

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO CART EKSPRESYONU ÜZERİNDE NİKOTİN ETKİLERİ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

Müzeyyen UĞUR

DANIŞMAN

Prof. Dr. Lütfiye KANIT

İZMİR 2014

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO CART EKSPRESYONU ÜZERİNDE NİKOTİN ETKİLERİ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

Müzeyyen UĞUR

13SBE06

DANIŞMAN

Prof. Dr. Lütfiye KANIT

İZMİR 2014

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı

İmza

Başkan : Prof.Dr. Lütfiye KANIT
(Danışman)

.....

Üye : Doç.Dr. Oğuz GÖZEN

.....

Üye : Doç. Dr. Petek BALLAR
KIRMIZIBAYRAK

.....

Yedek Üye : Prof. Dr. Ersin O. KOYLU

.....

Yedek Üye : Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM

.....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

2010 yılında stajımı yapmak için ilk başvurduğum andan itibaren her zaman yanımda olan, beni dinleyen, yol gösteren, öğrencileri için elinden gelen her türlü iyiliği/yardımlarını esirgemeyen, danışmanım Sayın Prof. Dr. Lütifiye KANIT,

Yüksek lisans öğrenimim süresince pek çok moleküler düzeydeki laboratuvar çalışmasını bize öğreten; tez çalışmalarımız süresince günün her saati sabırla yardımlarını esirgemeyen, yanımızda olan, tezimi yönlendiren hocam Sayın Doç. Dr. Oğuz GÖZEN,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilimsel desteği ve sağladığı olanaklar için hocam Sayın Prof. Dr. Ersin KOYLU,

Yüksek lisans öğrenimim sırasında tanıştığım ve iki yıl boyunca birlikte geçirdiğimiz anları dolu dolu yaşadığımız, tez çalışmam sırasında da yardımlarını esirgemeyen, yıllar önce kaybettiğim kız kardeşim olmalı dediğim sevgili dostum Hasibe ŞAHİN,

Ve

Hem uzağımda olup hem de çok yakınımda olmayı başaran canım ailem

başta olmak üzere....

Tezimin deney aşamalarında laboratuvarlarını bize açan ve yardımcı olan hocam Sayın Doç. Dr. Petek BALLAR ve doktora öğrencisi Yalçın ERZURUMLU'ya

Tezimin yazım aşamalarında fikirleri ve yardımlarıyla yanımda olan arkadaşlarım Ar. Gör. Alper ERDOĞAN ve Ar. Gör. Meltem KARATAŞ'a

Tez çalışmamda kullandığım hücreleri temin ettiğimize yardımcı olan hocam Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ'e

Bu bölümde geçirdiğim 4 yıl boyunca bana ev sahipliği yapan tüm Fizyoloji Ab. D ailesine

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

2014

Müzeyyen UĞUR

Bu çalışma Ege Üniversitesi 2011 TIP 019,

Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 13SBE06

ve Aliye Üstel Vakfı projeleri tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

İN VİTRO CART EKSPRESYONU ÜZERİNDE NİKOTİN ETKİLERİ

Müzeyyen Uğur
Yüksek Lisans Tezi, Sinirbilim Anabilim Dalı,
Tez Yöneticisi: Prof. Dr Lütfiye Kanıt
Aralık 2014

CART ve nikotin bağımlılık, stres, iştahın düzenlenmesi, kilo alımı gibi aynı homeostatik ve fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. CART ve nikotin ile ilişkili pek çok çalışma yapılmış olmasına karşın literatürde ikisinin bir arada olduğu bir çalışma bulunmamakta, dolayısı ile birbirleri ile olan olası etkileşimleri bilinmemektedir. Bu çalışmada nikotinin CART promotörü üzerindeki etkisi in vitro olarak araştırılmıştır.

PC12 hücreleri NGF ile farklılaştırılmasının ardından nikotin uygulaması yapılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak, hücre içi cAMP miktarını arttırdığı bilinen forskolin kullanılmıştır. Farklı dozlarda nikotin uygulanan PC12 hücrelerinden 6 ve 24. saatlerde ölçüm alınarak nikotinin CART promotörü üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

Çalışma sürecinde NGF ve forskolinin sinerjik etki göstererek CART promotör aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Uygulanan nikotin dozlarından düşük doz (50 nM) nikotinin, 6 saatlik süreçte CART promotör aktivitesini arttırdığı; yüksek dozun (1 μ M) ise CART promotör aktivitesini azalttığı görülmüştür. Uzun süreli (24 saat) ilaç uygulamasında ise 6 saat 50 nM nikotin de görülen promotör aktivite artışı kontrol seviyesine dönmüştür. Uygulanan nikotin dozlarından 300 nM ve 1 μ M'ın CART promotör aktivitesini azaltıcı yönde etki ettiği görülmüştür. Forskolin ise ölçüm alınan her iki zaman diliminde de promotör aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırmıştır.

Nikotin düşük dozda uygulandığında kısa zaman aralığı içinde CART promotör aktivitesini arttırdığı; yüksek dozlarda ve uzun süre nikotin uygulanması durumunda ise promotör aktivitesinin azalttığı görülmüştür. Bu bifazik etki nAChR'lerinin duyarlılaşma (sensitization) ve duyarsızlaşmasından (desensitization) kaynaklanıyor olabilir.

Anahtar Sözlükler: nikotin; CART; PC12 hücre hattı; nAChR

muzeyyenugur@gmail.com

ABSTRACT

NICOTINE EFFECT OF IN VITRO CART EXPRESSION

CART and nicotine have roles in the same homeostatic and physiological processes such as addiction, stress, regulation of appetite and weight gain. Although there is a large amount of research related with CART and nicotine in literature, studies concerned with both CART and nicotine are scarce. Interactions of CART and nicotine have not been evaluated yet. In this thesis, we studied effects of nicotine on CART promoter *in vitro*.

