AC</b>	Adenilat Siklaz
<b>4DAMP</b>	4 Difenil-asetoksi-N metil piperidin methioid
<b><math>\beta</math>-Met</b>	Beta-merkaptolanol
<b>BSA</b>	Bovine serum albümin
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>ERK</b>	Extracellular signal regulated kinase
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>CCh</b>	Karbakol
<b>ChAT</b>	Kolinasetiltransferaz
<b>cAMP</b>	Siklik adenozin monofosfat
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>ERK</b>	Extracellular signal regulated kinase
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>Hepes</b>	N-(2-Hidroksietil)piperazinN-(2- etansülfonikasit)
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltrifosfat
<b>NBT/BCIP</b>	Nitroblutetrazolyum/Bromokloroindol fosfat
<b>MAPK</b>	Mitojenle aktive olan protein kinaz
<b>mAChR</b>	Muskarinik asetilkolin reseptörü
<b>SDS</b>	Sodyumdodesil sülfat

<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol bisfosfat
<b>PKC</b>	Protein Kinaz C
<b>PBS</b>	Fosfat tamponu
<b>PLC</b>	Fosfolipaz C
<b>ACh</b>	Asetilkolin
<b>TEMED</b>	N,N,N',N', Tetrametiletilendiamin
<b>Tris</b>	Trishidroksimetilaminometan
<b>TT-PZR</b>	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>v/v</b>	Hacim/hacim
<b>w/v</b>	Ağırlık/hacim
<b>UV</b>	Ultra Viyole
<b>DAG</b>	Diaçilgliserol
<b>IP<sub>2</sub></b>	Fosfotidil inositol
<b>ChT1</b>	Veziküler taşıyıcı
<b>VACHT</b>	Büyük veziküler taşıyıcı
<b>AChE</b>	Asetilkolinesteraz
<b>BChE</b>	Bütirilkolinesteraz
<b>GPCR</b>	G -protein kenetli reseptör

## ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 1:** G protein aktivasyon mekanizması.

**Şekil 2:** G proteinleri aracılığı ile adenilat siklaz sinyal ileti yolağı.

**Şekil 3:** Asetilkolinin muskarinik reseptörlerle etkileşimi.

**Şekil 4:** Asetil kolin sentezi ve kolinerjik reseptörlerle etkileşimi.

**Şekil 5:** Muskarinik reseptörlerin doku dağılımları.

**Şekil 6:** Kolinerjik agonist ve antagonistler

**Şekil 7:** Muskarinik reseptörler aracılı sinyal iletimi.

**Şekil 8:** Muskarinik reseptörlerden  $M_1$ ,  $M_3$  ve  $M_5$  aracılı sinyal iletimi.

**Şekil 9:** Muskarinik reseptörlerden  $M_2$  ve  $M_4$  aracılı sinyal iletimi.

**Şekil 10:** Kolon kanserinde EGFR'nin ve muskarinik reseptörlerinin sinyal ileti mekanizmalarının etkileşimi.

**Şekil 11:** EGFR ile GPCR'ların sinyal kaskadlarının etkileşimi.

**Şekil 12:** EGFR ekzonları ve spesifik bölgeleri.

**Şekil 13:** MAP kinaz sinyal ileti yolağı.

**Şekil 14:** K562 hücrelerinde ERK fosforilasyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi.

**Şekil 15:** K562 hücrelerinde c-fos protein ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi.

**Şekil 16 :** K562 hücrelerinde EGFR protein ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi.

**Şekil 17:** K562 hücrelerinde pERK/ERK protein ekspresyonuna, karbakol ve /veya EGF'nin ve/veya PD153035'in etkisi.

**Şekil 18:** K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol, EGF ve wortmaninin zamana bağlı etkisi.

**Şekil 19:** K562 hücrelerinde EGFR ekspresyonuna, CCh, 4DAMP, EGF ve/veya EGFR inhibitörünün etkisi.

**Şekil 20:** K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin zamana bağlı etkisi.

**Şekil 21:** K562 hücrelerinde c-fos ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin zamana bağlı etkisi.

**Şekil 22:** K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin zamana bağlı etkisi.

**Şekil 23:** K562 hücrelerinde 4DAMP'ın pEGFR ve EGFR'ekspresyonuna etkisi.

## RESİM LİSTESİ

**Resim 1:** Muskarinin elde edildiği *Amanita Muscaria* mantarı.



## TABLULAR LİSTESİ

**Tablo 1:** G proteinlerinin özellikleri

**Tablo 2:** M<sub>1</sub> - M<sub>5</sub> muskarinik reseptörlerin yaygın olduğu dokular, doku dağılımları.

**Tablo 3:** Muskarinik reseptörlerin yaygın olduğu dokular

**Tablo 4:** Muskarinik reseptörlerin fizyolojik fonksiyonları.

**Tablo 5:** Muskarinik reseptörlerin kanser ile ilişkisi.





# **İnsan Kronik Miyeloid Eritrolösemi Hücre Soyunda Muskarinik Reseptör Aracılı Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz Aktivasyonunda Epidermal Büyüme Faktör Reseptörünün Rolü**

**Öğrencinin Adı:** Selda Güler

**Danışmanı:** Doç. Dr. Hülya Cabadak

**Anabilim Dalı:** Biyofizik

## **1.ÖZET**

**Amaç:** Muskarinik reseptörler ( $M_1$ - $M_5$ ) G protein kenetli reseptör süper ailesinin üyesidir ve farklı fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynar. Son çalışmalarda muskarinik reseptörlerin hematopoietik hücrelerde hücrel faaliyetlere aracılık ettiği önerilmektedir. Bu çalışmada insan eritrolösemi hücrelerinde Epidermal Growth Faktör reseptörlerinin (EGFR), muskarinik reseptör aracılı mitojenle aktive olan protein kinaz aktivasyonunda, rolünü belirleyebilmek için karbakol ve/veya EGF varlığında ERK, pERK, EGFR, ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda ATTC'den alınmış insan eritrolösemi K562 hücreleri kullanılmıştır. K562 hücreleri 24 saat serumsuz ortamda çoğaltıldıktan sonra kolinerjik agonist karbakol ( $100\mu\text{M}$ ,  $1\text{mM}$ ) veya  $16\text{ nM}$  epidermal büyüme faktörü (EGF) 30 dakika uyarılmıştır. Ayrıca EGFR kinaz inhibitörü PD 153035 ile 5 dakika sonra CCh veya EGF ile 30 dakika muamele edilmiştir. Karbakol veya EGF'nin transkripsiyonel cevabını belirlemek üzere c-fos ekspresyonu belirlenmiştir. Ayrıca kolinerjik reseptörler aracılı ERK aktivasyonunda PI3K'in rolünü belirlemek üzere  $20\mu\text{M}$  PI3K inhibitörü wortmanin ile 10 dakika inkübe edilmiştir.

**Bulgular ve Sonuç:** Muskarinik reseptör aracılı mitojenle aktive olan protein kinaz aktivasyonunda epidermal büyüme faktör reseptörünün rolünü belirlemek üzere, protein ekspresyon deneyleri yapılmıştır. İnsan eritrolösemi hücrelerinde EGFR, pERK, ERK, c-fos ekspresyonu gösterilmiştir. Ancak kolinerjik agonist karbakol ve/veya 4DAMP, EGF'nin ve inhibitörlerin ERK, pERK, c-fos, EGFR protein ekspresyon düzeylerinde değişime neden olmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** Kolinerjik reseptör, karbakol, ERK, c-fos, K562 hücre.

# **The Role Of Epidermal Growth Factor Receptors On Muscarinic Receptor Mediated Activation Of Mitogen-Activated Protein Kinase In Human Chronic Myelogenous Erythroleukemia Cell Line**

**Student's name:** Selda Güler

**Supervisor:** Doç. Dr. Hülya CABADAK

**Department:** Biophysics

## **2. SUMMARY**

**Objective:** Muscarinic receptors ( $M_1$ - $M_5$ ) are a member of the G protein coupled receptor superfamily. These are involved in the regulation of many different physiological processes. In Recent studies suggested that muscarinic receptors in hematopoietic cells have been mediated cellular activities. In this study, to evaluate the role of human epidermal growth factor receptor (EGFR) on muscarinic receptor mediated mitogen activated kinase in erythroleukemia cells , effects of CCh and /or EGF are used , have been detected protein expression of ERK,pERK, c-fos and EGFR.

**Material and method:** In our study, human erythroleukemia K562 cells were obtained from ATCC. K562 cells were incubated with carbachol (100 $\mu$ M,1 $\mu$ M) or EGF (16nM) for different times. In some experiments, the cells were pretreated with pharmacological inhibitors for different times. Cells were lysed with TE buffer. Protein concentration was measured Lowry method. Expression of EGFR, pERK, ERK and c-fos were determined with western blotting.

**Results and conclusion:** To evaluate the role of human epidermal growth factor receptor (EGFR) on muscarinic receptor mediated mitogen activated kinase in erythroleukemia cells ,protein expression experiment have been made. In this study shown that expression of EGFR, ERK and c-fos were detected on K562 cells. But cholinergic activation of the mAChR's in human erythroleukemia cell have not changed expression of EGFR, ERK and c-fos protein levels.

**Keywords:** Cholinergic receptor, carbachol, ERK, c-fos, K562 cell

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

G protein kenetli süper ailesinden olan muskarinik reseptörler ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  ve  $M_5$  olmak üzere birçok fizyolojik işlemin düzenlenmesinde rol oynarlar (Alberts ve ark., 1994). Muskarinik asetilkolin reseptörleri çeşitli doku ve hücrelerde eksprese olmaktadır. Son çalışmalar muskarinik reseptörlerin hematopoietik hücrelerde fonksiyonel olarak hücrel faaliyetlere aracılık ettiği ve farklı kanser hücrelerinde muskarinik reseptörler ve epidermal büyüme faktör reseptörleri arasında etkileşimler olduğu belirtilmektedir (Felder , 1995). Moleküler klonlama çalışmaları ile muskarinik reseptörlerin ( $M_1$ - $M_5$ ), beş alt tipinin olduğu gösterilmiştir.

Daha önceki çalışmalar K562 hücrelerinin  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  muskarinik reseptör alt tiplerini eksprese ettiği semi-kantitatif TT-PZR yöntemi ile ve muskarinik reseptörlerin protein düzeyinde ekspresyonunu ise  $M_2$ ,  $M_3$  ve  $M_4$  alt tiplerine özgün antikor kullanarak Western emdirimi yöntemi ile gösterilmiştir (Cabadak ve ark., 2009). K562 hücrelerinde muskarinik reseptörler aracılı NO, cAMP,  $Ca^{+2}$  ölçüm deneyleri ile fonksiyonel olduğu gösterilmiştir. Reseptörlerin farmakolojisi ve yapısı araştırılmıştır. Bu reseptörlerin uyarılması ile PI hidrolizi, cAMP, cGMP,  $Ca^{+2}$  ikincil k sistemlerinin etkinliği farklı araştırmalarla gösterilmiştir (Hulme ve ark., 1990; Buckley, 1989; Birdsall, 1990).

Bu çalışmada insan eritrolösemi hücrelerinde Epidermal Growth Faktör reseptörlerinin (EGFR) muskarinik reseptör aracılı mitojenle aktive olan protein kinaz aktivasyonunda rolünü belirleyebilmek için kolinerjik agonist karbakol ve/veya EGF, inhibitörler varlığında ERK, pERK, EGFR, c-fos ekspresyon düzeyleri belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. G Protein Bağlı Reseptörler

G protein kenetli reseptörler (GPCR'ler), plazma zar reseptörlerinin en büyük ailelerindedir. GPCR'ler çeşitli hücre içi sinyal yollarında rol oynar ve farklı fonksiyonları düzenlemektedirler. Bu fonksiyonlar arasında damar gevşemesi, kalp atım hızı, görme, koku duyusunun düzenlenmesi sayılabilir (Kamoto ve ark., 2015). İnsan genomu dizi homolojisine dayalı olarak üç ana sınıf halinde (A-C) gruplandırılmış yaklaşık 800 GPCR vardır. GPCR'lar ilaç hedefleridir (Pierce ve ark., 2002). GPCR'ler, altı sınıfa ayrılmıştır rodopsin benzeri serpentin reseptör ailesi, metabotropik glutamat/feromon reseptörleri, cAMP reseptörleri ve sınıf A / rodopsin ailesi olmak üzere farklı reseptör alt tipleri vardır (Wessler ve Kirkpatrick, 2008; Klapproth ve Reinheimer, 1997).

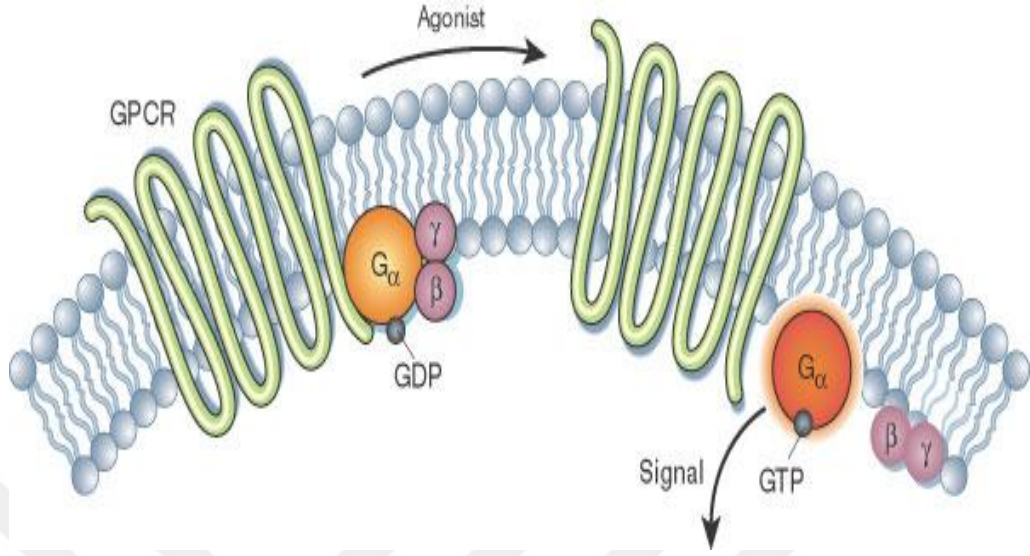
Muskarinik reseptör ailesinin  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  ve  $M_5$  reseptör alttipleri vardır. Etkileştikleri G protein tipine göre farklı sinyal yollarını aktive etmektedirler.  $M_1$ ,  $M_3$  ve  $M_5$  reseptör alttipleri ise öncelikli olarak G proteinlerinin  $\alpha_q/11$  altbirimlerine bağlanırken,  $M_2$  ve  $M_4$  reseptör alttipleri ise G proteinlerinin  $\alpha_i/o$  altbirimlerine bağlanmaktadır (Nathanson., 2000; Eglen ve ark., 1996). G proteinleri, reseptörle efektörler arasında aracılık yapmaktadırlar. G proteinlerinin özellikleri Tablo 1' de gösterilmiştir.

Trimerik, GTP-GDP bağlayan proteinler

- 3 alt ünite;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  alt üniteleri (heterotrimerik)
- $\alpha$  alt birimine GTP ve GDP bağlar.
- Dinlenme halinde;  $\beta$  ve  $\gamma$  ile birlikte ve GDP bağlar
- Aktif halde; GTP bağlar,  $\alpha$  alt birimi  $\beta$   $\gamma$ 'dan ayrılır.

**Tablo 1:** G proteinlerinin özellikleri.(Guerra ve ark., 2014).(Alış Tarihi: 28.05.2016)

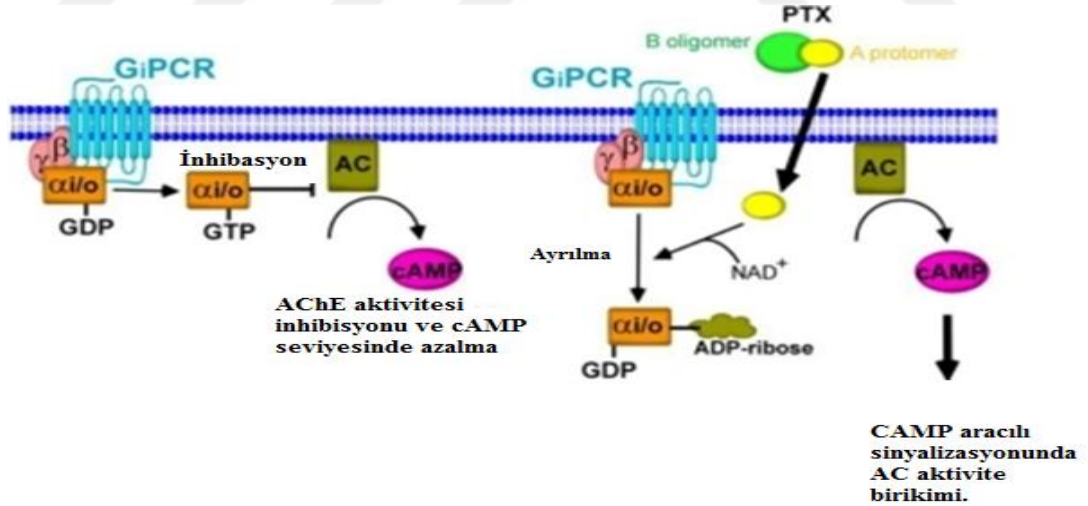
G protein aktivasyon mekanizması Şekil 1’de gösterilmiştir.



**Şekil 1:** G protein aktivasyon mekanizması

[http://www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/14673543/U4.cp2.1\\_nature01307-f1.2.jpg](http://www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/14673543/U4.cp2.1_nature01307-f1.2.jpg) (Alış Tarihi: 11.06. 2016).

G proteinleri aracılı adenilat siklazın aktivasyonu ve inhibisyon yolağı Şekil 2’ de gösterilmiştir.



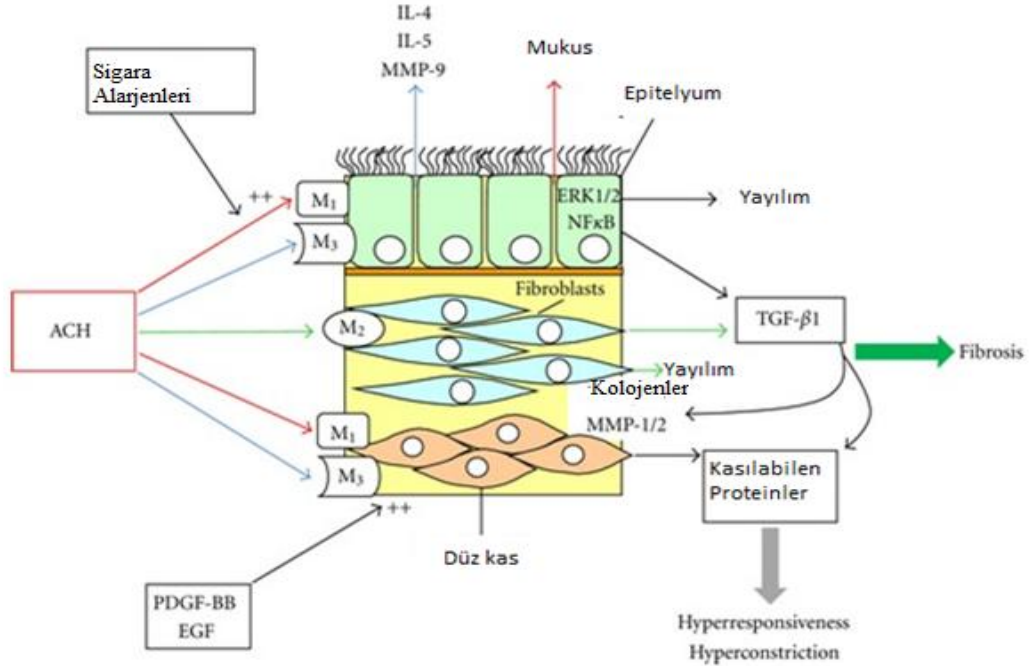
**Şekil 2:** G proteinleri aracılığı ile adenilat siklaz sinyal ileti yolağı.

[https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/65/3202852/PMC3202852\\_toxins-03-00884-g003.png](https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/65/3202852/PMC3202852_toxins-03-00884-g003.png) (Alış Tarihi: 12.06.2016).

Ek olarak, G protein bağı sinyal iletisi çok sayıda G protein alt biriminin varlığı nedeniyle karmaşıklaşır. Farklı G proteinleri ile farklı sinyal kaskadları uyarılabilir. Günümüze kadar, 27  $G\alpha$ , 5  $G\beta$  ve 14  $G\gamma$  alt birimi belirlenmiştir.(Albert ve ark., 2002; Guerra ve ark., 2014). GPCR faaliyetlerini düzenleyen iki protein ailesi: GPCR kinazlar (GRKs) ve  $\beta$ -arrestinlerdir (Heitzler ve ark., 2009; Cattaneo, 2014). GPCR sinyal yolağında  $\beta$ -arrestinler, GRK'lar aracılığıyla fosforilasyona neden olur Fosforillenen GPCR'lar desensitize olur. Ayrıca GPCR G proteinleri bağımsız sinyal kaskadlarını etkinleştirmektedir (Pierce ve ark., 2002). GPCR'ler, zarı yedi kez kateden heliksler ile tek alt birimli zar proteinleridir. Reseptörün hücre dışı ilmekleri iki korunmuş sistein kalıntısına sahiptir, bu iki sistein kalıntısı reseptörün yapısını stabilize eden disülfür bağları ile bağlanırlar. GPCR'ler heterotrimerik G proteinleri aracılığıyla etkilerini gösterirler. Heterotrimerik G-proteinleri  $G\alpha$ ,  $G\beta$  ve  $G\gamma$  alt-birimlerini içermektedir (Crespo ve ark., 1994; Costo ve ark., 1996; Hawes ve ark., 1996; Clapham ve Neer., 1997). Ligandın GPCR'e bağlanması ile G proteinlerinin  $G\alpha$  ve  $G\beta\gamma$  alt birimlerinin ayrılmasını uyarır. GTP'nin  $G\alpha$ ' a alt birimine bağlanması ile G proteini aktive olur. GTP-bağı  $G\alpha$ , fosfolipaz C ve adenilat siklaz gibi birçok enzim aktivitesini uyarmaktadır. Bu hücre içi ikinci haberciler çeşitli hücre fonksiyonlarını düzenlemektedir. Muskarinik reseptörler farklı G proteinleri kenetlenerek fosfolipaz C, A2 ve D'nin uyarılması, cAMP yıkımı, cAMP sentezinde artışa ve birçok iyon kanalını düzenlemektedir (Felder., 1995; Hosey 1992). Tek bir muskarinik reseptörün hücre içindeki farklı G protein tiplerini aktive ederek hücrenin birden çok efektörle kenetlenmesine neden olmaktadır. Birden fazla efektörün etkinleşmesi sinyal iletimindeki çeşitliliği ve karmaşayı açıklar (Felder., 1995; Hosey., 1992; Eglén ve Nahorski., 2000).