After PC12 cells were differentiated with NGF, nicotine treatment was done. Forskolin, which is known to increase intracellular levels of cAMP, was used as positive control. Effect of nicotine on CART promoter was assessed by obtaining samples at 6 and 24 hours after the treatment of cells with different doses of nicotine.

In this study, synergistic effect of NGF and forskolin treatment on CART promoter and CART promoter's increased activity were demonstrated. Low dose nicotine treatment (50 nM) was found to increase CART promoter activity at 6 hours, whereas high dose (1 μ M) nicotine treatment resulted in a decrease of CART promoter activity. Prolonged (24h) drug administration reversed the increased activity seen at 6 hours with 50 nM nicotine, returning it to baseline levels. CART promoter activity decreased with nicotine treatment at 300 nM and 1 μ M doses (24h). Forskolin significantly increased CART promoter activity at both time points (6h and 24h).

We have shown that although low-dose short-term nicotine treatment increases CART promoter activity, high-dose or prolonged low dose nicotine treatment decreases the activity. This biphasic effect may be due to sensitization and desensitization of nAChRs.

Keywords: nicotine; CART; PC12 cells line; nAChRs.

İçindekiler

ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET.....	iii
BÖLÜM I.....	1
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
1.1 Hücre Sinyal İletimi.....	3
1.1.1 Hücre-Hücre Sinyal İletim Tipleri.....	3
1.1.2 Sinyal İletim Molekülleri.....	4
1.1.3 Hücre Yüzey Reseptörleri.....	4
1.1.4 Hücre İçi Sinyal İletim Yolakları.....	7
1.2 Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri.....	10
1.2.1 Nikotinik Asetilkolin Reseptörlerinin Tarihi.....	10
1.2.2 nAChR'lerinin Yapısı.....	12
1.2.3 nAChR'lerinin Duyarsızlaşması " <i>Desensitization</i> ".....	15
1.3 Nikotin.....	17
1.3.2 Nikotinin Etki Mekanizması.....	18
1.3.3 Nikotin ile İlişkili Fizyolojik Süreçler.....	20
1.4 Kokain Amfetamin Regülatör Transkripti (CART).....	24
1.4.1 CART Geni ve Promotorunun Yapısı.....	24
1.4.2 CART Peptidinin Tarihi ve İlişkili Olduğu Fizyolojik Süreçler.....	27
1.5 PC12 Hücre Hattı.....	31
1.6 Haberci Sistemler.....	33
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	36
2.1 Kullanılan Plazmit DNA'lar.....	36
2.1.1 Transformasyon protokolü.....	38
2.1.2 Plazmit DNA İzolasyonu.....	39
2.2 Transfeksiyon.....	41
2.3 PC12 Hücre Hattının Büyütülmesi.....	45
2.3.1 Kollaj Kaplama.....	45
2.3.2 Çalışmada Kullanılan İlaçların Hazırlanması.....	47
2.3.3 PC12 Hücrelerinin Büyütülmesi.....	47
2.3.4 Pasaj.....	48
2.3.5 PC12 Hücrelerinin Farklılaştırılması ve İlaç Uygulamaları.....	49

2.5 İstatiksel analiz.....	49
BÖLÜM III	50
BULGULAR	50
3.1 PC12 Hücreleri NGF ile Farklılaşmaktadır.....	50
3.2 PC12 Hücre Hattında CART Gen İfadesi Gerçekleşmektedir	50
3.3 Forskolin CART Promotorunu Aktive Etmektedir	51
3.4 NGF CART Promotor Aktivitesine Katkıda Bulunmaktadır	52
3.5 Altı Saat Süresince Farklı Dozlarda Nikotin Uygulaması CART Promotoru Üzerine Bifazik Etki Etmektedir.....	53
3.6 Farklı Dozlarda 24 Saat Nikotin Uygulanması CART Promotor Aktivitesini Azaltmaktadır.....	54
TARTIŞMA.....	56
BÖLÜM V	62
SONUÇ VE ÖNERİLER	62
BÖLÜM VI	63
KAYNAKÇA.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	70

ŞEKİL ve GRAFİK DİZİNİ

Şekiller Dizini

ŞEKİL 1: Tirozin kinaz reseptörlerine ligand bağlanması.	6
ŞEKİL 2: GPCR, tirozin kinazlar ve her ikisi ile birden etkinleştirilen 5 paralel hücre içi sinyal iletim yolağı.....	10
ŞEKİL 3: nAChR'lerinin yapı ve düzenlenişi.....	13
ŞEKİL 4: Omurgalılarda bulunan nAChR'leri	14
ŞEKİL 5: Nikotinin moleküler yapısı	17
ŞEKİL 6: CART peptit sekansının 5 farklı canlı türünde karşılaştırılması.....	24
ŞEKİL 7: CART peptidinin evrimsel süreçte korunmuşluk derecesi	26
ŞEKİL 8: CART promotorunun yapısı	27
ŞEKİL 9: CART promotrunun mCherry haberci sistemine bağlı olduğu pDNA bölgesi	34
ŞEKİL 10: Çalışmada kullanılan pDNA'nın CART promotorunun Gaussia Lusiferaz haberci sistemine bağlı olduğu kısım.....	34
ŞEKİL 11: Gaussian Lusiferaz haberci sistemi aracılığı ile gerçekleşen kimyasal tepkime sonucu ışık açığa çıkmaktadır	35
ŞEKİL 12: Çalışmada kullanılan CART geninin promotor bölgesinin 'Gaussian Lusiferaz' haberci genine bağlı olduğu plazmit DNA'nın yapısı.	37
ŞEKİL 13: Çalışmada kullanılan CART geninin promotor bölgesinin 'mCherry' haberci genine bağlı olduğu plazmit DNA'nın yapısı.....	38
ŞEKİL 14: Transfeksiyon optimizasyonu.	44
ŞEKİL 15: PC12 hücreleri 20x inverted mikroskop görüntüleri.	50
ŞEKİL 16: PC12 hücrelerinin 4x mikroskop görüntüleri.	51
ŞEKİL 17: Transfeksiyondan 48 saat sonra PC12 hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri.	52

Grafik Dizini

GRAFİK 1: Transfekte hücrelere NGF, forskolin, NGF+forskolin uygulaması.	52
GRAFİK 2: Altı saat ilaç uygulamasının luminometrik ölçümleri.....	53
GRAFİK 3: Yirmidört saat ilaç uygulamasının luminometrik ölçümleri.	54

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

aa: aminoasit

ACh:Asetilkolin

AChR: Asetilkolin reseptörleri

AChBP: Asetilkolin bağlayan protein

ACTH: adrenokortikotropik hormon

ADHD: dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu

Akt:Protein kinaz B

ARC: Arkuat nukleus

ATP: adenzin trifosfat

AVP: Arjinin vazpressin

bç:baz çifti

cAMP: siklik adenzin monofosfat

CaM: kalsiyum kalmodulin

CART: Cocaine amphetamine regulated transcript

CMP: cytomegalovirus

CO: karbonmonooksit

CORT: kortikosteron

CRE: cAMP response element

CREB: cAMP response element binding protein

CRH: corticotropin-releasing hormone

CPP: conditioned place preference

DAG: diaçil gliserol

DMSO: dimetilsülfoksit

EGF: epidermal growth factor

ER: *estrogen receptor*

ERK: extracellular signal regulated kinase

FBS: fetal dana serumu

FSH: folikül uyarıcı hormon

GDP: guanozin difosfat

GH3: sıçan hipofiz hücre hattı

GTP: guanozin trifosfat

HPA: Hipotalamus-hipofiz-adrenal aks

HS: at serumu

ICV: intraserebroventriküler

IP₃: inozitol trifosfat

JNK: c-Jun N-terminal kinaz

Kana: kanamisin

LH: luteinize edici hormon

MAPK: mitogen activated protein kinase

MSS: merkezi sinir sistemi

NAc: nukleus akumbens

NTS: nukleus traktus solitarius

NYP: nöropeptit Y

NRSF: Neuron-Restrictive Silencer Factor

nAChR: nikotinik asetilkolin reseptörleri

NGF: neuron growth hormon

NO: nitrik oksit

Nt: nükleotit

PACAP38: Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide

pDNA: plazmit DNA

PC12: feokromositoma hücre hattı

PIP₂: fosfatidil inozitol difosfat

PKA: protein kinaz A

PLC: fosfolipaz C

POMC:proopiomelanokortin

Puro: puromisin

PVN: paraventiküler nukleus

RPM: Revolution per minute

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640

TrkA: tirozin kinaz A reseptörü

UCP: eşleşmemiş protein

VMN: ventral medial nukleus

VTA: ventral tegmental alan

Semboller

CO: karbon monooksit

Ca⁺²: kalsiyum

K⁺: potasyum

Mg⁺²: magnezyum

Na⁺: sodyum

NaOH: sodyum hidroksit

NO: nitrik oksit

BÖLÜM I

GİRİŞ

Nikotin, nikotinik asetilkolin reseptörlerinin ekzojen agonistidir. Tütün bitkisinden elde edilen nikotin ilk olarak 16. yüzyılda Avrupa'da kullanılmaya başlanmış olup, 20. yüzyılda kullanımı yaygınlaşmış olan bağımlılık yapıcı bir maddedir. Nikotinin vücuttaki etki yerleri kas-sinir kavşağı, otonomik ganglionlar ve merkezi kolinerjik sinapslardır (1).

Nikotinik asetilkolin reseptörleri Na^+ ve diğer katyonların geçişine izin veren pentamerik yapıdaki kimyasal kapılı bir iyon kanalı olup ACh'nin α altüniteye bağlanması ile aktif hale gelmektedir. Nöronal nikotinik asetilkolin reseptörleri merkezi ve periferel sinir sistemi nöronlarının soma, dentrit ve terminalinde, PC12 hücrelerinde ve adrenal medullada ifade edilmektedir.

CART kokain ve amfetamin gibi psikostimulan maddelerin kullanımı ile beyinde miktarı artan bir transkript olarak keşfedilmiştir (2). Lokalizasyon çalışmaları ile CART peptidinin beyinde limbik bölgelerden prefrontal korteks, hipotalamus, amigdala da; beyin sapında ise nukleus solitorius ve parabrakial nukleusta ifade edildiği görülmüş olup (3) ödül ve pekiştirme, beslenme, endokrin ve otonomik regülasyon ve anksiyete gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynadığı gösterilmiştir (4) .