## 4.2. Asetilkolin Reseptörleri

Asetilkolin (ACh), klasik bir nörotransmitterdir, nöronal ve nöronal olmayan çeşitli hücrelerde gösterilmiştir. Asetilkolin nöronal olmayan hücrelerde hücre iletişimine aracı olarak rol oynamaktadır. Asetilkolin ilk defa 1913 yılında Sir Henry Dale ve Arthur Erwins tarafından keşfedildi, ardından 1920 yılında Otto Loewi nörotransmitter olarak karakterize etmiştir (Tansey ve Henry., 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalar nöronal olmayan kolinerjik sistemin önemini ortaya koymuştur (Kawashima ve Fujii 2004, 2008; Wessler ve Kirkpatrick., 2012). Örneğin göz hücreleri de dâhil olmak üzere; korneal epitelyumda (epitel mukozanın dış tabakası) ve endotel hücrelerde bulunur. Asetilkolinin hücre iskeletinin yenilenmesi, hücre çoğalması, farklılaşma ve programlı hücre ölümü (apoptoz) gibi yaygın fizyolojik etkileri vardır. Asetilkolin merkezi ve periferel sinir sistemine etki eden klasik bir nörotransmitterdir (Grando ve ark., 1997, 2000; Kawashima ve Fujii., 2000). Asetilkolinin muskarinik reseptörlerle etkileşimi aşağıdaki Şekil 3’ de gösterilmiştir.



**Şekil 3 :** Asetilkolinin muskarinik reseptörlerle etkileşimi.

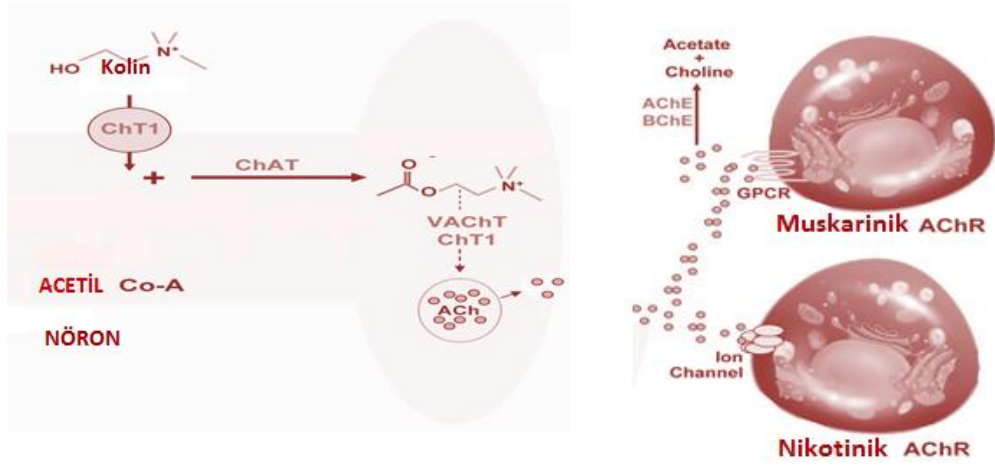
<http://www.hindawi.com/journals/mi/2012/409580/fig3/>

Muskarinik reseptörler, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde de bulunur. ACh ve kolinasetiltransferaz (ChAT): keratinositler, epitel ve endotelial hücreler, tendonlar ve çeşitli bağışıklık sistemi hücreleri gibi nöronal olmayan insan hücrelerinde bulunmuştur (Grando 1997; Grando ve ark., 1993; Grando ve ark., 2003).

Omurgalılarda, asetilkoline özgün iki tip reseptör bulunmaktadır. Bunlar nikotinik ve muskarinik reseptörlerdir. Nikotinik reseptörler katyon kanalları , muskarinik reseptörler ise G protein kenetli reseptörlerdir (Caulfield ve Birdsall, 1998; Lindstrom, 2003). Nikotinik reseptörler, kas sinir kavşaklarında bulunmaktadır. Muskarinik reseptörlere aracılık eden asetilkolin parasempatik gangliayı harekete geçirmektedir. İki tip asetil kolin reseptöründe hem nöronal hemde nöronal olmayan hücrelerde etkilidirler (Wickman ve Krapivinsky., 1999). Nikotinik reseptörler ve muskarinik reseptörler nöronal olmayan hücre tiplerinde de eksprese olmaktadır (Wessler ve Kirkpatrick., 1998). Asetilkolin reseptörlerinin aktive olması ile mitojenle etkinleşen protein kinazlarının (MAPK) aktive olduğu belirlenmiştir. Farklı hücrelerde asetilkolin sinyal ileti yolağı aracılığıyla MAP kinazlarının (Erk 1/2) aktifleşmesi Erk 1/2'nin fosforilasyonuna, DNA sentezine ve hücre çoğalmasına neden olmaktadır (Caulfield ve Birdsall., 1998; Lindstrom., 2003).

Muskarinik reseptörler 50–70 kDa molekül ağırlığında glikoproteinlerdir. Bu reseptörler farklı sinyal ileti yollarını uyarabilir (Alberts ve ark., 2008; Bonner ve ark., 1987; Bonner., 1989; Felder.,1995). Örneğin, muskarinik reseptörlerin aktivasyonu Gi ailesi proteinlerinin  $\beta\gamma$  altbirimleri aracılığı ile içeriye doğrultucu N ve P/Q tip potasyum kanallarının inhibe olmasına yol açar (Lopez-Ilasaca ve ark., 1997). Kolin asetiltransferaz (ChAT), kolin ve asetil-CoA dan ACh sentezini katalize eder. ACh, hücre zarı ile vesiküllerin füzyonunun ardından sinir hücreleri arasındaki boşluğa taşınır. Asetilkolin, muskarinik veya nikotinik kolinerjik reseptörlere bağlanır. Salınan ACh kolinesterazlar ile hızla kolin, asetat ve su'ya hidrolize olur. Nöronal asetil kolin sentezi, salınımı, yıkımı ve muskarinik reseptörlerle ve nikotinik reseptörlerle etkileşimi Şekil 4'de gösterilmiştir (Kawashima ve Fujii., 2000).





**Şekil 4:** Asetil kolin sentezi ve kolinerjik reseptörlerle etkileşimi.

ChT1, veziküler taşıyıcı olarak işlev görür; VAcHT, büyük veziküler taşıyıcı; AChE, asetilkolinesteraz; BChE, bütirikolinesteraz; GPCR, G-protein kenetli reseptör <http://ajpcell.physiology.org/content/296/2/C221.short#F2>. Alış Tarihi; (03.06.2016).

Muskarinik reseptör agonisti muskarin amanita muscaria'dan, nikotin ise tütün bitkisi olan nicotina tabacum'dan elde edilmiştir (Föye ve ark., 1998). Muskarinin elde edildiği amanita muscaria Resmi 1'de gösterilmiştir.



**Resim 1:** Muskarinin elde edildiği Amanita muscaria mantarı.

([https://yandex.com.tr/gorsel/search?p=3&text=Muskarinik%20resept%C3%B6r%20agonisti%20Muscarin%20amanita%20muscaridan%20elde%20edilmi%C5%9Ftir&img\\_url=http%3A%2F%2Ftechandall.com%2Fstockphotos%2Fphotos%2Famanita-muscaria-dangerous-fly-agaric-2443.jpg&pos=113&rpt=simage](https://yandex.com.tr/gorsel/search?p=3&text=Muskarinik%20resept%C3%B6r%20agonisti%20Muscarin%20amanita%20muscaridan%20elde%20edilmi%C5%9Ftir&img_url=http%3A%2F%2Ftechandall.com%2Fstockphotos%2Fphotos%2Famanita-muscaria-dangerous-fly-agaric-2443.jpg&pos=113&rpt=simage))(Alış Tarihi: 02/06/2016).

### 4.3. Muskarinik Reseptörlerin Moleküler Biyolojisi

Muskarinik reseptörler G protein kenetli reseptör ailesinden rodopsin benzeri üst ailesine ait olup zarı yedi kez kateden, hücre içi ve hücre dışı ilmekleri olan glikoproteinlerdir. Muskarinik reseptörler G proteinleri ile etkileşerek hücre içi cevapları başlatmaktadırlar. (Caulfield ve ark., 1988; Hirota 2001; Hulme ve ark., 1990).

ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü ve Ulusal Tıp Kütüphanesi Moleküler klonlama çalışmalarıyla beş insan muskarinik reseptör alt tiplerinin özgün 5 farklı intronsuz gen tarafından kodlandığını açıklamıştır. Muskarinik reseptör gen dizileri bu büyük süper ailenin diğer üyeleriyle anlamlı homolojilere sahiptir (Felder.,1995; Hosey., 1992).  $M_1$  ve  $M_2$  genlerini klonlamışlardır. (Kubo ve ark., 1986).  $M_3$ ,  $M_4$ , and  $M_5$  genleri daha sonra keşfedilmiştir (Bonner ve ark., 1986; Bonner ve Young., 1987). Omurgalılarda klonlanan muskarinik reseptör genleri intronsuz, ve memeli türleri arasında benzerdir. (Hall ve ark., 1987; Eglen ve ark., 1996; Peralta ve Ashkenazi., 1987).

Muskarinik reseptörlerin kromozomal lokalizasyonları, insan  $M_1$  geni kromozom 11 q13 de,  $M_2$  geni kromozom 7q31-35,  $M_3$  geni kromozom 1q-43'te,  $M_4$  geni kromozom 11q12-112,  $M_5$  geni ise kromozom 15q26 'da belirlenmiştir (Peralta ve ark., 1987; Bonner ve ark., 1988).

Muskarinik agonistler aracılığıyla  $M_3$  reseptörleri solunum yollarında enflamatuvar etkiye neden olurken  $M_1$  ve  $M_5$  reseptörleri ise bağışıklık sistemi hücrelerinde farklı yanıtlara aracılık etmektedir. Muskarinik reseptörler hücre çoğalması, farklılaşmasında , fibroblastlar dahil farklı hücre tiplerinde ve kanserli hücrelerin hayatta kalmasında rolü vardır (Jones ark., 1991). Nöronal olmayan ACh parasempatik sistemle innerve olan dokularda ve innerve olmayan dokularda  $M_1$ ,  $M_3$  ve  $M_4$  muskarinik reseptörleri aracılı etkileri tespit edilmiştir. Muskarinik reseptörlerin aktivasyonu, aynı zamanda, bağışıklık sistemi ve epitel hücrelerden sitokin salınmasına ve inflamasyonda artışa neden olmaktadır (Kawashima ve ark., 2012; Kistemaker ve ark., 2012).

#### 4.4. Muskarinik Reseptörlerin Yapısal Özellikleri

Günümüze kadar beş farklı gen tarafından şifrelenen ve  $M_1$ - $M_5$  olarak gösterilen muskarinik reseptörlerin beş farklı alt tipi keşfedilmiştir (Felder 1995 ve ark., 1998; Lindstrom, 2003). Omurgalılarda her bir muskarinik reseptör alt tipi türler arasında dizi ve yapı homolojisi göstermektedir. Reseptörler arası farklılıklar hidrofilik özellikteki bölgelerde, amino ve karboksil uçlarında belirlenmiştir (Felder, 1995).  $M_1$  ve  $M_5$  reseptörleri arasında değişen 147 aminoasit vardır (Wess., 1998). Muskarinik reseptör  $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_5$  alttipleri arasında i3 bölgesi,  $M_2$  ve  $M_4$  reseptörlerine göre birbirlerine daha fazla benzerlik göstermektedir (Chen ve ark., 1995; De Petris ve ark., 1995).

Muskarinik reseptör alt tipleri birbirine çok benzer yapıları olduklarından ancak farmakolojik özelliklerine göre ayırt edilebilirler. Farklı türlerdeki farklı aminoasit dizisi, farmakolojik özelliklerde önemli ayrıtlara neden olabilir. Her bir reseptör farklı farmakolojik ve moleküler özelliklere sahiptir (Chang ve ark., 2001). Herbir muskarinik reseptör alt tipinin zarı yedi kez kat eden ilmeklerinde çok yüksek benzerlik gösterirken, üç hücre içi ve üç hücre dışındaki ilmekler daha az benzerlik göstermektedir (Hulme ve ark., 1990, 1991, 2003). Muskarinik reseptörlerin yedi hidrofobik zarı kateden ilmekleri yaklaşık yüzde 66 benzerlikle çok iyi korunmuştur. Zarı yedi kez kat eden bölgeler helikal yapıda olup çok sayıda hidrofobik amino asit içermektedir (Kubo ve ark., 1986; Bonner ve ark., 1987, 1988; Peralta ve ark., 1987; Bonner, 1989).

Reseptörün hücre içi domainleri daha az korunmuştur. Reseptörün ligand bağlanma bölgeleri ve hücre içi üçüncü ilmeği değişkendir. Muskarinik reseptörler beşinci ve altıncı zarı kateden bölgeleri arasında, büyük intrasitoplazmik ilmek bu farklı alt tipler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu bölgenin G protein kenetlenmesinde seçicilikte önemli olduğu düşünülmektedir (Levey ve ark., 1991; Hirota., 2001; Kostenis ve ark., 1998; Lodish ve ark., 2000; Nathanson ve ark., 2001). Muskarinik reseptörlerin G proteinleri ile etkileşimine neden olan üçüncü stoplazmik ilmekte DRY motifi vardır ve amino ucu canlılar arasında korunmuştur (Brann ve ark., 1989, 1998).

#### 4.5. Muskarinik Reseptör Doku Dağılımı ve Fonksiyonları

Muskarinik reseptörler merkezi ve periferel sinir sisteminde eksprese olmaktadır. Tek tek alttiplerin doku lokalizasyonu gibi hücresele dağılımıda farklı olabilir. Muskarinik reseptörlerin doku dağılımları ve fonksiyonları Şekil 5, 6 ve Tablo 2' de gösterilmiştir.

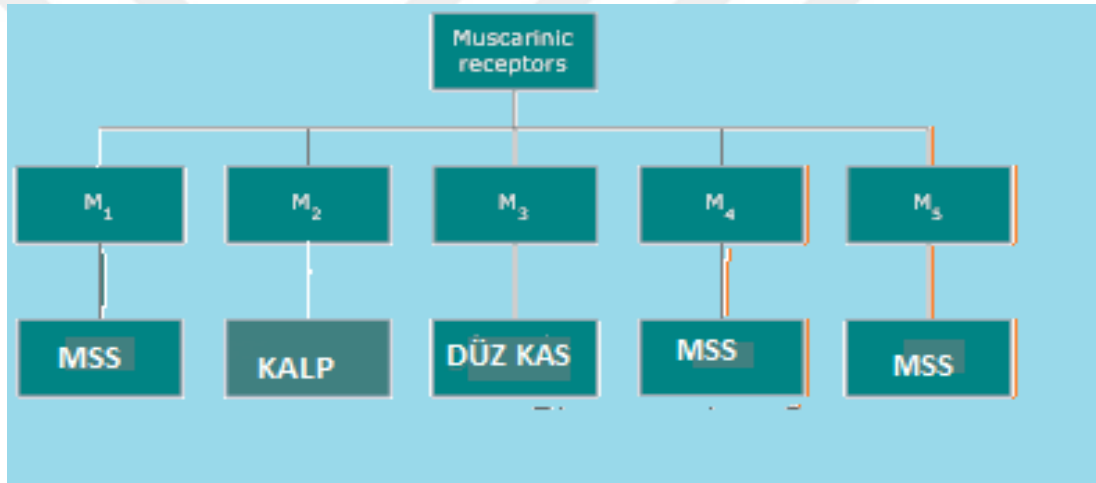
**Tablo 2:** M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub> Muskarinik reseptörlerin yaygın olduğu dokular

M <sub>1</sub> RESEPTÖRÜ :	Muskarinik Reseptörlerden olan M <sub>1</sub> reseptörünün beyinde, serebral korteks, hipokampus ve korpus striatumu içeren ön beyin bölgesinde eksprese olmaktadır(Sorkin ve ark., 1995, 1997).
M <sub>2</sub> RESEPTÖRÜ :	Kalpte, beyincikte, kalp düz kas, sıçan beyin sapında mAChR'lerinin %84'ü M <sub>2</sub> reseptörüdür(Levey ve ark., 1991).
M <sub>3</sub> RESEPTÖRÜ :	Düz kaslarda, dış salgı bezleri, gastrointestinal yollar, düz kas, beyin gibi dokularda m <sub>3</sub> reseptörünün eksprese olduğu gösterilmiştir (Nathanson, 2001).
M <sub>4</sub> RESEPTÖRÜ :	İmmünpresipitasyon çalışmaları ile striatumda, neostriatumda, M <sub>4</sub> lokalizasyonu gösterilmiştir (Yasuda, Cielsa, 1993).
M <sub>5</sub> RESEPTÖRÜ :	Substantia nigra ve ventral tegmental alan gibi orta beyin bölgelerinde çok düşük düzeyde M <sub>5</sub> mRNA ve proteinleri belirlenmiştir, Substantia nigra, striatum, hipokampus, ponsmedulla, serebellumda (Vilaro ve ark., 1990; Yasuda ve Cielsa, 1993). M <sub>5</sub> reseptörünün lenfositlerde, deri fibroblastlarında, iris sfinkter düz kaslarında, özefagusta ve parotid bezinde diğer muskarinik reseptörler ile birlikte yerleşik olduğu gösterilmiştir (Matsui ve ark., 2004).

(Sorkin.; Goh, 2009 Pawson., 1995, 1997; Levey ve ark., 1991; Nathanson., 2001; Yasuda,ve Cielsa., 1993; Vilaro ve Palacios, Mengod., 1990;Yasuda,ve Cielsa W 1993; Matsui,ve ark., 2004).

Muskarinik reseptörlerini eksprese eden hücreler vücudun her tarafında bulunurlar. Örneğin bu hücreler solunum yolları, deri, bağışıklık sistemi, mesane, üreme organları, damar endotel hücreleri, bağ doku, kas ve hatta tendon epitel tabakasında yer almaktadır (Eglen 2006, 2012; Hirota 2001; Kostenis ve ark., 1998; Lodish ve ark., 2000; Nathanson., 2001). Muskarinik reseptörlerin yaygın olduğu dokular Tablo 3’de gösterilmiştir.

**Tablo 3:** Muskarinik reseptörlerin yaygın olduğu dokular



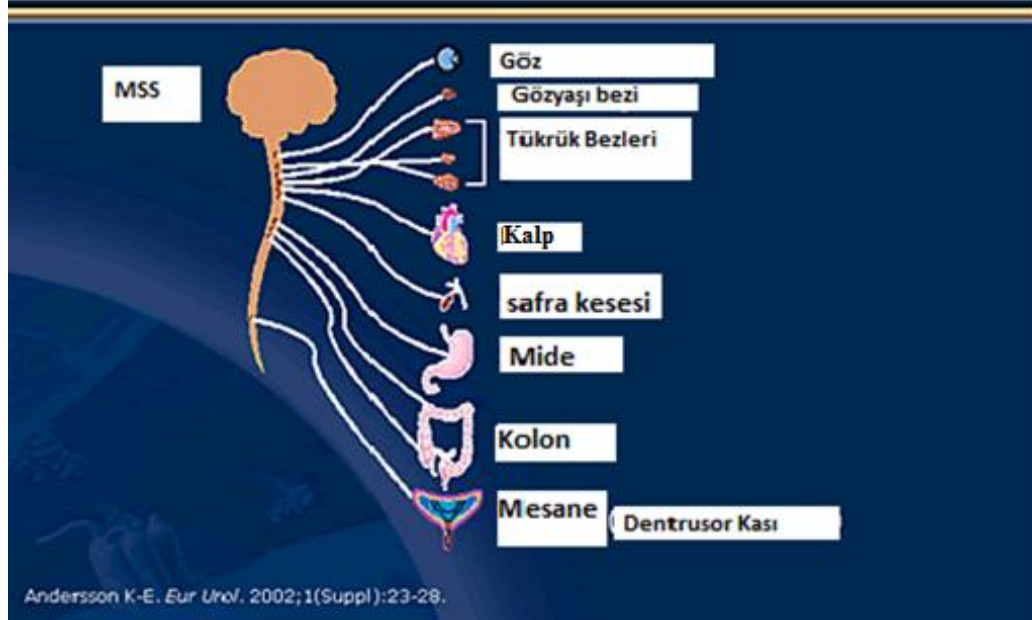
<http://pharmacologycorner.com/acetylcholine-receptors-muscarinic-and-nicotinic/>,  
Alış Tarihi: 31 Mayıs 2016).

**M<sub>1</sub>, M<sub>4</sub> and M<sub>5</sub> reseptörleri:** Bu reseptörler, bellek, uyarılma, dikkat ve analjezi gibi karmaşık merkezi sinir sistemi yanıtlarına katılmaktadırlar. M<sub>1</sub> reseptörleri de mide parietal hücreleri ve otonom ganglionlarda da bulunurlar (Flavio ve Argentina, 2014).

**M<sub>2</sub> reseptörleri:** Öncelikle kalpte lokalizedir. M<sub>2</sub> reseptörlerinin aktivasyonu kalp hızının düzenlenmesinde, sinoatriyal ve atriyoventriküler düğümler de iletim hızını azaltmaktadırlar (Flavio ve Argentina, 2014).

**M<sub>3</sub> reseptörleri:** Düz kaslarda ve bronşlarda, mesane, dış salgı bezlerinde lokalizedir. M<sub>3</sub> reseptörlerinin aktivasyonu düz kasların bulunduğu organlarda çeşitli işlevleri vardır (Flavio ve Argentina, 2014).

Muskarinik reseptörlerin doku dağılımları Şekil 5’de gösterilmiştir.



**Şekil 5:** Muskarinik reseptörlerin doku dağılımları.

[https://yandex.com.tr/gorsel/search?text=muscarinic%20receptors%20family&img\\_url=http%3A%2F%2Fimg.medscape.com%2Fslide%2Fmigrated%2Feditorial%2Fmcircle%2F2005%2F4240%2Fimages%2Fmaki%2Fslide002.gif&pos=7&rpt=simage](https://yandex.com.tr/gorsel/search?text=muscarinic%20receptors%20family&img_url=http%3A%2F%2Fimg.medscape.com%2Fslide%2Fmigrated%2Feditorial%2Fmcircle%2F2005%2F4240%2Fimages%2Fmaki%2Fslide002.gif&pos=7&rpt=simage)

Muskarinik reseptörlerin fizyolojik fonksiyonları Tablo 4’ de özetlenmiştir.

**Tablo 4:** Muskarinik reseptörlerin fizyolojik fonksiyonları.

<b>MUSKARİNİK RESEPTÖRLERİN TEMEL FİZYOLOJİK FONKSİYONLARI :</b>
Karaciğer Fonksiyonlarının düzenlenmesinde,
Kalp atış hızının düzenlenmesinde,
Kan damarlarının gevşemesinde,
Düz kasların kasılmasında,
Sekresyonun artmasında,
Motor ve duyu kontrollerinin düzenlenmesinde,
Hafızanın bilgileri kayıt etmesinde,
Öğrenme gibi karmaşık davranışların düzenlenmesinde görevlidirler.

(Eglen 2006, 2012).

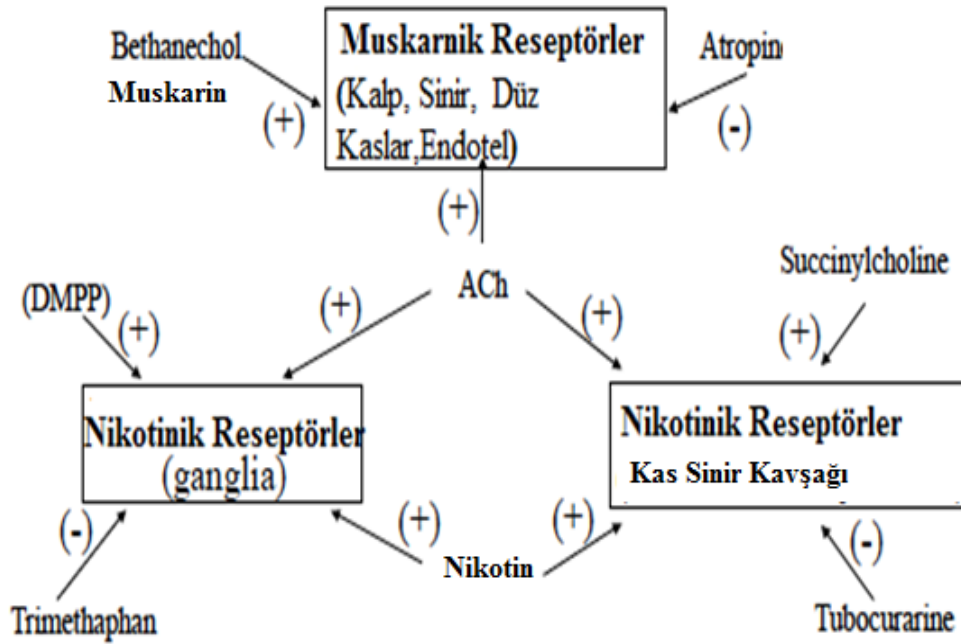
Muskarinik reseptörlerin doğal agonisti olan asetilkolin çeşitli fizyolojik uyarımlara aracılık etmektedirler (Eglen 2006, 2012). İnsan mesanesinde muskarinik reseptör alt tiplerinin oranı  $M_2:M_3$  (3:1) dir ancak mesane kasılmasında  $M_3$  daha fonksiyoneldir (Cross ve ark., 2006, Andersson, ve ark., 2004; Wang, ve ark., 1995).  $M_3$  muskarinik reseptörü tükürük salgısını ve gastrointestinal motiliteyi uyarır  $M_2 > M_3$  (4:1). Öğrenme hafıza gibi ileri düzey bilişsel işlevlerde  $M_1-M_5$  ( $M_3$  seyrek) görev alır. (En fazla  $M_1$ ). İris sfinkter kasılmasını  $M_1-M_5$  ( $M_3$  baskın) olarak kontrol etmektedir (Eglen; 2006, 2012).

#### **4.6. Muskarinik Reseptörlerin Adlandırılması**

Muskarinik reseptörler işlevlerine, yapılarına ve amino asit dizilerine göre adlandırılmıştır. Muskarinik reseptörler alt tiplerine göre farmakolojik terimlerde büyük M ile  $M_1-M_5$  şeklinde isimlendirilmiş olup moleküler sınıflandırmada küçük "m" ile gösterilmiştir. Her bir alt tipi ise  $M_1-M_5$  şeklinde adlandırılmıştır. (Caulfield ve ark., 1998; Scarpero ve ark., 2003; Van Zivieten. ve ark., 1995; Nathanson, 2000). Muskarinik reseptörler  $M_1$  reseptörü için "  $M_1$  mAChR ", "  $m_1$ AChR ", " veya " mAChR<sub>1</sub> " olarak literatürde sembolize edilmektedir. Muskarinik reseptör alt tipleri IUPHAR'e ve MeSHBrowser'a göre,  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  ve  $M_5$  şeklinde ifade edilmiştir (Prenzel ve ark., 1999, Gschwind.;ve Zwick, 2001). 1950-1980 yıllarında muskarinik reseptörlerin farklı genler tarafından kodlandığı ve farklı farmakolojik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Nathanson, 2001; Krejci ve ark., 2004). Farmakolojik olarak muskarinik reseptörlerin özellikleri, agonist ve antagonistlere olan nispi ilginliklerine göre yapılmıştır. Bir antagonist farklı muskarinik reseptörlerin alttipine karşı ilginliği bulunmaktadır (Bonner., 1989; Caulfield ve ark.,1988; Hulme ve ark., 1990). Muskarinik reseptör dağılımı ve parasempatik uyarımında etkilerinin bilinmesinden dolayı muskarinik reseptör etkileşimlerinin sistemler üzerindeki bir çok etkisi önceden tahmin edilebilmektedir (Prenzel ve ark., 1999; Gschwind, 2001).

Muskarinik reseptör ailesi farmakolojik olarak antagonistlere gösterdikleri afinitelere göre M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub> olarak gösterilmişlerdir. M<sub>1</sub> muskarinik reseptörü pirenzepine, AF-DX 116'ya, M<sub>2</sub> muskarinik reseptörünün metoktramine M<sub>3</sub> reseptörünün 4 DAMP'a, M<sub>4</sub> muskarinik reseptörleri için himbasın, seçici antagonist olarak görev yapmaktadırlar (Hirota, 2001). Muskarinik reseptör agonistleri asetilkolinden daha etkilidirler. Muskarinik agonistler iki gruba ayrılır; Birinci grubda asetilkolin, sentetik kolin esterleri, ikinci grubda ise alkaloidler (pilocarpin, muskarin ve arekolin gibi) vardır. Bazı muskarinik ajanlar kolinomimetik aktivite de gösterebilirler (Resende ve ark., 2008; Prenzel ve ark., 1999; Chang 2001). Kolinerjik agonist ve antagonistlerin reseptörlerle etkileşimi Şekil 6' da gösterilmektedir.

## KOLİNERJİK AGONİSTLER VE ANTAGONİSTLER



Şekil 6: Kolinerjik agonist ve antagonistlerin reseptörlerle etkileşimi.

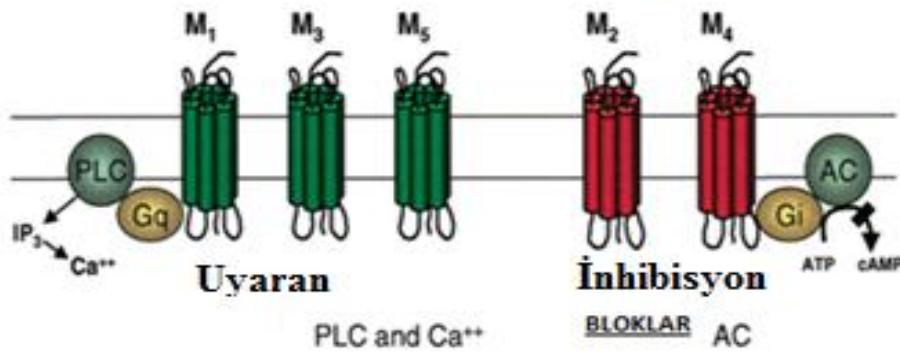
<http://ajpcell.physiology.org/content/296/2/C221.short#F2> Alış Tarihi: (03.05.2016).



#### 4.7. Muskarinik Reseptörlerin G proteinleri Aracılı Sinyal İletimi

Muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChRs) G protein-kenetli reseptör ailesine ait olup merkezi ve periferik sinir sisteminin birçok temel fonksiyonlarını düzenlemektedir. Evcil hayvan dokularında mAChR lerle ilgili az sayıda çalışmalar yapılmıştır (Abraham, 2016). Muskarinik reseptörlerin hücre yüzeyinde ligand bağlama bölgesi, hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde G protein bağlama bölgesi vardır (Bonner, 1989). G-protein kenetli reseptörler (GPCR), ailesine ait olan muskarinik reseptörler en fazla bulunan ve farmakolojik hedef olan plazma zar protein reseptörleridir (Lander ve ark., 2001; Fredriksson ve ark., 2003). Muskarinik reseptörler, G proteinlerine kenetlenmelerine göre iki gruba ayrılırlar; birinci grup, Pertussis toksinine duyarlı Gi/o tipi proteinlere kenetlenen M<sub>2</sub> ve M<sub>4</sub> muskarinik reseptörleri, ikinci grup ise, Gq/11 tipi proteinlere kenetlenen M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> ve M<sub>5</sub> reseptörleridir (Caulfield ve Birdsall, 1998; Felder, 1995; Hosey, 1992).

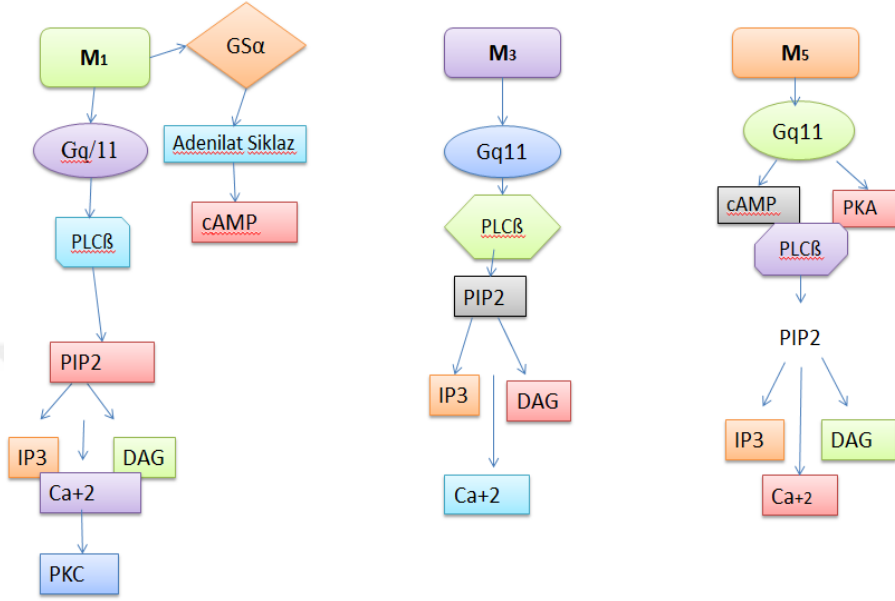
G proteinleri muskarinik reseptörlerle efektörler arasında aracılık yapar, muskarinik ligandlarla reseptörün uyarılması trimerik GTP-GDP bağlayan, 3 alt birimli;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (heterotrimerik) G proteinlerini aktive eder ve,  $\alpha$  alt biriminde GDP, GTP değişimi olur ve alfa alt birimi  $\beta\gamma$ 'dan ayrılır. Farklı alt birimler farklı efektörlerle etkileşirler. (Hosey, 1992). Muskarinik reseptörler aracılı sinyal iletimi Şekil 7' de gösterilmiştir.



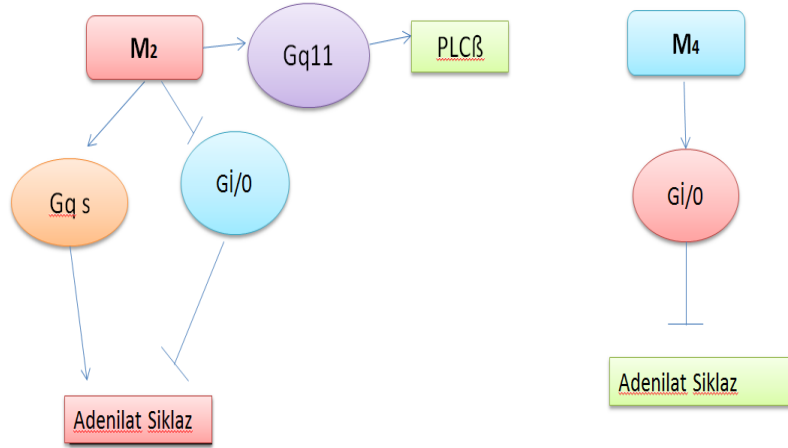
Şekil 7: Muskarinik reseptörler aracılı sinyal iletimi.

[https://yandex.com.tr/gorsel/search?p=2&text=Muskarinik%20resept%C3%B6r%20agonisti%20Muscarin%20amanita%20muscaridan%20elde%20edilmi%C5%9Ftir&img\\_url=http%3A%2F%2Fstack.imgur.com%2FXcRp.jpg&pos=78&rpt=simage](https://yandex.com.tr/gorsel/search?p=2&text=Muskarinik%20resept%C3%B6r%20agonisti%20Muscarin%20amanita%20muscaridan%20elde%20edilmi%C5%9Ftir&img_url=http%3A%2F%2Fstack.imgur.com%2FXcRp.jpg&pos=78&rpt=simage)  
(Alış Tarihi: 29.05. 2016).

Ancak muskarinik reseptörlerin sinyal iletim yolları, diğer tip G proteinleri aracılığı ile farklı sinyal yollarında uyarmaktadır (Nathanson, 2000; van Koppenand, 2003; B. Kaiser, 2003). Muskarinik reseptörler aracılı sinyal iletimi Şekil 8’ de ve 9’da gösterilmiştir.



Şekil 8: Muskarinik reseptörlerden M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> ve M<sub>3</sub> sinyal iletimi.



Şekil 9: Muskarinik reseptörlerden M<sub>2</sub> ve M<sub>4</sub> sinyal iletimi.

(George Karakiulakis ve Michael Roth, 2012 ).

Muskarinik reseptörler G proteinleri aracılığıyla hedef enzimleri aktif hale getirir veya baskılar. Örneğin G<sub>s</sub> adenilat siklazı aktive ederken G<sub>i</sub> adenilat siklazı inhibe etmektedir. Adenilat siklaz aracılığıyla cAMP düzeyi değişmektedir. M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> ve M<sub>5</sub> reseptörleri aracılığıyla fosfotidilinositol 4, 5 bifosfatından, inositol 1, 4, 5 trifosfat (IP<sub>3</sub>) diaçilgliserol (DAG) salınımına neden olur. IP<sub>3</sub> endoplazmik retikulumdan Ca<sup>+2</sup> salınımına, DAG aracılığı ile de protein kinaz C'nin uyarılmasına neden olur (Ukegawa ve ark., 2003). Hücre içi kalsiyum derişimlerinin artması çeşitli olayların uyarılmasını sağlar: Kalmodulin bağımlı protein kinazların aktivasyonu, adenilat siklazın aktivasyonu, fosfodiesterazların aktivasyonu nitrik oksit sentetazın aktivasyonu gibi görevleri vardır (Kusayanagi ve Mitamura., 2003). Muskarinik reseptörler diğer G proteini kenetli reseptörler gibi başka sinyal yollarını örneğin, protoonkogen p21 ras, mitojenle aktive olan protein kinazları ve stresle aktive olan protein kinazları uyarabilir (Ding ve ark., 1998).

#### **4.8.Muskarinik Reseptörler ve Kanser İlişkisi**

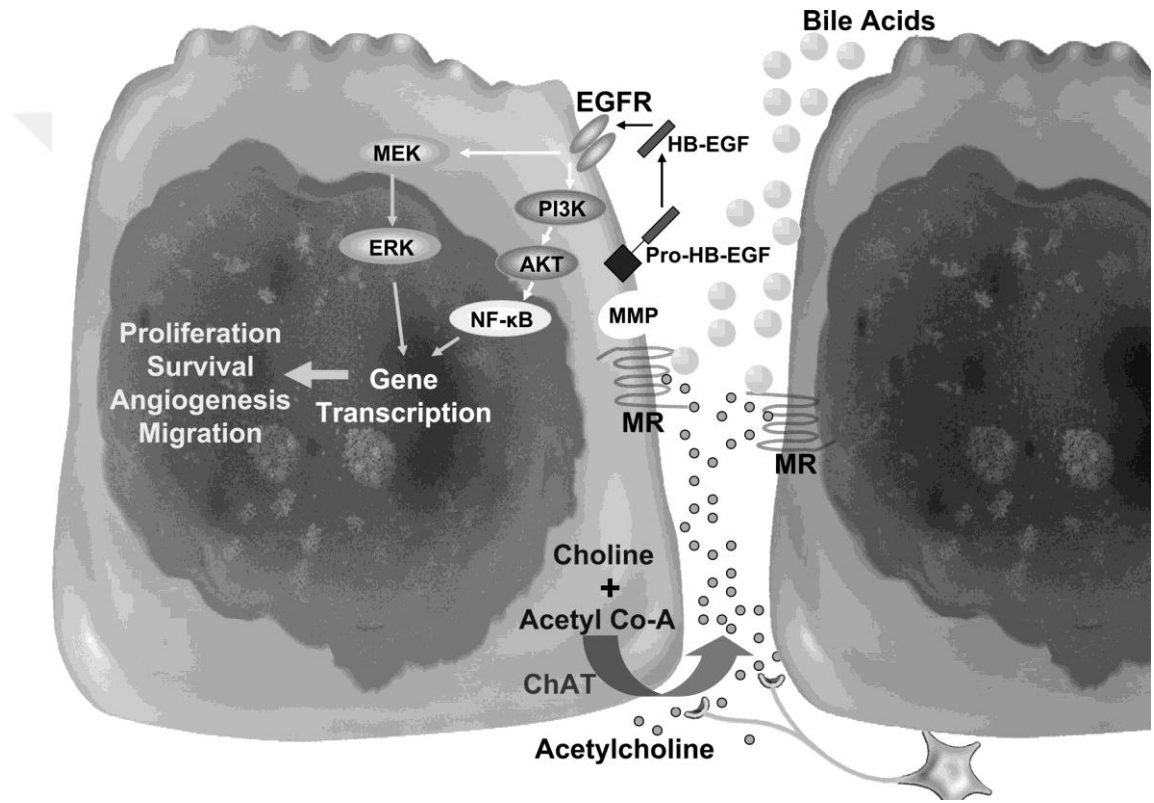
Muskarinik reseptör ekspresyonu beyin, meme, kolon, deri, akciğer ve prostat kanseri dahil olmak üzere bir çok kanserli hücre tiplerinde eksprese olduğu bildirilmiştir. Bu hücre tiplerinde M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, ve/veya M<sub>3</sub> reseptörlerinin aktivasyonu hücre çoğalmasında artışa neden olur, ancak muskarinik reseptör aktivasyonu, hücre siklusunun durdurulmasına da neden olabildiği ve hücre çoğalmasını azalttığı belirtilmektedir (Shah ve ark., 2009). Çalışmalar sonucunda asetilkolinin akciğer kanseri gibi birçok kanser türünde ve çeşitli organlarda kötü huylu tümörlerde eksprese olduğu bulunmuştur. (Song ve ark., 2003; Trombino ve ark., 2004; Feng ve ark., 2012). G-protein kenetli reseptörlerden olan muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR) kolon kanser hücrelerinde eksprese olmakta ve işlevseldir. Bu reseptörlerin rolü büyük ölçüde bilinmemekle birlikte farklı sinyal ileti yolları aracılığıyla hücre büyümesine aracılık ettiği bilinmektedir (Ukegawa ve ark., 2003). Kolinerjik reseptör ailesinden olan muskarinik reseptörler kolon kanserinde hücre çoğalması ve kanser oluşumunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Muskarinik reseptörlerin kanser ile ilişkisi aşağıdaki Tablo 5' de gösterilmiştir.

**Tablo 5:** Muskarinik reseptörlerin kanser ile ilişkisi.

<i>Organ/ Kanser</i>	<i>MR</i>	<i>MR Aktivasyonu</i>	<i>MR Aktivasyonu</i>	<i>MR</i>	<i>Ach</i>	<i>ACH</i>
	<i>MR</i>	<i>Aktivasyonu</i>		<i>Agonisti</i>		<i>yıkımı</i>
<i>Beyin tümörleri</i>	×	<i>Hücre Çoğalması</i>	<i>PKC-ε, PKC-ζ, ERK, NF-κB</i>	×	-	-
<i>Meme kanseri</i>	×	<i>Hücre Çoğalması anjyogenez</i>	<i>PKC-ζ, Src, ERK, PI3K</i>	×	-	-
<i>Kolon Kanseri</i>	×	<i>Hücre Çoğalması Sağkalım</i>	<i>ERK, PI3K, Akt, NF-κB</i>	×	×	-
<i>Akciğer Kanseri</i>						
<i>Küçük Hücreliler</i>	×	<i>Hücre Çoğalması</i>	<i>ERK, Akt</i>	×	×	-
<i>Yumurtalık Kanseri</i>	×	<i>Hücre Çoğalması</i>	<i>Bilinmiyor</i>	-	-	-
<i>Bağırsak Kanseri</i>	×	<i>Hücre Çoğalması</i>	<i>Bilinmiyor</i>	-	-	-
<i>Prostat Kanseri</i>	×	<i>Hücre Çoğalması</i>	<i>Bilinmiyor</i>	×	-	-
<i>Mide Kanseri</i>	×	<i>Bilinmiyor</i>	-	-	-	-
<i>RahimKanseri</i>	×	<i>Bilinmiyor</i>	-	-	-	-
<i>MELENOMA</i>	×	<i>Bilinmiyor</i>	×	-	-	-

[http://ajpcell.physiology.org/content/296/2/C221.short#xref-fn-2-1,](http://ajpcell.physiology.org/content/296/2/C221.short#xref-fn-2-1)

Batı ülkelerinde kanserden ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri kolorektal kanserlerdir. Kolorektal karsinomaların çoğu adenomlardan ortaya çıkmaktadır (Skibber ve ark., 2001). Daha önce muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChRs) nin ERK1/2 yolu aracılığı ile SNU-407 kolon kanseri hücresi çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte EGFR, PKC, ERK ½ ve RSK verileri SUNU 407 kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasında mAChR aracılı aktivasyonun etkisi olduğunu göstermektedir. Kolon Kanserinde EGFR ve muskarinik reseptörlerinin sinyal ileti mekanizmalarının etkileşimi Şekilde 10'da gösterilmiştir.



**Şekil 10:** Kolon kanserinde EGFR ve muskarinik reseptörlerinin sinyal ileti mekanizmalarının etkileşimi

<http://ajpcell.physiology.org/content/ajpcell/296/2/C221/F3.medium.gif>; Alış Tarihi: (21.06.2016).

Kolon kanseri hücrelerinde, nöronlar tarafından üretilen ACh ile birlikte lümen safra asitleri ile muskarinik reseptörlerin aktivasyonu, sırayla, matriks metalloproteinaz (MMP) -7 yoluyla Pro-HB-EGF yi HB-EGF ye çevirir. HB-EGF EGFR'ne bağlanır fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), Akt ve nükleer faktör-kB (NF-KB)'yi uyarır. NF-KB çekirdekte gen transkripsiyonu uyarır. EGF reseptörü (EGFR) MEK aracılığıyla ERK1/2 uyarmakta ve ERK1/2 çekirdekte gen transkripsiyonunu uyarılmaktadır. EGFR reseptörünün uyarılması ile heriki yoldan hücre yaşamı ve hücre çoğalması için gerekli genlerin transkripsiyonunu etkinleştirmektedir. Kolon kanser hücrelerinde G-protein bağlı reseptörlerden olan muskarinik asetilkolin reseptörü (mAChR) eksprese olmakta ve işlevseldir. Bu reseptörlerin rolü büyük ölçüde bilinmemekle birlikte farklı sinyal ileti yolları aracılığıyla hücre büyümesine aracılık ettiği bilinmektedir (Ukegawa ve ark.,2003). Yapılan Araştırmalar M<sub>3</sub>R reseptörünün eksikliğinde M<sub>3</sub> antagonisti skopolamin butilbromür ile bağırsak tümör oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (Raufman ve ark., 2011). İnsan tümörlerinin %30'unda Ras/Raf/MEK/ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur (Kolch, 2000). Muskarinik agonistler ve antagonistleri, farklı kanserleri tedavi etmek için yararlı olabileceği önerilmektedir. Tümör hücrelerinde, protein kinaz sentezinin artması da onkojenik transformasyonda etkili olmaktadır. Örneğin; Erb-B reseptör ailesinde yer alan proteinlerin (örneğin; EGFR, HER2) sentezinin artması akciğer kanseri patogenezi doğrudan etkilemektedir (Hirsch ve ark., 2003). EGF gibi büyüme faktörlerinin pek çok kanser türünün patogeneziinde rol oynadığı önceki yıllarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Sporn ve Roberts, 1987).