Nikotin ve CART bağımlılık, stres, enerji metabolizması, iştah ve kilo alımı gibi bir çok homeostatik ve fizyolojik süreçte rol oynamakta olup, birbirleri ile etkileşimleri henüz bilinmemektedir. Bağımlılık süreçleri ile ilişkili süreçlerde rol oynadığı bilinen CART peptidinin, nikotin bağımlılığı ile ilişkisi henüz araştırılmamıştır Enerji metabolizması ve kilo alımı ile ilişkili süreçlerde rol oynayan CART peptidi ve nikotinin günümüzün en yaygın sağlık problemlerinden biri olan obezite üzerindeki etkilerinin araştırılması bakımından CART ve nikotinin etkileşimlerinin araştırılması önemlidir.

Sunulan tez çalışmasında amaç nikotinin CART geni üzerinde bir etkisinin olup olmadığını in vitro şartlar altında gözlemlemektir. Çalışmada sıçan adrenal bezinden türevlenmiş olan PC12 hücre hattı NGF (neuron growth factor) ile farklılaştırılarak kullanılmıştır. PC12 hücreleri NGF ile farklılaştırıldıklarında sempatik nöron özelliği

kazanmaktadır (5). PC12'nin nAChR'leri taşıyor olması ve farklılaşmaları ile taşıdıkları nAChR sayısı ve alttip çeşitliliğinin artması nedeni ile bu çalışmada kullanılması tercih sebebi olmuştur.

Forskolin *Plectranthus barbatus* adındaki bir bitkiden elde edilen, adenilat siklazı aktive ederek hücre içi cAMP miktarının artışına yol açtığı için hücre fiziolojisi ile ilişkili çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir ajandır. Forskolinin cAMP-PKA-CREB sinyal yolağı üzerinden CART promotorunu aktive ettiği bilinmektedir (6), bu nedenle sunulan çalışmada nikotinin CART promotoru üzerindeki olası etkisi; forskolin etkisi ile karşılaştırıldı.

Çalışmada CART gen promotorunun 1188 nükleotitlik kısmının gaussia lusiferaz ve mCherry haberci genlerine bağlı olduğu iki farklı haberci sistem kullanılmıştır. Bunlardan mCherry floresan bir protein olup, floresan mikroskop altında çalışmaya olanak sağladığı için deneyin optimizasyonunda kullanılmıştır. CART gen promotorunun aktive olması ile promotorun devamında yer alan mCherry floresan protein geni de aktive olarak floresan mikroskop altında 587 nm dalga boyundaki ışık ile uyarılarak; 610 nm dalga boyunda ışık yayarak gözlem yapılmasına olanak sağlamaktadır (7). Bu sayede etkili transfeksiyon oranı ve transfeksiyon etkinliği değerlendirilebilmektedir. Lusiferaz haberci sistemi ise kimyasal bir tepkimenin sonucunda ışık enerjisinin ortaya çıkması sonucu ölçüm alınmasına olanak sağlayan hassas bir sistemdir. CART gen promotorunun bağlı olduğu lusiferaz geni, CART promotorunun aktive olması ile aktif hale geçmekte ve bunun sonucunda lusiferaz enzimi sentezlenerek hücre dışına salınmaktadır. Bu sayede istenilen zaman aralıklarında hücrelerin içinde bulunduğu besin ortamından belli bir miktar alınarak, ölçüm yapılmak istenen zamana kadar (7 gün kadar) +4°C'de saklanabilmekte, ölçüm yapılmak istendiğinde ortama substratın eklenmesi sonrası gerçekleşen kimyasal tepkime sonucunda açığa çıkan ışık enerjisi luminometre aracılığı ile ölçülmektedir (8).

GENEL BİLGİLER

1.1 Hücre Sinyal İletimi

Tüm hücreler çevrelerinden sinyaller alır ve bu sinyallere yanıt verirler. Birçok sinyal iletim molekülünün reseptörlerine bağlanması, hücre metabolizması, hareketi, çoğalması, sağkalımı ve farklılaşması gibi hücre davranışlarını düzenleyen bir seri hücre içi reaksiyonu başlatır .

1.1.1 Hücre-Hücre Sinyal İletim Tipleri

Hücre sinyal iletimi hücrenin komşusu ile doğrudan etkileşimi ya da salgılanan bir hücre sinyal molekülü aracılığı ile gerçekleşir. Hücre-hücre sinyal iletimi otokrin, parakrin, sinaptik (nöronal) ileti, endokrin, nöroendokrin sinyal iletimi şeklinde 5 gruba ayrılmaktadır. Bazı hücre tipleri kendi ürettikleri sinyal ileti moleküllerine yanıt verdiği ileti tipi **otokrin sinyal iletimi** olup (Shvartsman, Wiley, Deen, & Lauffenburger, 2001), omurgalı bağışıklık sistem hücrelerinin yabancı antijenlere yanıtıdır; bazı T lenfosit tipleri antijenik uyarılara yanıt olarak kendi çoğalmalarını uyaran bir büyüme faktörü sentezlerler, böylece antijene yanıt oluşturan T lenfosit sayısı artar (9). **Parakrin sinyal iletiminde**, bir hücreden salınan bir molekül hücre dışı sıvıya geçerek komşu hedef hücreleri etkiler (10). **Sinaptik (nöral) ileti**, sinir hücresi sinyalleri sinaps adı verilen özelleşmiş temas bölgelerinde bir hücreden diğer hücreye iletilir. İki sinir hücresi sinaptik aralık ile birbirlerinden ayrılmıştır (11). Sinaps öncesi hücreden ekzositoz ile salınan nörotransmitter adı verilen küçük sinyal molekülleri sinaptik aralığa yayılır ve sinaps sonrası hücrenin ligand kapılı iyon kanallarına bağlanır. Böylece sinaps sonrası hücrede elektriksel bir değişim gerçekleşir. **Endokrin sinyal iletiminde** sinyal iletim molekülü olan hormonlar, özelleşmiş olan endokrin hücrelerde sentezlenip, dolaşım sistemi ile taşınarak vücutta uzak hedef hücreler üzerinde etki göstermektedirler. **Nöroendokrin sinyal iletiminde**, arka hipofizden hipotalamusa uzanan aksonlardan salınan oksitosin ve vazopresin buradan dolaşım sistemine katılırlar; ön hipofizden *medial eminence*'ye uzanan aksonlar burada içerdikleri TSH, ACTH, FSH, LH gibi hormonları salarlar ve bu hormonlar buradan portal dolaşıma katılarak hipotalamustan ilgili hormonların salınmasını uyarırlar (10).