#### 4.9. Muskarinik Reseptörler ve Lösemi

Lösemi hücrelerinde muskarinik reseptörler eksprese olmakta ve bu reseptörler ChAT, CrAT ve Ach reseptörleriyle çoğaldığı gösterilmiştir (Fujii ve ark., 1996; Kawashima.,2000). Muskarinik reseptörler hücre çoğalması, farklılaşması ve transformasyonu gibi birçok sistemi uyarabilmekte ve etkiyelebilmektedirler. Bu etkiler ise hücre tipine, reseptörün spesifik alt tiplerine bağlı olarak değişmektedir. Farklı hücre tiplerinde farklı muskarinik reseptör transkriptleri eksprese olmaktadır. (Costa ve ark., 2001; Cabadak ve ark., 2013). Muskarinik reseptörlerin aktivasyonu ile hücre içi kalsiyum, c-fos upregülasyonu artmıştır ve lösemi hücre fonksiyonlarını modüle ettiği gösterilmiştir (Matsui ve ark., 2004). K562 hücre Soyu ile yapılan çalışmalarda M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> ve M<sub>4</sub>, muskarinik reseptör alt tiplerinin gen ve protein ekspresyonu gösterilmiştir. Karbakol serumsuz kültür ortamında hücre çoğalmasını uyarmakta ancak serum varlığında ise hücre çoğalmasını inhibe etmektedir. K562 hücrelerinde muskarinik reseptör aracılı PKC, NO, cAMP, c-fos ve Ca<sup>+2</sup> yolları ile reseptörün fonksiyonel olduğu belirlenmiştir (Cabadak ve ark., 2010-2013). EGFR meme kanseri, glioblastoma gibi kanser türlerinin büyüüp gelişmesinde etkilidirler (Blume ve Jensen ve ark., 2001).

Kronik miyeloid eritrolösemi, miyeloid elemanlarının hücre çoğalması ve adezhif özelliklerinin kaybı ile karakterize edilen bir hematopoietik kök hücre malignitesidir. K562 hücre soyu, Lozzio ve arkadaşları tarafından kronik miyeloid lösemi hastasının blastik kriz evresinde plevra sıvısından geliştirilmiş hücrelerdir. Birçok kanser hücre soyunda muskarinik reseptörlerin hücre çoğalmasında rolü olduğu gösterilmiştir.

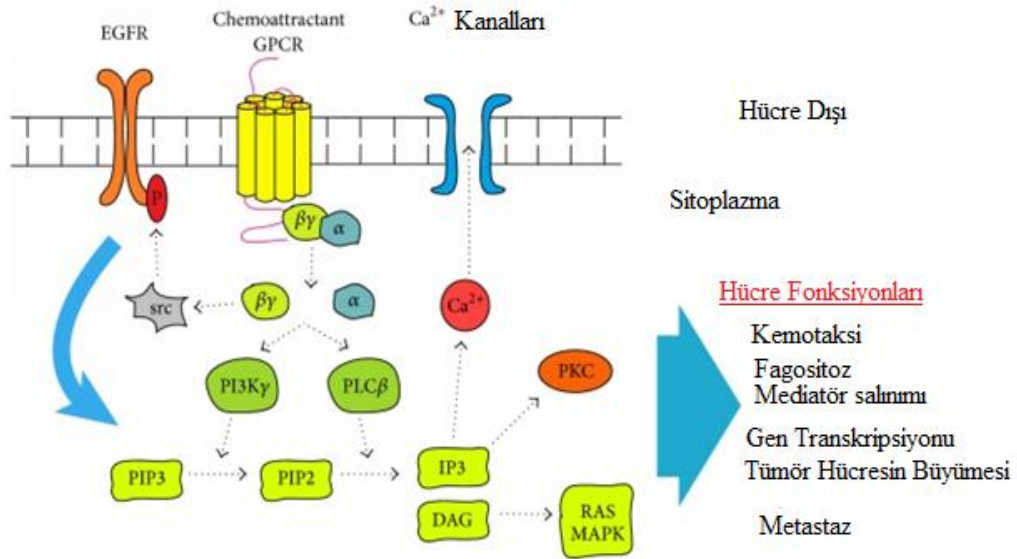
Kanda bulunan asetilkolinin immün sistemin düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (Maslinski, 1989; Kawashima ve Fujii, 2000). Özellikle; immün sistemde rol oynayan insan mononükleer lökositleri ve bazı lösemi hücre hatlarında M<sub>1</sub> ve M<sub>5</sub> transkriptlerinin olduğu gösterilmiştir (Kaneda ve ark., 1993; Tayebati ve ark., 1999; Sato ve ark., 1999).

#### 4.10. c-fos

Fuji ve arkadaşları T ve B hücre soylarında muskarinik asetil kolin reseptörünün uyarımını ve c-fos gen ekspresyonunda artışa neden olduğunu belirlemişlerdir. Muskarinik reseptör aktivasyonu glial hücre soyu 13211N’de Ca düzeyinde, c-fos ve c jun mRNA ve protein düzeylerinde değişime neden olmuştur. Muskarinik uyarım astrositotoma ve nöroblastoma hücrelerindeki farklı hücre soylarında c-fos ekspresyonuna etki etmektedir. Muskarinik reseptör uyarılması nöronal hücre soylarında ve beyin bölgelerinde c-fos ekspresyonunu indüklemektedir (Fujii, Kawashima, 2000; Costa ve ark., 2008; Ibanez ve ark., 2002).

Trejo ve arkadaşları tarafından glial hücre soylarında mAChR’ın aktivasyonu ile protein kinaz C, hücre içi  $Ca^{+2}$  mobilizasyonu, c-fos ve c-jun’un indüklenmesi ne aracı olduğu bildirilmiştir (Shah ve ark., 2009; Trejo ve Brown, 1991; Ding ve ark., 1998).

EGFR leri ile GPCR ‘ların sinyal kaskadlarının etkileşimi Şekil 11’ da gösterilmiştir.



**Şekil 11:** EGFR ile GPCR ‘ların sinyal kaskadlarının etkileşimi

(Peralta ve ark., 1987).

Şekil 11’de ligandların GPCR’a bağlanmasıyla G proteinlerinin α ve βγ altbirimleri aktifleşmekte ve bu uyarım sonucunda βγ src’yi uyarmakta ve src EGFR’de fosforillasyona neden olmaktadır. Fosforillenmiş EGRF’de PIP3’ü



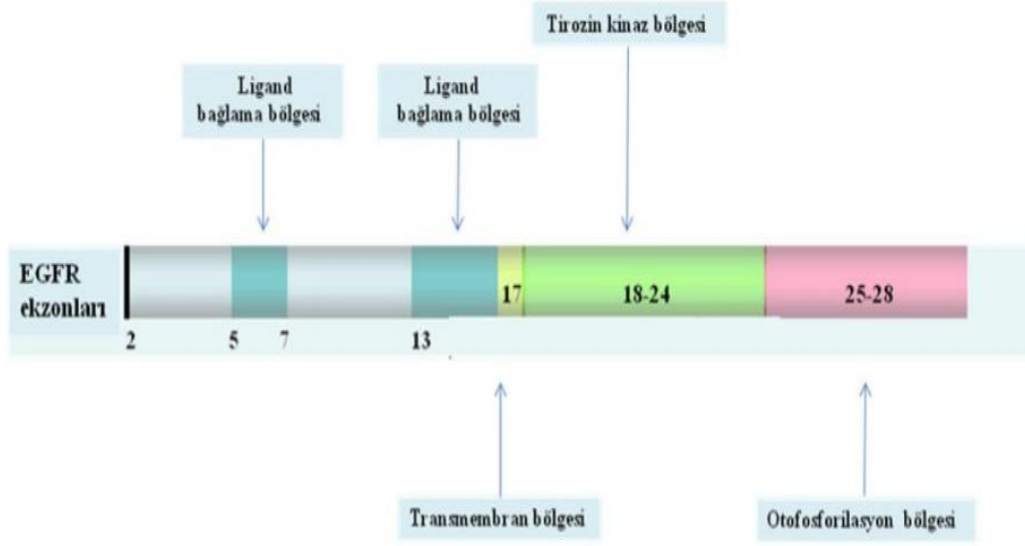
aktifleştirip  $PIP_2$ 'den  $IP_3$  ve DAG oluşumuna neden olur.  $IP_3$  hücre içi depolardan  $Ca^{+2}$  salınımına ve PKC' nin aktivasyonuna neden olur.  $Ca^{+2}$  kalsiyum kanallarını açar ve DAG ise RAS, MAPK yolağını aktive eder. Hem PKC hemde DAG kemotaksis, fagositoz, mediatör salınımı, gen transkripsiyonu, tümör hücrelerinin büyümesi ve metastaz gibi hücre faaliyetlerine neden olmaktadır. Fosfolipaz C'nin aktivasyonu ise  $PIP_2$ 'yi hidroliz etmesi ile DAG ve  $IP_3$  oluşur  $IP_3$  Protein kinaz aktifleştirmektedir. Ayrıca,  $IP_3$  hücre içi  $Ca^{+2}$  depolarından  $Ca^{+2}$  salınmasını uyarır.  $IP_3$  ER'deki ligand kapılı Ca kanalına bağlanır ve  $Ca^{2+}$  salınır. Muskarinik reseptörlerde diğer G proteini kenetli reseptörler gibi protoonkogen p21 ras, mitojenle aktive olan protein kinazları ve stersle aktive olan protein kinazları da uyarmaktadır (Billington ve ark., 2002).

#### 4.11. EGFR

EGF'yi 1962'de Dr. Stanley Cohen, erkek fare submandibular tükürük bezinden izole etmiştir. Dr. Stanley Cohen erkek fare submandibular tükürük bezlerinde Sinir Büyüme Faktörü olan (NGF)'yi izole etmeye çalışırken bu bezlerden elde ettiği ekstraları genç farelere enjekte etmiş ve bu ekstrenin erken diş çıkmasına, erken göz kapağının açılmasına sebep olmasından dolayı bu etkin maddeyi izole etmiştir. Epidermiste hızlandırıcı etkisi nedeniyle Epidermal Growth Factor (EGF) adını vermiştir (Cohen, 1962).

Epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) ailesi, sinyal yollarında aktivasyona sebep olmaktadır. Ligandın reseptöre bağlanmasıyla aktive olduğunda hücre çoğalması, farklılaşma ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Normal hücrenin gelişiminde rol alan bu reseptörler birçok kanserde aktive olduğu ve eksprese olduğu gösterilmiştir. Tirozin kinaz ailesine üye olan zarı kateden protein ailesidir (Krause, 2005). Bu reseptör ailesinde birçok genetik değişimler olmuş ve pek çok kanser türünde gösterilmiştir. Ligandların tanımlanmasını ve bağlanmasına sebep olan bir ekstraselüler altbirimdir. Hidrofobik özelliği olan zarı kateden bölümü birçok reseptörle ilişkileri sağlamaktadır. EGFR geninin 18. ve 24. eksonlarda kodlanan intraselüler altbiriminin protein tirozin kinaz aktivitesi vardır (Miller, 2008).

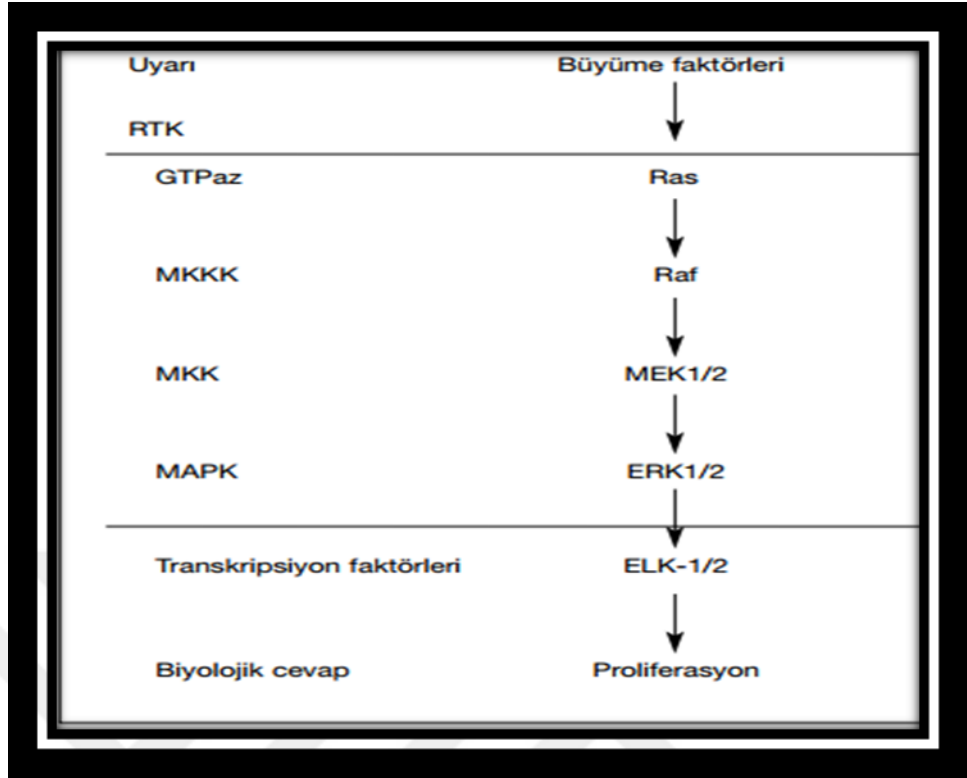
EGF, farklılaşma, büyüme gibi fonksiyonları etkilemekte ve organizmanın gelişiminde de büyük rol oynamaktadır. EGF, hücrelerde iyon alınması, glikolizis, DNA, RNA'da protein yapımında uyarıcı olarak görev yapmaktadır (Nave ve ark., 1985; Pratt ve ark., 1987). EGFR geni ise, 7p12 kromozomunda lokalize olmuş ve 28 eksondan oluşmaktadır. EGFR, EGFR geniyle sentezlenmiş 1186 aminoasitten oluşan 170 kDa büyüklüğünde 24 transmembrandan oluşan glikoproteindir. EGFR'nin ekzonları ve spesifik bölgeleri aşağıda Şekil 12'da gösterilmiştir.



**Şekil 12:** EGFR ekzonları ve spesifik bölgeleri.

(Ferguson ve ark., 2003; Yarden 2001; Burgess ve ark., 2003; Capuzzo., 2007).

Klinik çalışmalar, EGFR ekspresyonundaki artış ile birlikte tümör gelişimi arasında çok güçlü bir ilişki olduğu göstermiştir. Bazı vakalarda EGFR düzeylerinin biraz değişiminin bile kanser gelişimini tetiklediği bildirilmektedir. Deride, oral kavitede, özofagusta ve akciğerin skuamoz karsinomlarında ve birçok tümör hücre soylarında EGFR düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Salomon ve ark., 1995). Meme, serviks, mesane, akciğer gibi skuamoz hücreli karsinomlarda EGFR ekspresyonunda artış belirlenmiştir (Normanno ve ark., 2005). EGF lizin, fenilalanin ve alanin bulundurmayan 53 aminoasitten oluşmuştur. EGF tek zincirli polipeptittir. 6000 Da molekül ağırlığında olan ve farklı dokulardada reseptörleri olan, epitel ve mezotelyal kökenli hücrelerde mitojenik etki göstermektedir (Das.,1982). EGF birçok kanser tipinde patogeneze, progresyonunda etkindir. EGF, embriyonik dönemde deri ve böbrek gibi dokuların yenilenmesinde büyük rol oynamaktadır (Salomon ve ark., 1995, Normanno ve ark., 2001). EGFR üç önemli fonksiyonel domaine sahiptir. 1.Hücre dışında ligand bağlama domaini, 2.hidroforobik transmembran domaini ve 3.hücre içinde sitoplazmik tirozin kinaz domaini içermektedir. Büyüme faktörleri aracılı MAP Kinaz sinyal ileti yolağı aktivasyonu Şekil 13'te gösterilmiştir.



**Şekil 13:** Büyüme faktörleri aracılı MAP Kinaz sinyal ileti yolağı aktivasyonu.

Büyüme faktörleri Ras, Raf, MAP kinaz yolağını uyarmakta ve biyolojik yanıt ise hücre çoğalması ve farklılaşmasının uyarılmasıdır. Büyüme faktörleri → Ras (küçük bir G proteini) (monomerik) → GDP bağlı Ras = inaktif → GTP bağlı Ras aktif → Mutant Ras proteinleri GTP'den ayrılamaz ve sürekli aktivite kazanır. Bu nedenle hücreler proliferatif halde kalırlar (Blood, 2003).

Ras gen mutasyonları insan kanserlerinin %30'nda bulunur. Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK'lar) aracı proteinler (GEF) yoluyla Ras GTP bağlı hale getirir Aktif Ras, Raf protein kinaza bağlanır Reseptör Tirozin Kinazlar Ras-Raf-MAP kinaz yolunu aktifleştirir ve ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) ,mitojenle aktiflenen protein kinaz (MAP kinaz) active olur. Hücrelerdeki bu sinyal yolağı hücre zarından çekirdeğe bilgi aktarılmasında önem taşır. Bu sinyal yolağı, embriyogenez, yaşamın idamesi, çoğalma, farklılaşma ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde rol alır. MAP kinazlar üç ana gruba ayrılır (Blood, 2003).

1. p38 MAP kinaz ailesi,
2. Extracellular signal regulated kinase (ERK) ailesi,
3. c-Jun NH2- terminal kinase (JNK) ailesi. MAP kinaz yolu, reseptör aracılı uyarımda hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Kaskad sistemi hem sinyalin amplifikasyonu hem de düzenleyici etkileşimleri önemlidir. Sinyalin iletimi Ras aktivasyonu ile başlar ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya çekirdekte transkripsiyon faktörlerini fosforilasyonla aktive eder ve hücrede biyolojik yanıt gelişir (Kolch, 2000; Liem ve Chamberlain, 2002).

Kanserde, hormonlar, büyüme faktörleri, farklılaşma faktörleri ve tümör ilerletici maddeler Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) aktive olur.

Hayvan ve insan hücre hatlarındaki çalışmalarla, muskarinik reseptörlerin mitojen ile aktive edilmiş protein (MAP) kinazları uyardığı gösterilmiştir. Hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinazlar 1 ve 2 (ERK1 / 2) aktivasyonu ile hareket ettiklerini göstermiştir (Rosenblum 1998, Futter ve ark., 2000). Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre zarından çekirdeğe bilgi aktarılmasında rol almaktadır.

#### 4.12. K562 Hücre Soyu

1975'te Lozzio ve arkadaşları K562 hücrelerini kronik miyeloid eritrolösemi hastasının blastik kriz evresinde plevra sıvısından geliştirmiştir (Lozzio & Lozzio, 1975). K562 Hücre soyu 20µm çapında farklılaşmamış blast hücreleridir. Bazofilik sitoplazmaları hiç granül içermez, iki ya da daha fazla prominent nükleolisi vardır. Monosit ve granülositin pozitif reaksiyon verdiği sitokimyasal ajanlara K562 hücreleri pozitif cevap vermez. Granülositik serisinin son derece farklılaşmamış hücreleridir (Audrey ve ark., 2002). Bu hücreler hematopoietik hücre büyümesi ve farklılaşma modeli olarak yaygın olarak kullanılmaktadır K562 hücreleri. insan lösemi hücre soyu, megakaryositik ya da eritroid hattı boyunca farklılaşma potansiyelinde olan bir pluripotent kök hücredir (Lozzio ve ark., 1977).

## 5.GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1. Gereçler

#### 5.1.1.Kimyasal maddeler

Akrilamid	BioRad
Amonyum persülfat	Sigma
Asetik asit	Merck
Bisakrilamid	Sigma
Borik asit	Merck
Bromo kloroindol fosfat (BCIP)	Promega
Coomassie parlak mavisi R250	Sigma
Ditiyotiretiol (DTT)	Sigma
EDTA, Na	Sigma
Etanol	Merck
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma
Fenilmetilsülfonil florür (PMSF)	Sigma
Glisin	Sigma
Gliserol	Sigma
HCl	Merck
Hepes	Sigma
Kalsiyum klorür	Sigma
$\beta$ -Merkaptoetanol (50mM)	Sigma
Magnezyum klorür	Sigma

Metanol	Merck
N, N, N', N',-tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma
Nitroblutetrazolyum (NBT)	Invitrogen
Nonidet P40	Amresco
Potasyum klorür	Merck
Potasyum bifosfat	Merck
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma
Sodyum asetat	Sigma
Sodyum bikarbonat	Sigma
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma
Sodyum karbonat	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum hidrojen fosfat	Merck
Sodyum klorür	Merck
Sodyum N-loril sarkozin	Sigma
Tris	Sigma
Triton-X	Sigma
Tween-20	Sigma

#### **Hücre kültür malzemeleri**

HEPES	Sigma
Penisilin/Streptomisin	Sigma
RPMI-1640	Sigma



Sodyum bikarbonat	Sigma
Tripan mavisi	Sigma
L-Glutamin	Sigma
Fetal dana serumu	Biochrom, Biological Industries
25 cm <sup>2</sup> kültür kabı	TPP
75 cm <sup>2</sup> kültür kabı	TPP
Mikro-plate	TPP

#### **Agonist ve antagonistler**

EGF	Sigma
Karbakol	Sigma
PD153035	Sigma
Wortmanin	Sigma
4DAMP	Sigma

#### **Proteaz inhibitörleri**

Leupeptin	Sigma
Fenil metil sulfonil florid (PMSF)	Sigma
Aprotinin	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Pepsitatin A	Sigma

#### **Elektroforetik analizde kullanılan standartlar**

Protein molekül ağırlığı standartları	Santa Cruz
---------------------------------------	------------

### Western emdiriminde kullanılan antikorlar

Alkalem fosfotaz eşlenik tavşan monoklonal anti keçi IgG	Sigma
ERK	Santa Cruz
pERK	Santa Cruz
cfos	Santa Cruz
EGFR	Santa Cruz
pEGFR	Santa Cruz
Beta aktin antikoru	Santa Cruz

### Kullanılan Kitler

#### Lowry Kit

SMART™ BCA Protein Assay Kiti İNTRON Biotechnolog

#### Western emdirimi gereçleri

Nitroselüloz membran(0.45 µM)	Schleicher&Schuell
BioRad mini jel elektroforez düzeneği (dikey) ve elektroforetik aktarma düzeneği	BioRad

### 5.1.2. Cihazlar

1-Etv	Memmert
2-Gç Kaynađı	Dan-Kar
3-Güç Kaynađı	Pharmacia, LKB
4-Manyetik Karıştırıcı	Hanna
5-pH Metre	WTW
6-Santrifüj	Hettich 30 RF
7-Santrifüj	Bd
8-Spektrofotometre	Biotek
9-Su Banyosu	Kotterman
10-Karıştırıcı (Vorteks)	Janke & Kunkel
11-Terazi	Oertling NA-114
12-Etüv	Memmert
13- Karbondioksit Etv	Sanyo
14-Derin Dondurucu (-20 °C)	Arçelik
15-Derin Dondurucu (-20 °C)	Siemens
16-Derin Dondurucu (-70 °C)	So-Low
17-Derin Dondurucu (-70 °C)	Thermo
18-Buzdolabı	Arçelik
19-Kırık Buz Makinesi	Scotsman AF-10
20-Çalkalama Cihazı	IKAVibraz-VXR
21-Otomatik Mikro Pipetler	Gilson

22-Otomatik Mikro Pipetler	Eppendorf
23-Otoklav	Nüve
24-Distile Su Cihazı	GFL
25-Fotograf Makinesi	Sony
26-Laminar akım kabini (Steril kabin)	Kutay
27-Invert (ters ışık) Mikroskopu	Olympus
28-Transblot system	BioRad
29-Santrifüj	Eppendorf

### 5.1.3. Tampon ve çözeltilerin bileşimi

#### Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler

##### Hücre kültürü

RPMI-1640	100 ml
NaHCO <sub>3</sub>	%2
Fetal Dana Serumu	% 10
Penisilin/Streptomisin	10000 IU/ml + 10000 µg/µl
L-Glutamin	200 mM
Hepes	20 mM.

Isı ile komplemanı inaktive edilmiş %10 FDS (fetal dana serumu), 2 mM L-glutamin, 1000 U/ml penisilin-streptomisin, 200 mM hepes ve sodyum bikarbonat eklenmiş RPMI-1640 hücre kültür medyumunu.

## Hücre sayımında kullanılan çözeltiler

### Tripan mavisi ile hücre sayımı

Tripan Mavisi	%0.5 (w/v)
Sodyum klorür	%0.9 (w/v)

### Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)

Sodyum klorür	140 mM
Potasyum klorür	3 mM
Sodyum bikarbonat	8 mM
Potasyum bikarbonat	2 mM

pH=7.4

1 litre distile su içerisinde çözüldü.

## Protein homojenizasyonda kullanılan çözeltiler

### Homojenleştirme tamponu (Taze hazırlanır)

Son Konsantrasyon

Hepes	20 mM, pH: 8.0
PMSF	0.1 mM
EDTA	1 mM
Leupeptin	10 µg/ml
Aprotinin	2 µg/ml

## **Lowry metodunda kullanılan çözeltiler**

Protein miktar tayini Lowry yöntemi (Lowry ve ark., 1951) SMART™ BCA Protein Assay Kiti ile belirlendi.

## **5.1.4. Elektforez ve Western emdirimi analizlerinde kullanılan çözeltiler**

### **5.1.4.1. Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi**

30 g Akrilamid

0.8 g N, N-metilen bis akrilamid

Tepkime hacmi: 100 ml

### **Örnek tamponu (4X)**

125 mM Tris-HCl pH 6.8

%30 v/v Gliserol

6 M Üre

%10 w/v  $\beta$  merkaptoetanol

%2 w/v Sodyum dodesilsülfat (SDS)

%0.01 w/v bromfenol mavisi

### **5.1.4.2. 2x Ayırma jeli tamponu**

0.75 M Tris-HCl, pH 8.8

%0.2 w/v SDS

### **5.1.4.3. 2x Yükleme jeli tamponu**

0.25 M Tris-HCl, pH 6.8

%0.2 w/v SDS

#### **5.1.4.4. 2x Yürütme tamponu**

6 g Tris

30 g Glisin

SDS 1 g

#### **5.1.4.5. 5x Elektroforez tamponu**

7.5 g Tris

36 g Glisin

Tepkime hacmi: 500 ml

#### **5.1.4.6 Aktarma tamponu, pH 8.5**

25 mM Tris, pH:8.3

192 mM Glisin

%20 Metanol

#### **5.1.4.7. Tris tuz tamponu (TBS), pH 8.0**

136.75 mM NaCl

2.68 mM KCl

21.26 mM Tris-HCl

#### **5.1.4.9. Blok tamponu**

%1 BSA

%0.05 Tween-20

#### **5.1.4.10. TBS-T tamponu (%0.1)**

TBS

%0.1 Tween 20

#### 5.1.4.11. Birincil antikor tamponu

Anti ERK antikor:	Bloklama çözeltisi ile 1:100 seyreltilmiş
Anti pERK antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:100 seyreltilmiş
Anti cfos antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:100 seyreltilmiş
Anti EGFR antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:100 seyreltilmiş
Anti pEGFR antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:100 seyreltilmiş
Beta aktin antikor	Bloklama çözeltisi ile 1:100 seyreltilmi

#### 5.3.6.12. 2x Yürütme tamponu

6 g Tris  
30 g Glisin  
SDS 1 g

#### 5.1.4.13. 5x Elektroforez tamponu

7.5 g Tris  
36 g Glisin  
Tepkime hacmi: 500 ml

#### 5.1.4.14. İkincil antikor tamponu

Alkale fosfatase eşlenik tavşan poliklonal IgG: TBS ile 1:1000  
seyreltilmiş

%0.05 Tween 20.



#### **5.1.4.15. Jel boyama çözeltisi**

%0.2 (w/v) Coomassie mavisi

%50 (v/v) Metanol

%10 Asetik asit.

#### **5.1.4.16. Jel boya çıkarma çözeltisi**

%10 (v/v) Metanol

%10 (v/v) Asetik asit

### **5.4.Yöntem**

#### **5.4.1. Çalışmada kullanılan hücrelerin hazırlanması ve çoğaltılması**

K562 hücreleri ATCC (CCL-243) suşu olup ticari olarak elde edildi. K562 hücreleri %10 fetal dana serumu, 10000 U/μl penisilin, 10000 μg/μl streptomisin, 200 mM L-Glutamin içeren RPMI-1640 kültür ortamında, 37°C' ta, %5 CO<sub>2</sub> içeren karbondioksit etüvünde inkübe edildi. Hücreler haftada üç kere kültür ortamı değiştirilerek 1x10<sup>6</sup> hücre/ml olacak şekilde çoğaltıldı (Rooney ve Czepulkowski 1978).

#### **5.4.1.1. Hücrelerin sayılması:**

##### **a) Tripan mavisi ile hücre sayımı**

Hücreler %10 oranında Tripan mavisi ile boyanıp toma lamında sayıldı. Canlılık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanıp %95 canlılık oranındaki hücreler hücre sayımı, Western emdirimi yapmak üzere donduruldu.

10 μl örnek + 90 μl TB → Ölü hücreler maviye boyanır.

$$\frac{\text{Canlı}}{\text{Toplam}} \times 100 = \text{Canlılık Oranı}$$

#### **5.4.2. Hücrelerin toplanması**

Kültür ortamında yetiştirilen hücre soyu  $1 \times 10^6$  hücre/ml yoğunluğuna ulaşıncaya protein örnekleri için  $30 \times 10^6$ , toplam hücre olacak şekilde toplandı. Hücreler 700g' de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılıp üzerine 5 ml PBS çözeltisi eklenip 700g' de 10 dakika santrifüj edildi ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Hücreler western emdirimi yapmak için  $-80^\circ\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklandı.

#### **5.4.3. İlaç etkileşim deneyleri**

##### **5.4.3.1. K562 hücrelerinin epidermal büyüme faktörü (EGF), muskarinik reseptör agonisti (CCh), ERK (wortmanin) ve EGFR (PD153035) inhibitörleri ile muamelesi**

Kültür ortamındaki K562 hücreleri ilaçlar uygulanmadan 1 gün önce serumsuz ortama alındı. K562 hücreleri agonist (CCh), epidermal büyüme faktörü reseptörü agonisti (EGF), EGFR inhibitörü PD153035, ERK inhibitörü (wortmanin) ile muamele edildi. K562 hücrelerinde muskarinik ve EGFR'lerinin rolünün belirlenmesi için muskarinik reseptörlere özgü agonist karbakol veya EGFR'ye özgün EGF, ve sinyal ileti yolağı inhibitörleri kültür ortamına eklendi. Agonist, antagonist ve inhibitörler ile muamele edilen hücreler Western emdirimi için uygun koşullarda toplandı. Western emdirimi yöntemi için toplanan hücreler PBS ile yıkayıp  $-80^\circ\text{C}$ 'ta donduruldu.

#### **5.4.4. Hücre özütlerinin hazırlanması**

Gerekli koşulda hazırlanıp  $-80^\circ\text{C}$ ' da saklanan hücrelere bölüm 5.1.3.' te anlatıldığı gibi hazırlanan homojenizasyon tamponundan 100  $\mu\text{l}$  eklendi. Dounce ile hücreler patlatıldı. Homojenleştirme tamponunu 1ml'ye tamamlanarak hücre patlatma işi tekrarlandı. Hazırlanan homojenatlarda Lowry yöntemi ile protein miktar tayini yapılmak üzere  $-80^\circ\text{C}$ ' de saklandı.

#### **5.4.5. Protein Miktar Tayini**

Protein miktarları Lowry yöntemi ile SMART™ BCA Protein Assay Kiti kullanılarak belirlendi (Lowry ve ark., 1951).

#### **5.4.6. SDS-PAGE (Elektroforez)**

Örnek tamponu (4X) ile karıştırılan protein örnekleri (150 µg) 100°C'ta 3-5 dakika denatüre edildi. Örnekler, %12' lik SDS-PAGE jeline yüklenerek 150 Volt' da 1.5 saat yürütüldü.

#### **5.4.7. Islak Elektroforetik Transfer Düzeneği ile Elektroforetik Transfer**

Jelin büyüklüğüne uygun olarak iki tane filtre ve bir tane nitroselüloz membran kesildi. Elektroforez sonrası üst jeli kesilen jel, nitroselüloz membran, filtre kağıtları ve süngerler 10 dakika aktarma tamponu içinde bekletildi. Jel kasetindeki pozitif elektrodun (anot) üzerine sırasıyla sünger, 3MM filtre kağıdı, nitroselüloz membran, jel, 3MM filtre kağıdı ve sünger konularak kaset kapatıldı. Kaset transfer düzeneğine yerleştirildikten sonra kasedin üst kısmını kaplayacak şekilde aktarma tamponu ile dolduruldu. Düzenek güç kaynağına bağlanıp 70 V'da 1 saat süresince aktarma yapıldı.

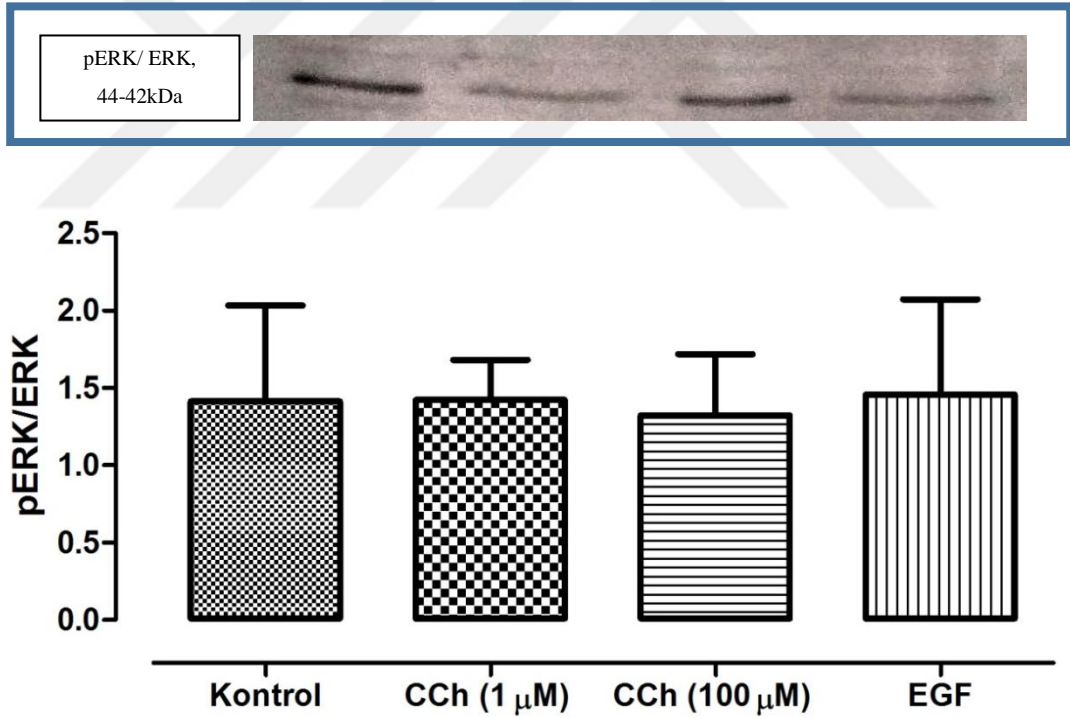
#### **5.4.8. Western Emdirimi Analizi**

Membranlar BSA içeren TBS-T blok tamponunda oda sıcaklığında 4°C'ta gece boyu inkübe edildi. Epidermal büyüme faktörü reseptörü, c-fos, ERK proteini antikorları ile gece boyu etkileştirildi. Ardından TBS-T tamponuyla 3 kez 10'ar dakika yıkandı. Membranlar alkalen fosfataz eşlenik tavşan- IgG ile 1 saat etkileştirildikten sonra tekrar TBS-T tamponuyla 3 kez 10'ar dakika yıkandı ve birincil antikor ve ikincil antikor IgG etkileşimini içeren membran BCIP/NBT renk geliştirici tampon ile renklendirildi.

## 6. BULGULAR

### 6.1. K562 hücrelerinde ERK fosforilasyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi

Hücreler bölüm 5.4.1. de anlatıldığı gibi çoğaltıldı. K562 hücreleri, serum yokluğunda, EGF (16 nM) veya karbakol (1 $\mu$ M, 100  $\mu$ M) ile 30 dakika muamele edildi. Hücreler toplanıp 1500g' de 15 dakika döndürülerek PBS ile yıkandı ve pelet -80<sup>0</sup>C' da donduruldu. Agonistler ile muamele edildikten sonra dondurulan hücrelerden hücre özütleri hazırlandı. Proteinler SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra nitroselüloz membranlara aktarıldı. Daha sonra 1:100 konsantrasyonda pERK ve ERK antikoru kullanılarak analiz edildi. K562 hücrelerinde, muskarinik ve EGFR agonistlerinin ERK fosforilasyonuna etkisi Şekil 14'de gösterilmiştir. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  standart hata (SD) şeklinde gösterildi (Şekil 14).

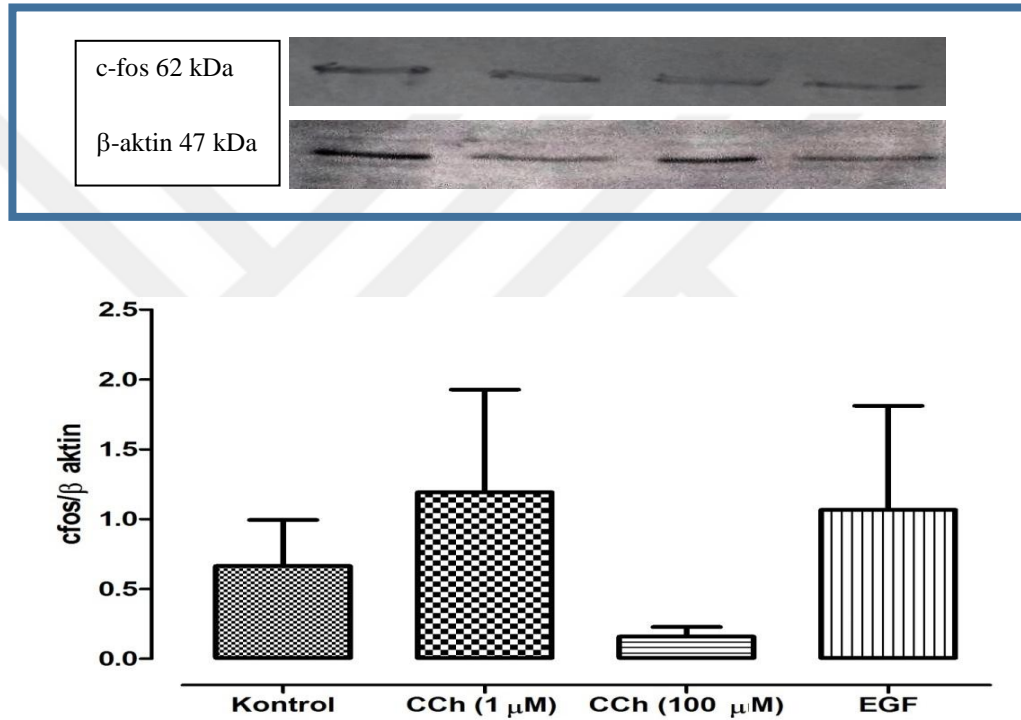


**Şekil 14:** K562 hücrelerinde ERK fosforilasyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi (P>0.005).

Farklı konsantrasyonlarda karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde pERK/ERK ekspresyonunda herhangi bir değişim belirlenmedi.

## 6.2. K562 hücrelerinde cfos ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi

Karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilip toplanan ve  $-80^{\circ}\text{C}$ ' da dondurulan hücrelerden hücre özütleri hazırlandı. Proteinler western emdirimi ile membranlara aktarıldı. Daha sonra 1:100 konsantrasyonda cfos antikoru kullanılarak analiz edildi. Beta aktin antikoru internal kontrol olarak kullanılmıştır. K562 hücrelerinde, muskarinik ve EGFR agonistlerinin c-fos protein ekspresyonuna etkisi Şekil 15'de gösterilmiştir. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  standart hata (SD) şeklinde gösterildi (Şekil 15).

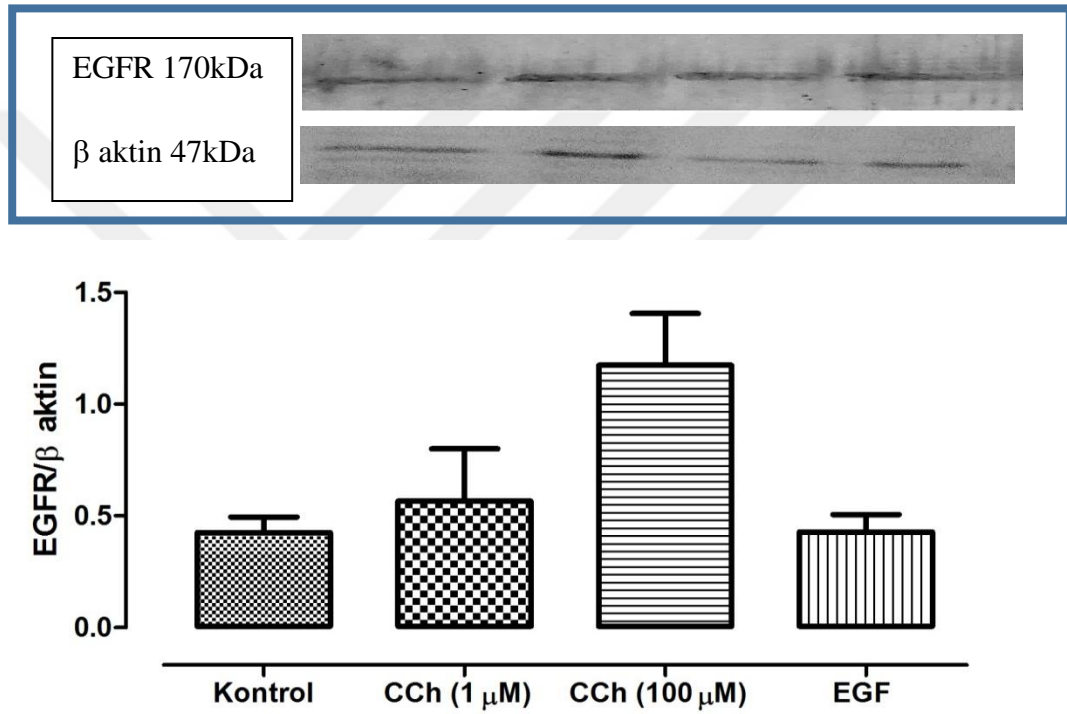


**Şekil 15:** K562 hücrelerinde cfos protein ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi ( $P>0.005$ ).

Farklı konsantrasyonlarda karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde c fos ekspresyonu 1  $\mu\text{M}$  karbakol varlığında kontrole göre artarken, 100  $\mu\text{M}$  karbakol ile muamele edilen hücrelerde c-fos ekspresyonunda kontrole göre azalma eğilimi görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EGF ile muamele edilen hücrelerde c-fos ekspresyonu artma eğilimindedir ancak aradaki fark anlamlı bulunamamıştır ( $P>0.005$ ).

### 6.3. K562 hücrelerinde EGFR ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi

Karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilip toplanan ve  $-80^{\circ}\text{C}$ ' da dondurulan hücrelerden hücre özütleri hazırlandı. Proteinler western emdirimi ile membranlara aktarıldı. Daha sonra 1:100 konsantrasyonda pEGFR ve EGFR antikorları kullanılarak analiz edildi. K562 hücrelerinde, muskarinik ve EGFR agonistlerinin pEGFR ve EGFR protein ekspresyonuna etkisi Şekil 16'da gösterilmiştir. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  standart hata (SD) şeklinde gösterildi (Şekil 16).

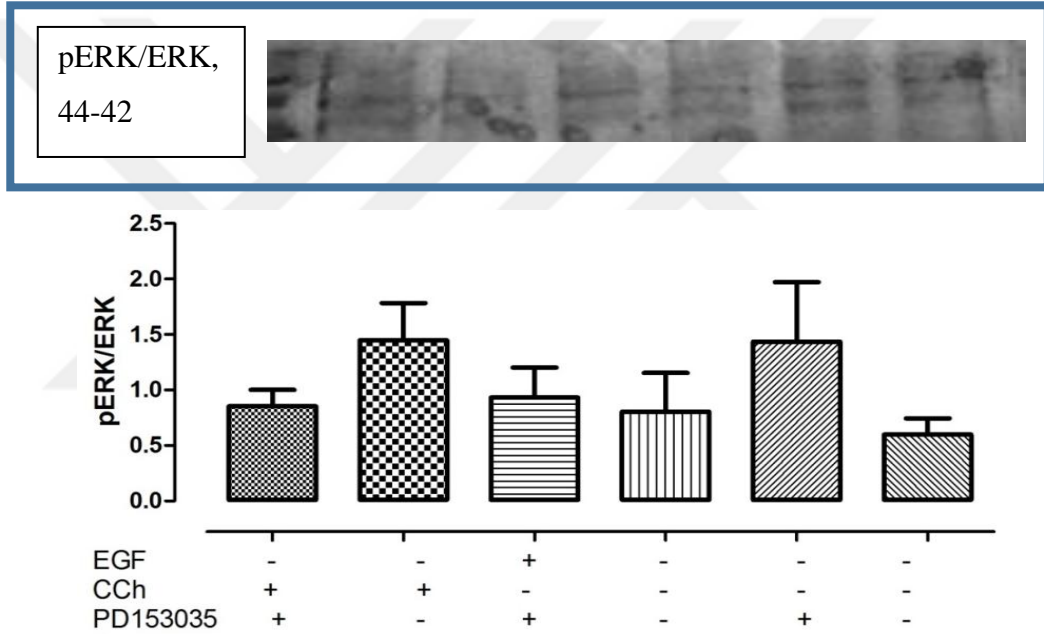


**Şekil 16:** K562 hücrelerinde EGFR protein ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi ( $P>0.005$ ).

Farklı konsantrasyonlarda karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde EGFR ekspresyonu 1  $\mu\text{M}$  karbakol varlığında kontrole göre artarken, 100  $\mu\text{M}$  karbakol ile muamele edilen hücrelerde EGFR ekspresyonunda kontrole göre daha da fazla artış belirlenmiştir. Ancak aralarındaki fark anlamlı değildir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EGF ile muamele edilen hücrelerde EGFR ekspresyonunda kontrole göre değişim gözlenmemiştir ( $P>0.005$ ).