1.1.2 Sinyal İletim Molekülleri

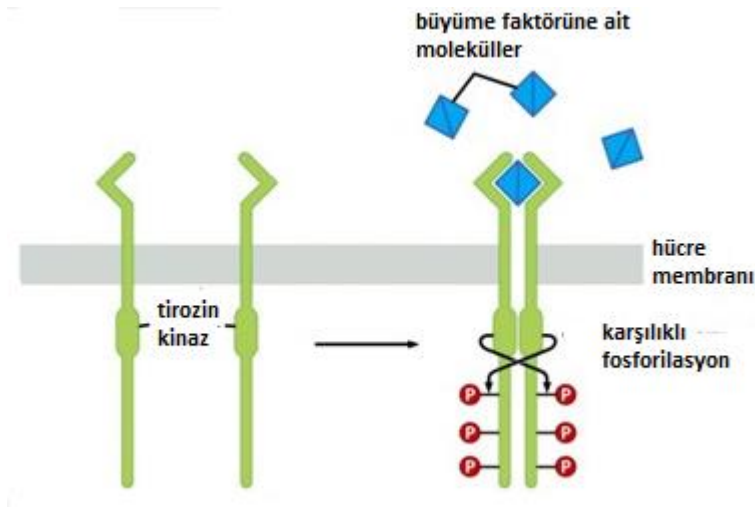
Steroid hormonlar, nitrik oksit ve karbon monoksit, nörotransmitterler, peptit hormonlar ve büyüme faktörleri hücreler arası iletimde görev yapan sinyal iletim molekülüdür. **Steroid hormonlar**, kolestrolde sentezlenmekte olup; hidrofobik özelliklerinden dolayı difüzyon ile hücre içine giren ve sitozol ya da nükleustaki reseptörlerine bağlanan molekülüdür. **NO ve CO**, steroid hormonlar gibi hücre içine difüzyon ile girerek ilişkili oldukları sinyal yollarını aktive edebilmektedir (12). **Nörotransmitterler**, nöronlar arasında ve sinir kas kavşağındaki sinyalleri taşıyan molekülüdür. Asetilkolin, dopamin, serotonin, epinefrin, histamin, glutamat, glisin ve GABA hidrofilik nörotransmitterlerdir. Hidrofilik nörotransmitterler uyarılan bir nöronda aksiyon potansiyelinin akson boyunca taşınması sonrası akson terminalinden salınarak hedef hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmaktadır. Çoğu nörotransmitter reseptörü, ligand kapılı iyon kanalıdır. Nörotransmitterin reseptöre bağlanması, iyon kanalının açılmasını sağlayan bir konformasyonel değişikliği uyarır böylece hedef hücre içinde iyon akışı değişir (11). Diğer nörotransmitter reseptörleri, hücre yüzey reseptörleri ile çeşitli hücre içi yanıtlar arasındaki bağlantıyı sağlayan ana sinyal iletim molekül gruplarından , G proteinler ile birlikte çalışmakta olup, G proteinleri ilişkili oldukları nörotransmitter reseptörünün aktivitesini indirekt olarak düzenlerler (13). **Peptit hormonlar ve büyüme faktörleri**, boyutları birkaç aminoasit ile yüzden fazla aminoasit arasında değişen aminoasitten oluşmaktadır. İnsülin, glukagon ve hipofiz bezi tarafından üretilen büyüme hormonları gibi peptit hormonlar ve NGF, epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri bu grupta olup hücre yüzey reseptörüne bağlanarak etki gösteren molekülüdür (14).

1.1.3 Hücre Yüzey Reseptörleri

Nörotransmitterler, peptit hormonlar ve büyüme faktörleri gibi hücre-hücre sinyal iletiminden sorumlu birçok ligand hedef hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanarak hedef hücre üzerine etki etmektedir. Hücre yüzey reseptörleri, iyonotropik reseptörler, G-protein ile eşleştirilmiş membran reseptörleri, enzimle eşleştirilmiş reseptör olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadırlar. **İyonotropik reseptörler**