#### 6.4. K562 hücrelerinin epidermal büyüme faktörü (EGF), muskarinik reseptör agonisti (CCh), EGFR inhibitörü (PD153035) ile muamelesi

Karbakol, EGF ve/veya wortmanin, PD153035 ile muamele edilip toplanan ve  $-80^{\circ}\text{C}$ ' da dondurulan hücrelerden hücre özütleri hazırlandı. İnhibitörler agonistlerden 30 dakika önce kültür ortamına eklendi. Proteinler western emdirimi ile membranlara aktarıldı. Daha sonra 1:100 konsantrasyonda ERK ve pERK antikoları kullanılarak analiz edildi. K562 hücrelerinde, muskarinik ve EGFR agonistlerinin, inhibitörlerin pERK ve EGFR protein ekspresyonuna etkisi Şekil 17'de gösterilmiştir. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  standart hata (SD) şeklinde gösterildi. (Şekil 17).

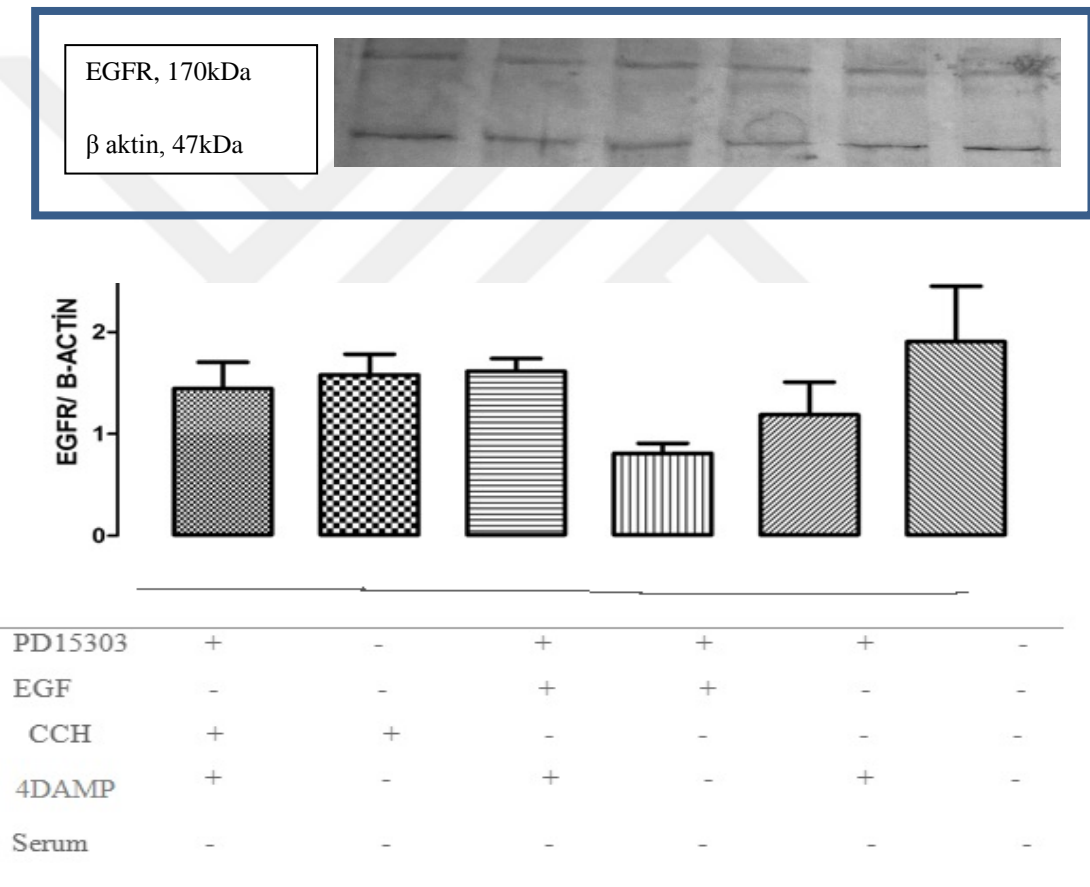


**Şekil 17:** K562 hücrelerinde pERK/ERK protein ekspresyonuna, karbakol ve /veya EGF'nin ve/veya PD153035'in etkisi ( $P>0.005$ ).

PD153035 inhibitörü ve/veya karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde pERK/ERK ekspresyonu karbakol ve PD153035 varlığında kontrole göre artma eğiliminde iken diğer gruplarda değişim gözlenmemiştir ve gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

### 6.5. K562 hücrelerinde EGFR ekspresyonuna, CCh, ,4DAMP, EGF ve/veya EGFR inhibitörünün etkisi

Karbakol, 4DAMP, EGF veya EGFR inhibitörü ile 30 dakika muamele edilip toplanan ve -80°C’ da dondurulan hücrelerden hücre özütleri hazırlandı. Proteinler western emdirimi ile membranlara aktarıldı. Daha sonra 1:100 konsantrasyonda EGFR ve  $\beta$ -aktin antikoru kullanılarak analiz edildi. Beta aktin antikoru internal kontrol olarak kullanılmıştır. K562 hücrelerinde, muskarinik ve EGFR agonistlerinin  $\beta$ -aktin protein ekspresyonuna etkisi Şekil 18’de gösterilmiştir. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  standart hata (SD) şeklinde gösterildi. (Şekil 18).



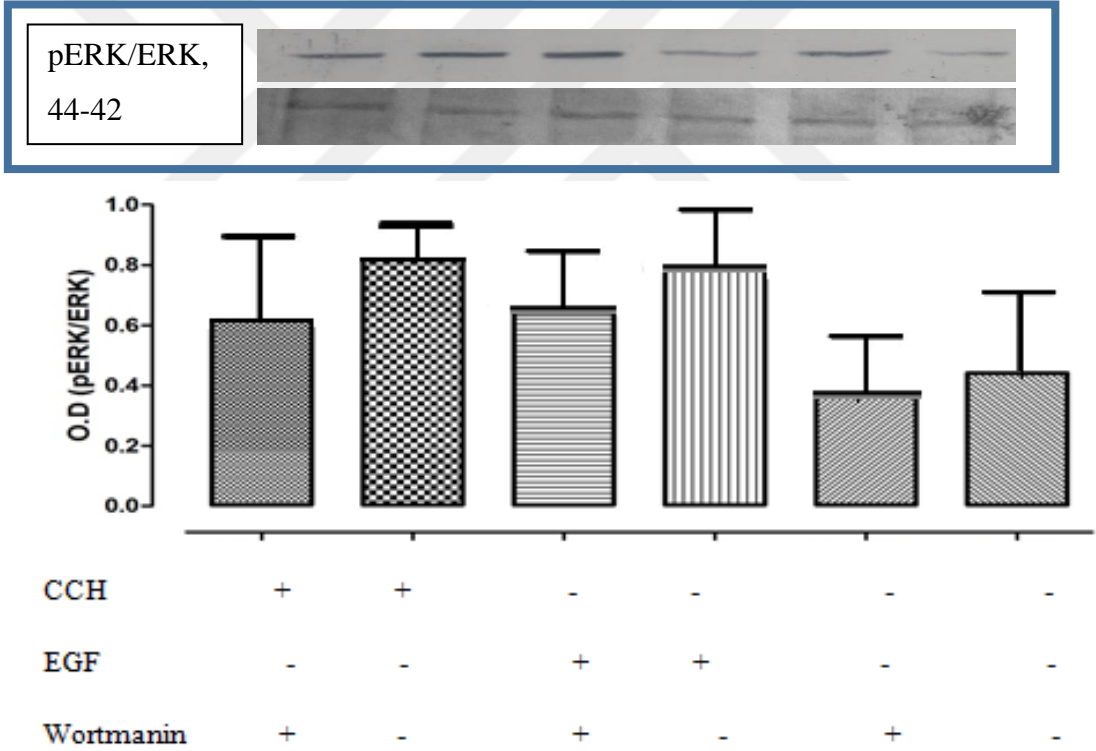
**Şekil 18:** K562 hücrelerinde EGFR ekspresyonuna, CCh, ,4DAMP, EGF ve/veya EGFR inhibitörünün etkisi.

Karbakol, 4DAMP, EGF ve/veya EGFR inhibitörünün ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde, EGFR ekspresyonunda sadece EGF ve PD15303 ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre azalma belirlenmiştir. Ancak bu azalma anlamlı değildir. Diğer gruplarda değişim gözlenmemiştir.



## 6.6. K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol, EGF ve wortmaninin etkisi

Hücreler bölüm 5.4.1. de anlatıldığı gibi çoğaltıldı. K562 hücreleri, serum yokluğunda, EGF (16 nM) veya karbakol (1 $\mu$ M, 100  $\mu$ M) ile 30 dakika muamele edildi. Hücreler toplanıp 1500g' de 15 dakika döndürülerek PBS ile yıkandı ve pelet -80<sup>0</sup>C' da donduruldu. Agonistler ile muamele edildikten sonra dondurulan hücrelerden hücre özütleri hazırlandı. Proteinler SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra nitroselüloz membranlara aktarıldı. Daha sonra 1:100 konsantrasyonda pERK ve ERK antikoru kullanılarak analiz edildi. K562 hücrelerinde, muskarinik ve EGR agonistlerinin pERK/ERK ekspresyonuna etkisi Şekil 19'de gösterilmiştir. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  standart hata (SD) şeklinde gösterildi. (Şekil 19).

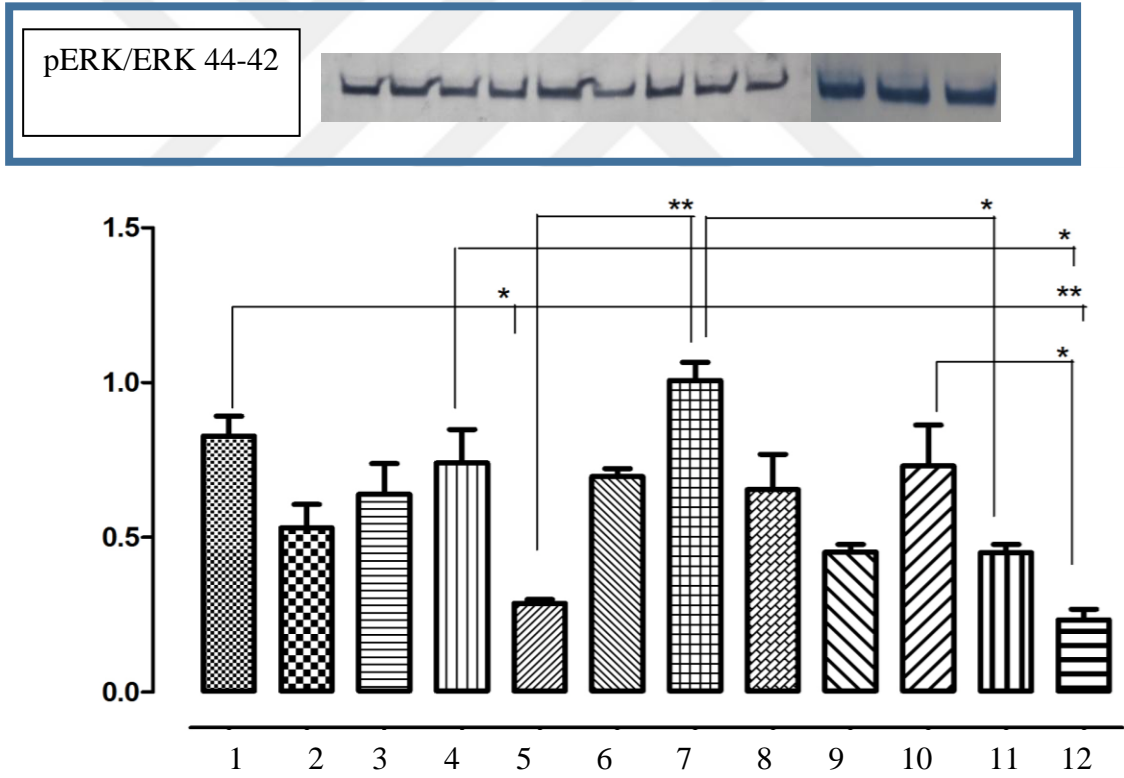


Şekil 19: K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin ve wortmaninin etkisi.

Karbakol, wortmanin ve EGF ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde pERK, ERK ekspresyonu karbakol varlığında ve EGF varlığında kontrole göre artmış, wortmanin varlığında ise azalmıştır. Ancak bu azalma anlamlı değildir.

### 6.7. K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin zamana bağlı etkisi

Karbakol ve EGF ile 30, 120, 240 dakika muamele edilip toplanan ve  $-80^{\circ}\text{C}$ ' da dondurulan hücrelerden hücre özütleri hazırlanlandı. Proteinler western emdirimi ile membranlara aktarıldı. Daha sonra 1:100 konsantrasyonda ERK ve pERK antikorları kullanılarak analiz edildi. K562 hücrelerinde, karbakol ve EGF'nin pERK ve ERK protein ekspresyonuna etkisi Şekil 20'de gösterilmiştir. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  standart hata (SD) şeklinde gösterildi. (Şekil 20).



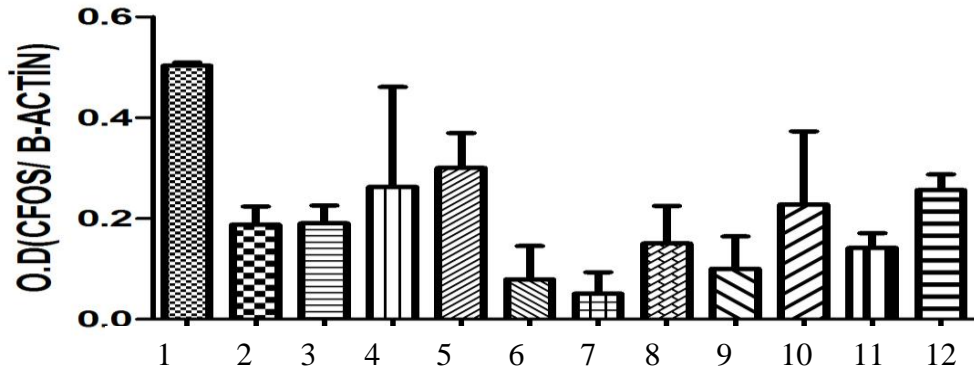
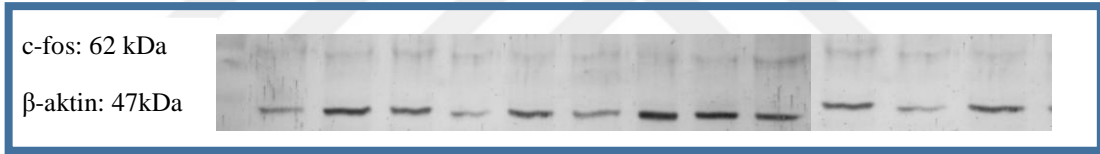
. 1)K 0 dk, 2) K 30 dk. 3) K 120 dk 4) K 240 dk 5) EGF 0 dk 6)EGF 30 dk 7) EGF 120 dk 8) EGF 240 dk 9)CCh 0dk 10) CCh 30 dk 11) CCh 120 dk 12) CCh 240 dk

Şekil 20: K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin zamana bağlı etkisi.

pERK/ERK ekspresyonunun kontrol, EGF ve CCh grupları zarfına göre karşılaştırıldıklarında, kontrol grubununun 240. dakikasına göre CCh 240. dakikada inhibisyon belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). EGF'nin etkisinde ise 0. dakika 120. dakikada EGF grubu ile karşılaştırıldığında pERK/ERK ekspresyonunda anlamlı artış saptanmıştır ( $P < 0.05$ ). EGF'nin 120. dakikadaki grubuna göre 120. dakika CCh grubunda pERK/ERK ekspresyonunda inhibisyon belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ).

### 6.8. K562 hücrelerinde c-fos ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin zamana bağlı etkisi

Karbakol ve EGF ile 30, 120, 240 dakika muamele edilip toplanan ve  $-80^{\circ}\text{C}$ ' da dondurulan hücrelerden hücre özütleri hazırlanlandı. Proteinler western emdirimi ile membranlara aktarıldı. Daha sonra 1:100 konsantrasyonda c-fos antikoru kullanılarak analiz edildi. K562 hücrelerinde, karbakol ve EGF'nin c-fos protein ekspresyonuna zamana bağlı etkisi Şekil 21'de gösterilmiştir. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  standart hata (SD) şeklinde gösterildi. (Şekil 21).

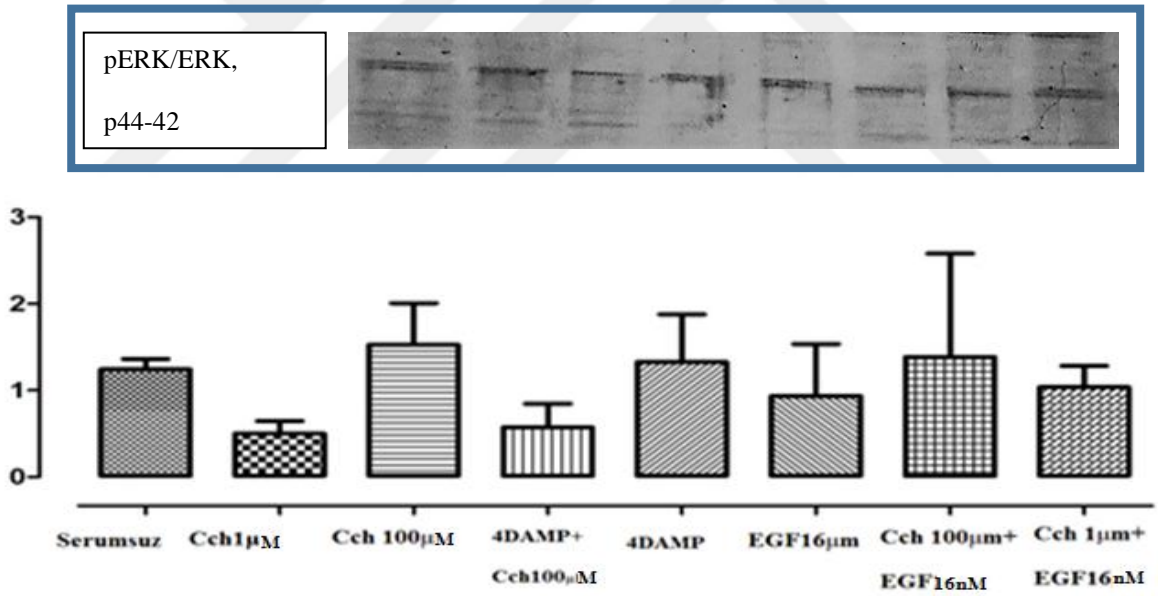


**Şekil 21:** K562 hücrelerinde, muskarinik ve EGR agonistlerinin c-fos protein ekspresyonuna zamana bağlı etkisi. 1) **K** 0 dak, 2) **K** 30 dak. 3) **K** 120 dak 4) **K** 240 dak 5) **EGF** 0 dak 6) **EGF** 30 dak 7) **EGF** 120 dak 8) **EGF** 240 dak 9) **CCh** 0 dak 10) **CCh** 30 dak 11) **CCh** 120 dak 12) **CCh** 240 dak

Karbakol ve EGF ile 30, 120, 240 dakika muamele edilen hücrelerin zamana bağlı uyarılmasında farklı cevaplar alınmıştır. Hücrelerin EGF ile 30 ve 120 dakika muamelesinin 0. dakikaya göre azaldığı belirlenmiştir. Tüm gruplarda karbakolün ve EGF'nin zamana bağlı anlamlı bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

### 6.9. K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol, EGF ve/veya 4DAMP'ın etkisi

Karbakol (1,100 $\mu$ M), EGF ve/veya 4DAMP ile 30 dakika muamele edilip toplanan ve -80<sup>0</sup>C' da dondurulan hücrelerden hücre özütleri hazırlandı. Antagonist agonistlerden 30 dakika önce kültür ortamına eklenmiştir. Proteinler western emdirimi ile membranlara aktarıldı. Daha sonra 1:100 konsantrasyonda ERK ve pERK antikorları kullanılarak analiz edildi. K562 hücrelerinde, muskarinik ve EGFR agonist ve muskarinik antagonistin pERK ve ERK protein ekspresyonuna etkisi Şekil 22'de gösterilmiştir. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  standart hata (SD) şeklinde gösterildi. (Şekil 22).



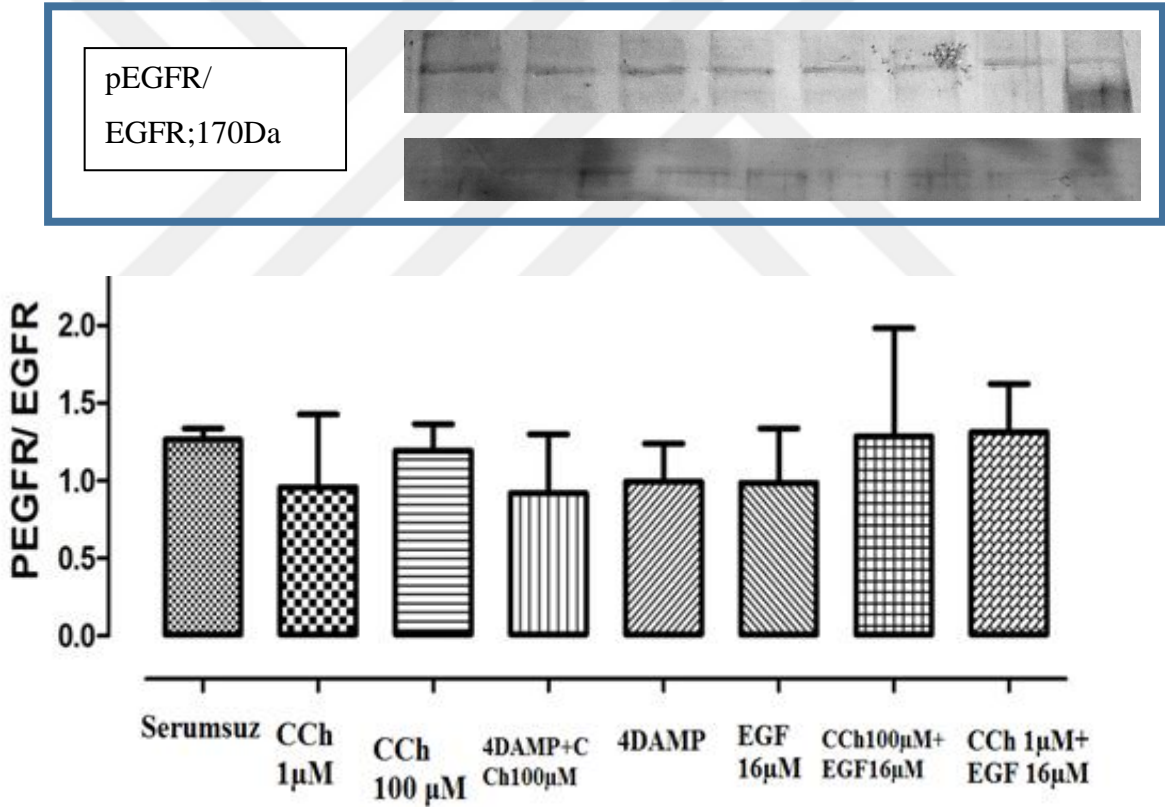
**Şekil 22:** K562 hücrelerinde pERK/ERK ekspresyonuna, karbakol (1 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) EGF ve/veya 4DAMP'ın etkisi.

Farklı konsantrasyonlarda karbakol (1 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) ve EGF ve/veya 4DAMP ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde 1  $\mu$ M karbakol varlığında pERK/ERK ekspresyonu kontrole göre azalırken, 100  $\mu$ M karbakol ile muamele edilen hücrelerde artmıştır. Karbakol ve 4DAMP birlikte muamele edildiğinde kontrole ve

sadece 4DAMP ile muamele edilen hücrelere göre azalmıştır. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

#### 6.10. K562 hücrelerinde pEGFR/EGFR ekspresyonuna, karbakol ve EGF'nin etkisi

Karbakol (1, 100  $\mu$ M) ve EGF ve/veya 4DAMP ile 30 dakika muamele edilip toplanan ve  $-80^{\circ}\text{C}$ ' da dondurulan hücrelerden hücre özütleri hazırlandı. Proteinler western emdirimi ile membranlara aktarıldı. Daha sonra 1:100 konsantrasyonda pEGFR ve EGFR antikoları kullanılarak analiz edildi. K562 hücrelerinde, muskarinik ve EGFR agonistlerinin pEGFR ve EGFR protein ekspresyonuna etkisi Şekil 23'de gösterilmiştir. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  standart hata (SD) şeklinde gösterildi. (Şekil 23).



Şekil 23: K562 hücrelerinde pEGFR/EGFR ekspresyonuna, karbakol (1 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) EGF ve/veya 4DAMP'in etkisi ( $P>0.005$ ).

Farklı konsantrasyonlarda karbakol (1 $\mu$ M, 100 $\mu$ M), EGF ve/veya 4DAMP ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde pEGFR/ EGFR ekspresyonu hiçbir grupta değişmemiştir.

### 6.11. İstatistiksel Analiz

Deneyler 4 kere tekrarlanmış olup GraphPad Prism 5.0 programında One-way ANNOVA ve Bonfferoni post test istatistiksel analizleri kullanılmıştır. Densitometrik analizlerde LI-COR Image Studio 5 ücretsiz yazılımı kullanılmıştır.



## 7. TARTIŞMA

Nöronal olmayan hücrelerde de asetilkolin ve reseptörlerinin hücreler arası sinyal iletiminde önemli olduğu belirtilmektedir. Son yıllarda kolinerjik sistemin nöronal olmayan hücrelerdeki varlığı ve önemi yüksek ilgi ve kabul görmektedir (Kawashima ve Fujii 2008, Wessler ve, Kirkpatrick., 2008). Muskarinik reseptörler G protein kenetli reseptör ailesindedir (Miyazawa ve ark., 2003). Asetilkolin reseptörleri sindirim sisteminde epitel hücreleri , üreme sisteminde epidermisdeki hücreler , akciğer zarında mezotelyuma ait hücrelerde ve endotel hücrelerinde, bağışıklık ve kas sisteminde ise monositler, granülositler, alveolar makrofajlarda ve mast hücrelerinde bulunmaktadır (Sastry ve Sadavongvivad, 1978; Klapproth ve ark., 1997; Wessler ve ark., 1998).

G protein bağlı reseptörler, EGFR'lerin geçici olarak aktivasyonunu indükleyerek biyolojik yanıtlara neden olacak sinyal yollarını aktive etmektedirler (Prenzel ve ark., 2001). Çeşitli çalışmalarla farklı GPCR'lar aracılı sinyal ileti yolları ile MAPK sinyal yolağının aktive olduğu önerilmektedir (Naor ve ark., 2000). Çok sayıda çalışmada, EGFR'lerin çeşitli GPCR'ların uyarılmasından sonra aktive olduğu gösterilmiştir. Ancak farklı sinyal yollarının farklı hücre tiplerinde kolinerjik ERK aktivasyonunda rolü olduğu önerilmektedir (Daub ve ark., 1996; Daub ve ark., 1997).

Birçok GPCR'nin ve mAChR'lerin sinyal iletiminin önemli olduğu EGFR'lerinin geçici aktivasyonu ile çeşitli sinyal yolları üzerinden MAP kinazları devreye sokabilir (Daub ve ark., 1999; Daub ve ark., 1997; Amos ve ark., 2005, Cheng ve ark., 2007, Cheng ve ark., 2003; Iwasaki ve ark., 1998). M<sub>3</sub> mAChR farklı tipte kanser hücrelerinin hücre çoğalması, yaşamın idamesi, enflamasyon, anjiyogenez, invazyon, ve migrasyonu ile ilişkili birçok sinyal ileti yolağını indüklediği gösterilmiştir. Bu kanser hücrelerinde M<sub>3</sub> reseptörleri ile aktive olan anahtar onkojenik hücresel mekanizmaların bazıları; EGFR/MAPK yolağı (büyüme ve hücre çoğalması), PI3K/Akt yolağı (yaşamın idamesi ve apoptoz karşıtı), beta katenin/Wnt yolağı (ivazyon ve göç) ve NFκB yolağıdır (pro inflamasyon ve kemotaktik).

M<sub>3</sub> reseptörleri ile EGFR'nin geçici aktivasyonu kolon kanser hücre çoğalmasında MAPK yolağını uyarmaktadır (Cheng ve ark., 2003). Küçük hücreli akciğer kanserin (SCLC) de darifenasin ile M<sub>3</sub> reseptörlerinin inhibisyonu MAPK yolağının aktivitesini azalttığı ve invitro ve in vivo tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Song ve ark., 2007). 4DAMP ile M<sub>3</sub> reseptörünün spesifik inhibisyonu ve M<sub>3</sub> reseptörü knock down olan MCF-7 meme kanser hücrelerinde MAPK fosforilasyonunun baskılandığı gösterilmiştir (Schmitt ve ark., 2010). İnsan kanserlerinde, MAPK sinyal yolunun PI3K bağımlı feedback mekanizması ile aktive olduğu da önerilmektedir (Carracedo ve ark., 2008). Önceki çalışmalarda M<sub>3</sub> muskarinik reseptörünün EGFR'leri aracılığıyla MAPK yolağı ile etkileştiği belirtilmektedir (Slack, 2000). MAPK sinyal ileti yolağının prostat kanserinde M<sub>3</sub> muskarinik reseptörler aracılı sinyal iletilerinde kilit mekanizma olabileceği belirtilmektedir (Liqiang ve ark., 2016). Büyüme faktörleri ve onların reseptörlerinin kanser hücre çoğalmasında ve tümör büyümesinde önemli roller oynamaktadır. Bu bulgular *in-vivo* da kolinerjik agonist ile uyarılan tümör gelişiminde EGFR ve EGFR sonrası sinyal yollarının rolünü teyit etmiştir. İnsan kolon kanser hücrelerinde, kolinerjik agonist muskarinik reseptör etileşimi sonucu dolaylı olarak EGFR ile etkileşime neden olarak MAPK sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. Bu hücrelerde MAPK sinyal yolağının hücre çoğalması ve tümör invazyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Cheng ve ark., 2003). EGF, meme, akciğer ve karaciğer kanseri gibi birçok kanser tipinde EGFR'lerinin ekspresyonlarında artışa neden olmuştur (Finot ve ark., 2012, Breindel ve ark., 2013, Masuda ve ark., 2012).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, kolinerjik uyarımla MAP kinaz sinyal iletilerinde epidermal büyüme faktörü reseptörünün anahtar oyuncu olduğu belirtilmektedir. Büyüme faktörü ile EGFR'nün uyarımının reseptör tirozin kinaz ailesine ait kinazlar da dahil olmak üzere çeşitli sinyal yollarını aktive ettiği belirtilmektedir.

Kolinerjik uyarı ile EGFR nin geçici aktivasyonu ve MAP kinaz yolağının uyarımının kanserle ilgili olan hücre çoğalmasının düzenlenmesinde önemli rolü olduğu belirtilmektedir (Metzger ve ark., 1989). Metzger ve arkadaşları, hücre göçünü düzenleyen yapıyı da göstermişlerdir (Metzger ve ark., 1989). Kolinerjik



uyarımla EGFR'nin geçici aktivasyonu günümüze kadar çeşitli hücre tiplerinde incelenmiştir. Örneğin, insan embriyonik böbrek (HEK) hücreleri ya da COS7 hücreleri reseptör çalışmaları için kullanılmıştır (Daub; Wallasch ve ark., 1997; Lopez-Illasaca; Crespo ve ark., 1997; Stirnweiss; Valkova ve ark., 2006). Kolinerjik sinyaller cilt katmanları içinde hücre çoğalması, farklılaşması için keratinositler ve diğer hücre tipleri arasında geçişde önem arz etmektedir (Arredondo Hall ve ark., 2003; Grando ve Zelicson, 1995; Grando ve ark., 1993; Grando; Horton ve ark., 1996). CCh ve EGF'nin HaCaT (human epidermal keratinocytes) hücre göçünü engellediğide gösterilmiştir (Chernyavsky ve ark., 2004).

Muskarinik reseptörler mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz yolağında ERK fosforilasyonunu uyarmakta ve etkinleştirmektedir (Ashkenazi ve Ramachandran, 1989; Belcheva ve ark., 2002; Gutkind, ve ark., 1991; Qian ve ark., 1995).

K562 hücrelerinde yaptığımız deneylerde farklı konsantrasyonlarda karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde pERK ekspresyonunda herhangi bir değişim belirlenmedi. Karbakol ve EGF ile 30, 120, 240 dakika muamele edilen hücrelerin zamana bağlı uyarılmasında farklı cevaplar alınmıştır. Kontrol grubununun 240. dakikasına göre CCh 240. dakikada inhisyon belirlenmiştir. EGF'nin etkisinde ise 0.dakika 120.dakikada EGF grubu ile karşılaştırıldığında pERK/ERK ekspresyonunda anlamlı artış saptanmıştır. EGF'nin 120. dakikadaki grubuna göre 120.dakika CCh grubunda pERK/ERK ekspresyonunda inhibisyon belirlenmiştir.

Cabadak ve ark. önceki çalışmalarında, %1 veya %10 serumlu ortamda karbokole maruz kalan K562 hücrelerinde DNA sentezinin inhibe olduğu gösterilmiştir (Cabadak ve ark., 2011). Karbakolün 24.saatteki inhibe edici etkisinin atropin ve 4DAMP ile geri çevirildiği gösterilmiştir (Cabadak ve ark., 2011). Ancak Serumsuz ortamda karbakol'un K562 hücre çoğalmasını uyardığı (DNA sentezinin arttığı) gösterilmiştir (Cabadak ve ark., 2011).

Farklı konsantrasyonlarda karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde c fos ekspresyonu 1 µM karbakol varlığında kontrole göre artarken, 100 µM karbakol ile muamele edilen hücrelerde c-fos ekspresyonunda kontrole göre

azalma eğilimi görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EGF ile muamele edilen hücrelerde c fos ekspresyonu artma eğilimindedir ancak aradaki fark anlamlı bulunamamıştır ( $P>0.005$ ).

EGF ailesinin ligandları HaCaT (human epidermal keratinocytes) hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının önemli regülatörleri olduğu gösterilmiştir (Maas-Szabowski ve ark 2003). HaCaT hücrelerinde CCh ve EGF ile ERK'in aktivasyonu, EGFR kinaz inhibitörü PD 153035 ile ERK fosforilasyon seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. K562 hücrelerindeki bu çalışmada ise CCh, EGF ve inhibitörler ERK ekspresyon düzeyinde herhangi bir değişime sebep olmamıştır. Ayrıca, EGFR'nin ekspresyonunda ve fosforilasyonunda değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

McCole ark, bağırsak epitel hücrelerinin CCh, EGF ve TGF-alfa ile uyarılmasının düşük derecede EGFR fosforilasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir (McCole ve ark., 1996). Bu çalışmada ise K562 hücrelerindeki bulgularımızda herhangi anlamlı değişim belirlenmemiştir.

Farklı konsantrasyonlarda karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde EGFR ekspresyonu 1  $\mu$ M karbakol varlığında kontrole göre artarken, 100  $\mu$ M karbakol ile muamele edilen hücrelerde EGFR ekspresyonunda kontrole göre daha da fazla artış belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EGF ile muamele edilen hücrelerde EGFR ekspresyonunda kontrole göre inhibisyon eğilimi görülmüş ancak bu değişim anlamlı bulunamamıştır. PD153035 inhibitörü ve/veya karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde pERK/ERK ekspresyonu karbakol ve PD153035 varlığında kontrole göre artma eğiliminde iken diğer gruplarda değişim gözlenmemiştir ve gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Wortmanin ve/veya karbakol ve EGF ile 30 dakika muamele edilen hücrelerde pERK/ERK ekspresyonu serumsuz grupla karşılaştırıldığında artış eğilimi olmasına rağmen anlamlı değildir.

Sonuç olarak, bu çalışmada K562 hücrelerinde EGFR, ERK, c-fos ekspresyonları belirlenmiştir ancak EGF, CCH, 4-DAMP, PD153035 inhibitörü ve wortmanin'in EGFR, ERK, c-fos protein ekspresyonunda anlamlı değişime neden olmamıştır.

## 8.KAYNAKLAR

Alberts B, Watson J.D. Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K.,Molecular biology of the cell,Third edition, Garland Publishing, New york and London., (1994).

Albert P.R. Rbillard ,L. Gprotein specificity traffic direction requard Cell Signal, 14, 407, 418., (2002).

Audrey Richter, Rory A. O'Donnell, Robert M. Powell, Michael W. Sanders, Stephen T. Holgate, Ratko Djukanovi, and Donna E. Davies. Autocrine Ligands for the Epidermal Growth Factor Receptor Mediate Interleukin-8 Release from Bronchial Epithelial Cells in Response to Cigarette Smoke. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Vol. 27, pp. 85–90., (2002).

Abraham Get u. The importance of muscarinic receptors in domestic animal diseases and therapy: Current and future perspectives. The Veterinary Journal 208 13-21, (2016).

Amenta F., Tayebati S. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. Curr. Med. Chem.;15:488–498. [PubMed]., (2008).

Andersson KE, Wein AJ. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. Pharmacol Rev:56;581-631., (2004).

Amos, S.; Martin, P.M.; Polar, G.A.; Parsons, S.J.; Hussaini, I.M. Phorbol 12-myristate 13-acetate induces epidermal growth factor receptor transactivation via protein kinase C $\delta$ /c-Src pathways in glioblastoma cells. J. Biol. Chem., 280, 7729–7738.,(2005).

Alberts et al 2008, Bonner, Buckley, Young, Brann 1987, Bonner 1989, Felder, muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes.(1995).

Arredondo J., Hall L.L., Ndoye A., Chernyavsky A.I., Jolkovsky D.L., Grando S.A. Muscarinic acetylcholine receptors regulating cell cycle progression are expressed in human gingival keratinocytes. *J. Periodontal Res.* ;38:79–89. doi: 10.1034/j.1600-0765.2003.01006.x., (2003).

Ashkenazi A., Ramachandran J., Capon D.J. Acetylcholine analogue stimulates DNA synthesis in brain-derived cells via specific muscarinic receptor subtypes. *Nature.* ;340:146–150. doi: 10.1038/340146a0., (1989).

Billington, C.K., and Penn, R.B. M3 Muscarinic acetylcholine receptor regulation in the airway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26:269-272, (2002).

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR Identification of family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237, 527-532, (1987).

Bany U, Ryzewski J, Maslinski W Relative amounts of mRNA encoding four subtypes of muscarinic receptors (m<sub>2</sub>-m<sub>5</sub>) in human peripheral blood mononuclear cells. *J Neuro Immunol* 97, 191-195. (1999).

Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1: 403 – 410. 110, (1988).

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 1987; 237: 527–532. 48.  
Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinicacetylcholine receptor genes. *Neuron*; 1: 403 – 410. 11, (1988).

Belcheva M.M., Coscia C.J. Diversity of g protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals.* ;11:34–44. doi: 10.1159/000057320. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]. (2002).

- Banu Aydın, Beki Kan, Hulya Cabadak. The role of intracellular pathways in the proliferation of human K562 cells mediated by muscarinic receptors. *Leukemia research*,;37:1144. (2013).
- Blood, Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies.; 101: 4667-79. (2003).
- Bonner 1989, Caulfield et al 1988, Hulme et al The M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Mediates p42 mapk Activation and c-fos mRNA Expression in Oligodendrocyte Progenitors. (1990).
- Bonner TI The Molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends in Neurosci.* 12, 148-151. (1989).
- Bonner TI New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacol. Sci. Suppl* 1,11-15. (1989).
- Chernyavsky, a.1.; arredondo, j. ve ark. muscarinic acetylcholine receptors regulating cell cycle progression are expressed in human gingival keratinocytes  
j. arredondo; l. l. hall; a. ndoye; a. i. chernyavsky; d. l. jolkovsky; s. a. grando (2004).
- Cheng, K.; Xie, G.; Raufman, J.P. Matrix metalloproteinase-7-catalyzed release of HB-EGF mediates deoxycholytaurine-induced proliferation of a human colon cancer cell line. *Biochem. Pharmacol.*, 73, 1001–1012. (2007).
- Cheng, K.; Zimniak, P.; Raufman, J.P. Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates cholinergic agonist-induced proliferation of h508 human colon cancer cells. *Cancer Res.*, 63, 6744–6750. (2003).
- Costa LG, Guizzetti M, Oberdoerster J, et al. Modulation of DNA synthesis by muscarinic cholinergic receptors. *Growth Factors*; 18:227-36. doi: 10.3109/08977190109029ex 112. (2001).
- Caulfield and Birdsall, 1998; Lindstrom, Caulfield and Birds all, 1998; Lindstrom (2003).

- Crespo et al., 1994; Coso et al., 1996; Hawes et al., 1996, see review by Clapham and Neer, (1997).
- Cabadak H, Aydın B, Kan B. Regulation of M2, M3 and M4 Muscarinic Receptor Expression in K562 Chronic Myelogenous Leukemic Cells by Carbachol. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 31(1):26-32, (2010).
- Canda A.E, Cross C.R, Chapple C.R. Pharmacology of the Lower Urinary Tract and Management of Overactive Bladder. *J Turkish-German Gynecol Assoc.*;7;146-57 (2006).
- Chen Q, Yu P, De Petris G, Biancani P, Behar J Distinct muscarinic receptors and signal transduction pathways in gallbladder muscle. *J Pharm Exp Ther.* 273, 650-655 (1995).
- Caulfield MP, Birdsall NJ *Pharmacol Rev.* 1998 Jun; 50(2):279-90. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors (1990).
- Cabadak H,, Küçükibrahimoğlu E, Aydın B., Kan, Gören Muscarinic receptor mediated cAMP response in human K562 chronic myelogenous leukemia cells (2009).
- Caulfield MP, Birdsall NJM International Union of Pharmacology XVII. Cattaneo, F.; Guerra, G.; Parisi, M.; de Marinis, M.; Tafuri, D.; Cinelli, M.; Ammendola, R. Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 19700–19728. [CrossRef] [PubMed] (1998).
- Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 50, 279-290.
- Daub, H.; Wallasch C.; Lankenau, A.; Herrlich, A.; Ullrich aşırı sistemleri, A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.*, 16, 7032–7044. (1997).
- Daub, H.; Weiss, F.U.; Wallasch, C.; Ullrich, A. Role of transactivation of the egf receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379, 557–560. (1996).

Ding WQ, Larsson C, Alling C. Stimulation of muscarinic receptor induces expression of individual fos and jun genes through different transduction pathways. *J Neurochem*;70:1722-9. (1998).

Peralta E. G., A. Ashkenazi, J. W. Winslow, D. H. Smith, J. Ramachandran, and D. J. Capon, "Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors," *The EMBO Journal*, vol. 6, no. 13, pp. 3923–3929,. [View at Google Scholar](#) · [View at Scopus](#) (1987).

Eglen RM, Hedge SS, Watson N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev*; 48: 531–565. (1996).

Eglen RM, Choppin A, Watson N. Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci*;22:409–14. doi: 10.1016/S0165-6147(00)01737-5 (2001).

Eglen RM. Activation Of Muscarinic Receptors By Non-Neuronal Acetylcholine (2006, 2012).

Fujii T, Kawashima K. Ca<sup>2+</sup> oscillation and c-fos gene expression induced via muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-cell lines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*;362:4-21. (2000).

Felder CC Muscarinic acetylcholine receptors: Signal transduction through multiple effectors. *FASEB J*. 9, 619-625. (1995).

Felder C. C., "Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors," *FASEB Journal*, vol. 9, no. 8, pp. 619–625, [View at Google Scholar](#) · [View at Scopus](#) (1995).

Fujii T, Tsuchiya T, Yamada S, Fujimoto K, Suzuki T, Kasahara T, Kawashima K. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res* 44: 66–72, (1996).

Felder CC., FASEB J. May; 9(8):619-25.10) Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. Hosey MM FASEB J. 1992 Feb 1; 6(3):845-52. (1995).

Felder C. C 1995., "Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors," FASEB Journal, vol. 9, no. 8, pp. 619–625,. View at Google Scholar · View at Scopus (1995).

Föye W.O, Lemke T.L.,Williams D.A.; Principles of medicinal chemistry. Williams. (1996).

Felder CC., FASEB J. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. May; 9(8):619-25. (1995).

Grando S.A., Zelickson B.D., Kist D.A., Weinschenker D., Bigliardi P.L., Wendelschafer-Crabb G., Kennedy W.R., Dahl M.V. Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: Immunolocalization and partial characterization. J. Investig. Dermatol. ;104:95–100. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613582. (1995).

Grando, S.A.; Crosby, A.M.; Zelickson, B.D.; Dahl, M.V. Agarose gel keratinocyte outgrowth system as a model of skin re-epithelization: Requirement of endogenous acetylcholine for outgrowth initiation. J. Investig. Dermatol., 101, 804–810. (1993).