(ligand kapılı iyon kanalları) elektriksel olarak uyarılabilen hücrelerde bulunurlar. Bu sinyal iletiminde nörotransmitter olarak bilinen sinir ileticilerin geçici süre için iyon kanalına bağlı kalarak iyon kanalı aktivitesini yönlendirdiği ileti tipidir. **G-protein ile eşleştirilmiş reseptörler**, sinyalleri hücre içi hedeflerine G proteini olarak adlandırılan guanin nükleotit bağlayan proteinler aracılığı ile iletirler. Reseptörün hücre dışı bölümlerine ligandların bağlanması reseptörün sitozoldeki bölgesinin plazma zarının iç yüzeyine bağlı bir G proteini ile birleşmesini sağlayan konformasyonel değişikliğe neden olur. Bu etkileşim G proteinini uyarır , uyarılan G proteini reseptörden ayrılarak sinyali hücre içi hedefe taşır. G proteinleri α, β, γ olarak tanımlanan 3 alt birim içermesi nedeniyle heteromerik G proteinleri olarak adlandırılmaktadırlar. Alfa alt birim G proteinin aktivitesini düzenleyen guanin nükleotitlere bağlanır. Dinlenme halinde α alt birimi, β, γ ile kompleks halinde GDP'ye bağlanır. Kimyasal iletili bağlanması, reseptörde şekil değişikliğini uyarır. Alfa alt birim β, γ alt birimden ayrılarak GTP'ye bağlanır. Hem aktif GTP-bağlı α alt birim hem de β, γ kompleksi hücre içi yanıt oluşturmak üzere hedefleri ile etkileşime girerler (15). **Enzimle eşleştirilmiş reseptörler** aktive olduklarında ya doğrudan enzim gibi işlev gören ya da ilişkili olduğu bir enzim aracılığı ile aktif hale gelen reseptörler olup; guanilat siklaz reseptörleri, tirozin kinaz reseptörleri, tirozin kinaz ilişkili reseptörler ve serin treonin kinaz reseptörleri olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. **Guanilat siklaz reseptörlerinin** birinci haberciyi bağlayan hücre dışı bölge ile katalitik aktivite gösteren hücre içi bölgesi bulunur. Birinci haberci (natriüretik peptid (ANP))'nin bağlanması ile birlikte reseptörün 3 boyutlu yapısı değişerek katalitik bölgesi aktiflenir böylece GTP (guanilat tri fosfat), cGMP (siklik guanilat mono fosfat)'a dönüşür. cGMP, cGMP bağımlı protein kinaza (PKG) bağlanarak onu aktive eder. Aktif hale gelen PKG'nin hedef proteinleri fosforillemesi sonucu hücre yanıtı gelişir (16). **Tirozin kinaz ilişkili reseptörler**, substrat proteini tirozin amino asidinden fosforilleyen reseptör protein kinazlar'dır. Çoğu reseptör tirozin kinaz ilişkili reseptör aracılığı ile gerçekleşen sinyal iletiminde, ilk basamak ligand tarafından uyarılan reseptör dimerizasyonudur. NGF gibi bazı büyüme faktörleri kendileri birebir aynı iki polipeptit zincirinden oluşan dimerlerdir; bu büyüme faktörleri iki farklı reseptör molekülüne eş zamanlı olarak bağlanarak doğrudan dimerizasyonu uyarırlar. Ligand tarafından uyarılan dimerizasyon dimerize

polipeptit zincirlerinin karşılıklı olarak birbirlerini fosforillemesi ile reseptörün otofosforilasyonuna neden olur. Katalitik bölgedeki tirozin fosforillenmesi protein kinaz aktivitesini arttırmaktadır; katalitik bölge dışındaki tirozin bölge rezidülerinin fosforillenmesi ise hücre içi sinyalleri, aktif reseptörden aşağı yöndeki moleküllere iletilecek ek proteinler için özgün bağlanma bölgeleri vardır. Bu proteinlerin otofosforile reseptörler ile etkileşimi, böylece büyüme faktörlerinin hücre yüzeyine bağlanması ile başlatılan sinyallerin hücre içine iletiminde ilk basamağı oluşturmaktadır (17).



ŞEKİL 1: Tirozin kinaz reseptörlerine ligand bağlanması. Ligand bağlanması ile tirozin kinaz reseptörleri dimerize olur ve reseptöre ait sitosolik zincirler birbirlerini fosforiller . (The Biology of Cancer -R Weinberg. Sf 137)

Tirozin kinaz ilişkili reseptörler, kendileri enzimatik aktiviteye sahip olmayıp kovalent bağlar ile etkileşimde oldukları, hücre içi protein kinazları uyararak işlev gösteren reseptörlerdir. Çoğu hormon ve bazı polipeptit hormon reseptörleri sitokin reseptör süperailisi üyesidir (18). Sitokin reseptörleri aracılı sinyal iletiminde ilk basamak ligand tarafından uyarılan reseptör dimerizasyonudur, dimerizasyonu takiben protein tirozin kinazlar reseptörü fosforillerler (19). **Serin/Treonin kinaz reseptörleri**, bu reseptörlere bağlanan en önemli birinci haberci başkalaştırıcı büyüme faktörü β (TGF β)'dir. TGF β 'nın reseptöre bağlanması ile birlikte reseptör zincirleri oligomerize olur. Oligomerize olan reseptör zincirleri birbirleri üzerindeki serin/treoninleri fosforile eder. Böylece reseptör zincirinin kinaz aktivitesi aktiflenir

ve transkripsiyon faktörlerinden Smad proteinlerini bağlayarak fosforiller. Fosforillenmiş Smad proteini reseptörden ayrılarak başka bir Smad proteine bağlanır. Oluşan Smad kompleksi nukleusa girerek gen transkripsiyonunu uyarır (16).

1.1.4 Hücre İçi Sinyal İletim Yolakları

Hücre içi enzimler, ligand bağlanması ile başlayan sinyalleri yayan ya da amplifiye eden aşağı yöndeki sinyal iletim elemanları olarak iş görürler. Çoğu durumda, bir reaksiyon zinciri, sinyalleri hücre yüzeyinden çok çeşitli hücre içi hedeflere iletmektedir, bu sürece hücre içi sinyal iletimi denir. Sinyal iletim yolaklarının hedefleri genellikle gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Böylece, hücre içi sinyal ileti yolakları hücre yüzeyini nukleusa bağlar; bu bağlantı hücre-dışı uyarılara yanıt olarak gen ekspresyonu değişikliğine yol açmaktadır (20).

1.1.4.1 cAMP Yolağı

cAMP (siklik AMP) adenil siklaz etkisi ile ATP den oluşmakta ve fosfodiesteraz tarafından AMP'ye parçalanmaktadır (21). Ligand bağlanması reseptörün enzimatik aktivitesini uyaracak adenili siklaz ile eşleşir ve adenil siklaz aktive olur böylece hücre içi cAMP konsantrasyonu artar. cAMP'nin etkileri cAMP-bağımlı protein kinaz ya da protein kinaz A etkisi ile düzenlenir. Protein kinaz A'nın inaktif formu 2 katalitik, 2 düzenleyici altbirimden oluşan bir tetramedir. cAMP'nin düzenleyici altbirime bağlanması katalitik altbirimlerin ayrılmasına yol açar. Böylece serbest katalitik alt ünite enzimatik olarak aktif olur ve hedef proteinleri serin rezidülerinden fosforilleyebilir.

cAMP artışı çoğu hayvan hücresinde cAMP yanıt elemanı olarak bilinen CRE olarak adlandırılan özgün hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Nükleus içinde protein kinaz A, CREB (CRE-bağlanan protein) olarak adlandırılan ve cAMP tarafından uyarılan genlerin aktivasyonunu sağlayan bir transkripsiyon faktörünü fosforiller. cAMP tarafından gen ifadesinin bu şekilde düzenlenmesi, çok çeşitli hayvan hücrelerinin proliferasyonun, sağ kalım ve farklılaşmalarının kontrolünde önemli rol oynar.

1.1.4.2 Fosfolipitler ve Kalsiyum

Çeşitli hormon ve büyüme faktörleri fosfolipaz C aracılığı ile bir zar fosfolipiti olan fosfotidil inozitol 4,5-bifosfat (PIP_2) hidrolizini uyarırlar ve böylece diaçilgliserol (DAG) ve inozitol 1-4-5-trifosfat (IP_3) açığa çıkar (22).

PIP_2 , DAG ve IP_3 kaynağı olarak iş görmesinin yanı sıra hücre sağkalımının düzenlenmesinde anahtar rol oynayan sinyal yollarının başlatma noktasında yer almaktadır. PIP_2 fosforilasyonu sonucunda bir diğer ikinci mesajcı olan fosfotidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP_3) oluşur. PIP_3 'ün ana hedefi hücre sağkalım sinyalleri için kritik olan ve Akt olarak adlandırılan bir protein serin/treonin kinazdır. PIP_3 , Akt'nin plekstrin homoloji bölgesi olarak bilinen bir proteine bağlanır. Akt fosforilasyonu ve aktivasyonu sonucu hücre sağkalım düzenleyicileri, transkripsiyon faktörleri ve diğer protein kinazları da kapsayan çok sayıda hedef protein fosforillenir.

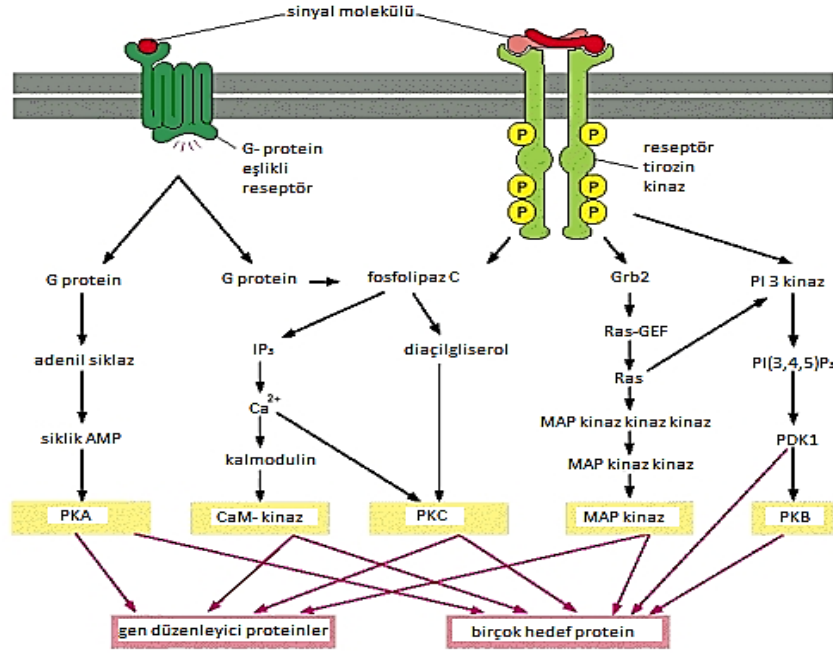
DAG ve IP_3 aşağı yöndeki protein kinaz C ve Ca^{+2} yollarını uyarırlar. DAG ürünleri, PKC ailesinde yer alan, hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolünde önemli roller oynayan, protein serin/treonin kinazları aktive eder. IP_3 hücre içi depolardan Ca^{+2} salınım sinyalleri oluşturur. Sitozoldeki Ca^{+2} konsantrasyonunun 1 μM 'a kadar artması protein kinaz ve fosfotazları da içeren çok sayıda hedef protein aktivitesini de etkiler.