Grando, S.A.; Horton, R.M.; Mauro, T.M.; Kist, D.A.; Lee, T.X.; Dahl, M.V. Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. J. Investig. Dermatol., 107, 412–418. (1996).

George Karakiulakis and Michael Roth September (2012 ). Muscarinic Receptors and Their Antagonists in COPD: Anti-Inflammatory and Antiremodeling Effects.

Goyal 1988,Hirota Goyal, S. K., 1988. A heuristic for replenishment of trended inventories considering shortages. Journal of Operational Research Society, 39, 885-887. (2001).



- Gutkind JS, Novotny EA, Brann MR, Robbins KC: Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88 (11): 4703-4707. 10.1073/pnas.88.11.4703. (1991).
- Grando 1997, Grando S.A. ve ark., Grande, Edgar and Hanspeter Kriesi 2015. The restructuring of political conflict in Europe and the politicization of European integration, pp. 190-223 in *European Public Spheres. Politics Is Back*, edited by Thomas Risse. Cambridge U Press. (1993).
- Grando S.A. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 2 (1), pp. 41–4 (1997).
- Grando S.A., *et al.* Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade. (2000).
- Gschwind, A.; Zwick, E.; Prenzel, N.; Leserer, M.; Ullrich, A. Cell communication networks: Epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene*, 20, 1594–1600. (2001).
- Grando 1997, K. Kawashima, T. Fujii The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity (2000).
- Hulme, Buckley, Birdsall, Muscarinic Receptor Subtypes (1990).
- Hosey MM *FASEB J.* Feb 1; 6(3):845-52. Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. (1992).
- Hall JM, Caulfield MP, Watson SP, Guard S. Receptor subtypes or species homologues: Relevance to drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*; 14: 376–383 (1993).
- Heitzler, D.; Crepieux, P.; Poupon, A.; Clement, F.; Fages, F.; Reiter, E. Towards a systems biology approach of G protein-coupled receptor signalling: Challenges and expectations. *Comptes Rendus Biol.*, 332, 947–957. [CrossRef] [PubMed] (2009).
- Hirota 2001, Kostenis, Zeng, Wess 1998, Lodish et al 2000, Nathanson (2001).

- Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, et al. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: Perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer*; 41:29-42 (2003).
- Hulme ve diğ., Hulme EC, Birdsall JNM and Buckley NJ. (1990). *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 30, 633- 673. Hulme EC, Birdsall NMJ, Buckley NJ. (1991). *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 30, 633- 673. (1990, 1991, 2003).
- Jiang, X.; Sinnott-Smith, J.; Rozengurt, E. Carbachol induces p70s6k1 activation through an ERK-dependent but Akt-independent pathway in human colonic epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009, 387, 521–524.
- Jones PG, Curtis CAM and Hulme EC. (1995). *Eur J Pharmacol* 288, 251-257. (1991).
- Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther*; 86:29–48, (2000).
- Kawashima ve Fujii 2004 2008 Wessler ve Kirkpatrick Kawashima K, Fujii ET. *Extra Neuronal cholinergic system in lymphocytes*. *Pharmacol Ther.* 2000;86:29–48 (2012).
- Kawashima K., T. Fujii Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes *Pharmacol. Ther* 86 (1), pp. 29–48(2000).
- Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351:289-305.
- Kamoto, D.; Rostam, ve ark. Peptidyl-prolyl isomerases: Functionality and potential therapeutic targets in cardiovascular disease (2015).
- Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 86: 29–48, (2000).
- K. Rosenblum, M. Futter, M. Jones, E. C. Hulme, and T. V. P. Bliss, “ERK1/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons,” *Journal of Neuroscience*, vol. 20, no. 3, pp. 977–985 View at Google Scholar · View at Scopus. , (2000).
- K. Wickman, G. Krapivinsky, S. Corey et al., “Structure, Gprotein activation, and functional relevance of the cardiac Gprotein-gated K<sup>+</sup> channel, I(KACh),” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 868, pp. 386–398, (1999).

- Krejci A, Michal P, Jakubik J, Rıcný J, Dolezal V Regulation of signal transduction at M2 muscarinic receptors. *Physiol Res.* 53, (supl 1) 131-140. (2004).
- Kubo ve diğerkleri. 1986a, b, Bonner ve ark., 1987, 1988, Peralta ve ark., 1987, Bonner (1989).
- Keely, S.J.; Uribe, J.M.; Barrett, K.E. Carbachol stimulates transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T 84 cells. *J. Biol. Chem.*, 273, 27111–27117. (1998).
- Keely, S.J.; Calandrella, S.O.; Barrett, K.E. Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T(84) cells is mediated by intracellular Ca<sup>2+</sup>, PYK-2, and p60(src). *J. Biol. Chem.*, 275, 12619–12625. (2000).
- Kawashima ve arkadaşları tarafından 2012; Kistemaker ve arkadaşları, (2012).
- Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Matsuo H, Hirose T, Numa S. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature a*; 323: 411–416. (1986).
- Kubo T, Maeda A, Sugimoto K, Akiba I, Mikami A, Takahashi H, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Matsuo H, Hirose T, Numa S. Primary structure of porcine primary muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett* 1986b; 209: 367–372. (1986).
- Klapproth H., Reinheimer T., Metzén J., Munch M., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., Hohle K.D., Schemann M., Racke K., Wessler I. Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* ;355:515–523. doi: 10.1007/PL00004977. (1997).
- Kajiya, M.; Ichimonji, I.; Min, C.; Zhu, T.; Jin, J.O.; Yu, Q.; Almazrooa, S.A.; Cha, S.; Kawai, T. Muscarinic type 3 receptor induces cytoprotective signaling in salivary gland cells through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol. Pharmacol.*, 82, 115–124. (2012).

- Keely, S.J.; Uribe, J.M.; Barrett, K.E. Carbachol stimulates transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T 84 cells. *J. Biol. Chem.*, 273, 27111–27117. (1998).
- Krause M. and Baumann M. Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanism, precilical and clinical results. *Radiotherapy and Oncology*, 72(3): 257-66(2004).
- K. Wickman, G. Krapivinsky, S. Corey et al., “Structure, Gprotein activation, and functional relevance of the cardiac Gprotein-gated K<sup>+</sup> channel, I (KACH),” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 868, pp. 386–398, (1999).
- Kubo ve diğerleri. 1986a, b, Bonner ve ark., 1987, 1988, Peralta ve ark., 1987, Bonner (1989).
- Kamoto, D.; Rostam, M.A.; Bernard, R.; Piva, T.J.; Mantri, N.; Guidone, D.; Zheng, W.; Osman, N.; Little, P.J. The expansion of GPCR transactivation-dependent signalling to include serine/threonine kinase receptors represents a new cell signalling frontier. *Cell. Mol. Life Sci.*, 72, 799–808. [CrossRef] [PubMed] (2015).
- Iwasaki, H.; Eguchi, S.; Marumo, F.; Hirata, Y. Endothelin-1 stimulates DNA synthesis of vascular smooth-muscle cells through transactivation of epidermal growth factor receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 31 (Suppl. 1), S182–S184. (1998).
- Ibanez TI, Miwa JM, Wang HL, et al Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxinlynx1. *Neuron*;33:893-903. doi: 10.1016/S0896- 6273(02)00632-3. (2002).
- Lozzio BB & Lozzio CB. Properties of the K562 cell line derived from a patient with choronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 19:136-143. (1977).
- Larsson C, Gustavsson L, Simonsson P, Bergman O, Alling C. Mechanisms of muscarinic receptor-stimulated expression of c-fos in SH-SY5Y cells. *Euro J Pharmacology*;268:19-28. doi: 10.1016/0922-4106(94)90116-3. (1994).

- Lopez-Illasaca, M.; Crespo, P.; Pellici, P.G.; Gutkind, J.S.; Wetzker, R. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase  $\gamma$ . *Science*, 275, 394–397 (1997).
- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR (1991) Identification of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype specific antibodies. *J.Neurosci.* 11, 3218- 3226.
- Liem AA, Chamberlain MP, Wolf CR, Thompson AM. The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *EJSO* 2002; 28:679-84
- Levey AI ve ark. (1991). Hirota 2001, Kostenis ve ark. 1998, Lodish et al 2000, Nathanson (2001).
- L. Chang, M. Karin Mammalian MAP kinase signalling cascades *Nature*, 410 (6824), pp. 37–40. (2001).
- M. P. Caulfield and N. J. M. Birdsall, “International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors,” *Pharmacological Reviews*, vol. 50, no. 2, pp. 279–290, View at Google Scholar · [View at Scopus](#) (1998).
- M. M. Hosey, “Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors,” *FASEB Journal*, vol. 6, no. 3, pp. 845–852, View at Google Scholar · View at Scopus (1992).
- Matsui M, Yamada S, Oki T, Manabe T, Taketo MM, Ehlert F Functional analysis of muscarinic acetylcholine receptors using knockout mice. *Life Sci.* 75, 2971-2981. (2004).
- Maas-Szabowski, N.; Starker, A.; Fusenig, N.E. Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in hacat cells is initiated by TGF- $\alpha$ . *J. Cell. Sci.*, 116, 2937–2948. (2003).
- McCole, D.F.; Truong, A.; Bunz, M.; Barrett, K.E. Consequences of direct versus indirect activation of epidermal growth factor receptor in intestinal epithelial cells are dictated by protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.*, 282, 13303–13315. (2007).

- Maretzky, T.; Evers, A.; Zhou, W.; Swendeman, S.L.; Rafii, S.; Reiss, K.; Blobel, C.P. Migration of FGF7-stimulated epithelial cells and VEGF-A-stimulated HUVECs depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nat. Commun.*, 2, 1–25. (2011).
- McCole, D.F.; Keely, S.J.; Coffey, R.J.; Barrett, K.E. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in colonic epithelial cells by carbachol requires extracellular release of transforming growth factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, 277, 42603–42612. (2002).
- Nathanson NM Muscarinic acetylcholine receptors. *Encyclopedia of Life Sci.* 1-6, doi: 10.1038/npg.els.0000193. (2001).
- Nave K.A., Probstmeier R., Ssachner M: Epidermal Growth Factor does not Cross the Blood - Brain Barrier, *The Journal of Investigative Dermatology*. 94 (5) 624-62 (1985).
- Nathanson MN., A multiplicity of muscarinic mechanisms: Enough signalling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci*. 97, 6245-6247. (2000).
- Peralta E. G., A. Ashkenazi, J. W. Winslow, D. H. Smith, J. Ramachandran, and D. J. Capon, “Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors,” *The EMBO Journal*, vol. 6, no. 13, pp. 3923–3929, (1987).
- Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373, 573–580. [CrossRef] [PubMed] (1995).
- Prenzel, N.; Zwick, E.; Daub, H.; Leserer, M.; Abraham, R.; Wallasch, C.; Ullrich, A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 402, 884–888. (1999).
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ *Nat Rev Mol Cell Biol*. Sep; 3(9):639-50. (2002).

- Pawson, T. Protein-tyrosine kinases-new impressions of SRC and HCK. *Nature*, 385, 582–585. [CrossRef] [PubMed] (1997).
- Prenzel, N.; Zwick, E.; Daub, H.; Leserer, M.; Abraham, R.; Wallasch, C.; Ullrich, A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 402, 884–888. (1999).
- Resende and Adhikari see reviews by, 2009; Shah et al., 2009; Kawashima et al., 2012; Kistemaker et al., (2012).
- Rosenblum K, Futter M, Jones M, Hulme EC, Bliss TV *J Neurosci. Feb 1; 20(3):977-85*. ERKI/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. (2000).
- R. M. Eglén and S. R. Nahorski, “The muscarinic M5 receptor: a silent or emerging subtype?” *British Journal of Pharmacology*, vol. 130, no. 1, pp. 13–21, View at Google Scholar · [View at Scopus](#) (2000).
- Raufman JP, Shant J, Xie G, Cheng K, Gao XM, Shiu B, Shah N, Drachenberg CB, Heath J, Wess J: Muscarinic receptor subtype-3 gene ablation and scopolamine butylbromide treatment attenuate small intestinal neoplasia in *Apcmin/+* mice. *Carcinogenesis*. 2011, 32 (9): 1396-1402. 10.1093/carcin/bgr118.(2011).
- R.R. Resende, *et al.* Role of acetylcholine receptors in proliferation and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells *Exp. Cell Res.*, 314 (7), pp. 1429–1443(2008).
- R.R. Resende, *et al.* Mechanism of acetylcholine-induced calcium signaling during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells *in vitro* *Cell Calcium*, 43 (2), pp. 107–121(2008).
- R.R. Resende, A. Adhikari Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation *Cell Commun. Signal*, 7, p. 20
- Sorkin, A.; Goh, L.K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* 2009, 315, 683–696. [CrossRef] [PubMed] (2009).
- Sastry BV, Sadavongvivad C. Cholinergic systems in nonnervous tissues. *Pharmacol*

Rev; 30:65-132, (1978).

Scarpero HM, Dmochowski MD Muscarinic receptors: What we know. *Current Urology Reports* 4, 421-428. (2003).

S. M. Forsythe, P. C. Kogut, J. F. McConville et al., "Structure and transcription of the human m3 muscarinic receptor gene," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 26, no. 3, pp. 298–305, View at Google Scholar · View at Scopus (2002).

Shah N., Khurana S., Cheng K., Raufman J.P. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*;296:C221–C232. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] (2009).

Sgard F., Charpentier E., Bertrand S., Walker N., Caput D., Graham D., Bertrand D., Besnard F. A novel human nicotinic receptor subunit,  $\alpha 10$ , that confers functionality to the  $\alpha 9$ -subunit. *Mol. Pharmacol.*;61:150–159. doi: 10.1124/mol.61.1.150. (2002).

Stirnweiss, J.; Valkova, C.; Ziesche, E.; Drube, S.; Liebmann, C. Muscarinic M2 receptors mediate transactivation of EGF receptor through Fyn kinase and without matrix metalloproteases. *Cell Signal.*, 18, 1338–1349. (2006).

Song P, Sekhon HS, Proskocil B, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER. Synthesis of acetylcholine by lung cancer. *Life Sci*; 72:2159-2168, (2003).

Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman JP. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*;296:221-32. doi: 10.1152/ajpcell.00514.2008. (2009).

Scarpero HM, Dmochowski MD Muscarinic receptors: What we know. *Current Urology Reports* 4, 421-428. (2003).

Tansey E.M., Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C.R. Biologies.*;329:419–425. [[PubMed](#)] (2006).



- Tsai W.; Morielli, A.D.; Peralta, E.G. The M1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *EMBO J.*, 16, 4597–4605. (1997).
- Trejo J, Brown JH. c-fos and c-jun are induced by muscarinic receptor activation of protein kinase C but are differentially regulated by intracellular calcium. *J Biol Chem*;266:7876-82. (1991).
- Trombino S, Cesario A, Margaritora S, Granone P, Motta G, Falugi C, et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: role of mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res*; 64:135-145, (2004).
- Ukegawa J.I., Y. Takeuchi. S. Kusayanagi, K. Mitamura. Growth-Promoting Effect Of Muscarinic Acetylcholine Receptors In Colon Cancer Cells (2003).
- Van Zivieten PA, Doods HN Muscarinic receptors and drugs in cardiovascular medicine. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 9, 159-167. (1995).
- Vilaro MT, Palacios JM, Mengod G Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in brain examined by insituhybridization histochemistry. *Neurosci Letters* 114 (2),154 -159. (1990).
- Wang P, Luthin GR, Ruggieri MR. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther*:273;959-66. (1995).
- Wallasch, C.; Crabtree, J.E.; Bevec, D.; Robinson, P.A.; Wagner, H.; Ullrich, A. Helicobacter pylori-stimulated EGF receptor transactivation requires metalloprotease cleavage of HB-EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295, 695–701. (2002).
- Wang Z, Shi H, Wang H., Functional M3 muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts. *Br J Pharmacol.* 142, 395-408. (2004).

- Wessler, C.J. Kirkpatrick, K. Racke Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans *Pharmacol. Ther.*, 77 (1), pp. 59–79 (1998).
- Wessler I., Kirkpatrick C.J. Acetylcholine beyond neurons: The non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* 2008;154:1558–1571. doi: 10.1038/bjp.185. [PMC free article] [PubMed][Cross Ref] (2008).
- William S., K., Cummings M., R., *Genetik Kavramlar*, , (Çev.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636p. (2000).
- Yasuda RP, Cielsa W, Flores LR, Wall SJ Li M, Satkus SA, Weisstein JS, Spangola BV, Wolfe BB Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol.* 43 (2),149-157. (1993).
- Yasuda RP, Cielsa W, Flores LR, Wall SJ Li M, Satkus SA, Weisstein JS, Spangola BV, Wolfe BB Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol.* 43 (2),149-157. (1993).
- Yang-Seo Park, Nam Jeong Cho EGFR and PKC are involved in the activation of ERK1/2 and p90 RSK and the subsequent proliferation of SNU-407 colon cancer cells by muscarinic acetylcholine receptors. (2012).
- Qian N.X., Russell M., Johnson G.L. Acetylcholine muscarinic receptor regulation of the Ras/Raf/MAP kinase pathway. *Life Sci.* ;56:945–949. doi: 10.1016/0024-3205(95)00032-2. (1995).

EK-1

Düzenleyen  
Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve  
Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Derneği

**5.** **KÖK HÜCRE SEMPOZYUMU**

*8 Nisan 2016, İstanbul*

**Ord. Prof. Dr. Reşat Kaynar Salonu**  
**Marmara Üniversitesi, Haydarpaşa Kampüsü**

*Sempozyum Başkanı*  
**Prof. Dr. Tunç AKKOÇ**

Organizasyon Sekreteryası  
**Göknil Pelin COŞKUN**

**Katılım ücretsizdir**

[www.kokhucresempozyumu.org](http://www.kokhucresempozyumu.org)

ps-4 insan kronik myeloid eritrolösemi hücrelerinde epidermal growth faktörün ve kolinerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin mapk sinyal iletimindeki rolü 1selda güler, 2banu aydın, 3hülya cabadak 1marmara üniversitesi ,tıp fakültesi,biyofizik, 34854, maltepe,istanbul seelda@live.com kolinerjik sistem aracılı aktive olan map kinaz sinyal kaskadında anahtar oyuncularından biri epidermal büyüme faktör reseptörüdür. epidermal büyüme faktör reseptörü tirozin kinaz ailesi üyesi olup bu reseptörler çeşitli sinyal yolları ile aktive olmaktadır. farklı araştırmacılar çeşitli g protein kenetli reseptörlerin uyarımından sonra epidermal büyüme faktör reseptörü'nun aktive olduğunu belirtmişlerdir (1,2). insan kronik miyeloid eritrolösemi hücre soyu ile yapılan çalışmalarda m2, m3 ve m4, muskarinik reseptör alt tipleri gösterilmiştir. muskarinik agonist karbakol serumsuz kültür ortamında hücre çoğalmasını uyarmaktadır. serum varlığında ise hücre çoğalması inhibe olmaktadır. ayrıca eritrolösemi hücre soyu olan k562 hücrelerinde muskarinik reseptör aracılı pkc, no, camp, c-fos ve ca<sup>2+</sup> çalışmaları ile reseptörün fonksiyonel olduğu belirlenmiştir (3,4). bu çalışmanın amacı insan eritrolösemi hücrelerinde epidermal büyüme faktörü ve muskarinik reseptör agonisti karbakol'un mitojenle aktive olan kinaz (mapk) aktivasyonunda rolünü belirlemektir. atc'den alınmış k562 hücreleri 24 h serumsuz ortamda kültür edildikten sonra kolinerjik agonist karbakol, epidermal büyüme faktörü, karbakol ve epidermal büyüme faktörü ile farklı süreler uyarı yapılmıştır. inkübasyondan sonra hücreler toplanarak homojenatlar hazırlanmıştır. mapk aktivasyonunu saptamak üzere erk/perk ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. farklı hücre grupları %12'lik sds-page jelinde yürütüldükten sonra western blot yöntemi ile membranlara aktarılmıştır. erk, perk antikoları ile etkileştirilerek veriler elde edilmiştir. kolinerjik sistem aracılı erk aktivasyonunda epidermal büyüme faktörünün rolü erk/perk protein ekspresyon düzeyinde belirlenmiştir. insan kronik miyeloid eritrolösemi hücre soyunda karbakol zamana bağlı olarak perk/erk ekspresyonunda artış belirlenirken epidermal büyüme faktörü ile 30 dakikada ekspresyonun inhibe olduğu belirlenmiştir. muskarinik reseptör aracılı mitojenle aktive olan protein kinaz aktivasyonunda epidermal büyüme faktör (egf)' rolünün belirlenmek üzere agonist, antagonist ve/veya epidermal 17 büyüme faktörü ile kombine yapılan deneylerde kontrol grubuna göre muskarinik m3 reseptör antagonisti 4damp perk/erk ekspresyonunu azaltmıştır. muskarinik m3

reseptörlerinin antagonist ile kapatılması erk ekspresyonunu etkilemiştir. ayrıca tek başına egf de perk/erk ekspresyonunu azaltmıştır. karbakol ile karbakol ve egf karşılaştırıldığında ise daha fazla inhibisyon belirlenmiştir. bu çalışma hem kolinerjik hem de epidermal büyüme faktör reseptörlerinin insan kronik miyeloid eritrolösemi hücre soyunda da mapk yolağında etkileri olduğunu göstermiştir anahtar kelimeler: k562 hücreleri, mapk, büyüme faktör teşekkür: bu çalışma marmara üniversitesi tıp fakültesi biyofizik anabilim dalı öğrencisi selda güler'in yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir kaynaklar 1-daub 1997, prenzel n 1999 daub, h.; wallasch, c.; lankenau, a.; herrlich, a.; ullrich, a. signal characteristics of g protein-transactivated egf receptor. *embo j.* 1997, 16, 7032 7044. 2-cheng, k.; zimniak, p.; raufman, j.p. transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates cholinergic agonist-induced proliferation of h508 human colon cancer cells. *cancer res.* 2003, 63, 6744–6750. 3-cabadak h, aydın b, kan b. regulation of m2, m3 and m4 muscarinic receptor expression in k562 chronic myelogenous leukemic cells by carbachol. *journal of receptors and signal transduction*, 31(1):26-32, 2010. 4- banu aydın, beki kan, hulya cabadak. the role of intracellular pathways in the proliferation of human k562 cells mediated by muscarinic receptors. *leukemia research*, 2013;37:1144.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Selda	<b>Soyadı</b>	Güler
<b>Doğum Yeri</b>	Eminönü	<b>Doğum Tarihi</b>	31/05/1989
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>Tel</b>	05344842578
<b>E-mail</b>	seelda@live.com	<b>Ev Tel</b>	02125948153

## Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet yılı</b>
<b>Y.Lisans</b>	Marmara Üniversitesi	2013-2016
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi	2013
<b>Ön Lisans</b>	Aydın Üniversitesi	2016
<b>Lise</b>	Plevne Anadolu Lisesi	2004

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İngilizce	İyi	Orta	İyi

	<b>Sayısal</b>	<b>Sözel</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>
<b>Ales Puanı</b>	70,564	62	62,627

## Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
Temel ve ileri ofis programları	İyi