Hücre içi serbest Ca^{+2} birçok etkisini Ca^{+2} bağlayan bir protein olan kalmodulin üzerinden göstermektedir. Kalmodulin, sitozoldeki Ca^{+2} konsantrasyonu 0.5 μM 'a kadar arttığı zaman aktive olur. Ca^{+2} /kalmodulin ile aktive edilen diğer protein kinazlar, metabolik enzimleri, iyon kanallarını ve transkripsiyon faktörlerini de içeren birçok farklı proteini fosforilleyen CaM kinaz ailesi yer almaktadır. CaM kinazlar transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek gen ekspresyonunu düzenleyebilirler. CaM kinaz tarafından fosforillenen sinyal yollarından bir tanesi protein kinaz A tarafından fosforillenen CREB'dir. Bunun yanı sıra adenil siklaz ve fosfodiesterazlar Ca^{+2} /kalmodulin tarafından da fosforillenmekte; Ca^{+2} kanalları cAMP aracılığı ile de

düzenlenmekte ve çok sayıda hedef protein hem protein kinaz A hem de Ca^{+2} / kalmodulin bağımlı protein kinaz tarafından fosforillenmektedir. Dolayısı ile çok sayıda hücrel yanıtın düzenlenmesinde cAMP ve Ca^{+2} sinyal ileti yolları koordine olarak çalıştığı görülmektedir.

1.1.4.3 Ras, Raf ve MAP Kinaz Yolağı

MAP kinazlar (mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinazlar) çok sayıda büyüme faktörü ve diğer sinyal iletimi molekülü uyarımına yanıt veren bir protein serin/treonin kinaz ailesi olup transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna yol açarak hücre yüzeyi ile nükleus arasında indirekt olarak etkileşim sağlarlar (23). Memeli hücrelerinde farklı hücrel yanıtları düzenleyen birçok MAP kinaz sinyal yolağı vardır. Her yolak kendi aktivitesini düzenleyen üç protein kinaz içerir: Raf, Ras (MEK analogu) ve bir terminal MAP kinaz (24). Memeli hücrelerinde üç ana grup MAPK tanımlanmıştır, büyüme faktörlerine yanıt olarak aktive edilen ERK ailesi üyeleri, inflamatuvar sitokinlere ve hücrel strese yanıt olarak aktive edilen JNK ve p38 MAP kinazları. ERK sinyal iletimi çoğunlukla hücre proliferasyonu, sağ kalımı ve farklılaşmasına yol açarken; P38 ve JNK MAP kinaz yolakları sıklıkla inflamasyon ve hücre ölümüne neden olmaktadır (25, 26).



ŞEKİL 2: GPCR, tirozin kinazlar ve her ikisi ile birden etkinleştirilen 5 paralel hücre içi sinyal iletim yolağı. *Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Sf 883 (16)*

1.2 Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

1.2.1 Nikotinik Asetilkolin Reseptörlerinin Tarihçesi

Nikotinik asetilkolin reseptörleri kimyasal kapılı iyon kanalları süper ailesinin üyesidir. Farklı genler tarafından kodlanan çoklu alt ünitelerden oluşmaktadırlar. Her bir nikotinik kolinerjik reseptör, reseptör uyarıldığı zaman Na^+ ve diğer katyonların geçişine izin veren merkezi kanalı oluşturan 5 alt ünitelerden oluşmaktadır. 5 alt ünite rozet şeklinde bir yapı oluşturmakta merkezdeki por iyon kanalı olarak görev yapmaktadır. İki asetilkolin (ACh) molekülü pentamer yapıdaki nAChR'inde alfa alt ünitelerindeki spesifik sekanslarına bağlandığında katyonlara spesifik kanal yaklaşık olarak 1 milisaniye içerisinde açılmakta; elektrokimyasal grandiente bağlı olarak hücre içerisine iyon girişi gerçekleşmekte, membran depolarizasyonunu takiben kolinerjik sinapslarda sinyal iletimi gerçekleşmektedir (27).

Asetilkolin , endojen bir sinyal bileşeni olup kalp hızını yavaşlatan bir bileşen olarak 1914 yılında Otto Levi ve Hendry Dale tarafından keşfedilmiş ve tanımlanmıştır. Bu buluş ile Otto Levi ve Hendry Dale 1936 yılında fizyoloji ve tıp

alanında Nobel ödülünü almışlardır (28) Asetilkolin beyinde primer olarak nöromodulatör görev üstlenmekte: nöronal uyarılabilirliğini ve nörotransmitterlerin presinaptik salımını değiştirmekte, nöron gruplarının ateşlenmesini koordine etmekte bunun yanı sıra sinaptik plastisiteye de katkıda bulunmaktadır; periferde ise primer eksitatör nörotransmitter olarak görev yapmakta: otonom gangliyonlarda ve sinir-kas kavşağında hızlı tepki verilmesinde rol oynamaktadır (29) .

1857'de Fransız Fizyolog Claude Bernard nöromuskuler kavşaklardaki iletimi ilk olarak açıkladığı zamanlarda sinir iletiminin karmaşıklığı ve nikotine duyarlı reseptörler hemen hemen hiç bilinmiyordu. Claude Bernard kasa, bitki toksini ve nikotinic blokaj ajanı kürarı uygulayıp, elektriksel olarak uyardığında kasın paralize olduğunu göstermiştir. Kürar reversible olarak reseptöre bağlanan, doğal bir blokaj ajanıdır. Bernard kürarı yıkadığında, motor sinirdeki fonksiyonun normale dönerek iletimin gerçekleştiğini göstermiştir.

1921'de Otto Loewi "vagusstoff" adımı verdiği kalp atım frekansını kontrol eden çözülebilir bir madde gösterdi. Vagus sinir sonlanmasında ACh ile gerçekleşen iletimin doğasının anlaşılmasını sağlayarak farmakoloji alanında önemli bir gelişme meydana getirmiş oldu. Kolinerjik ileti reseptörün nikotine ya da muskarine duyarlı oluşuna göre nikotinic ya da muskarinic olarak alt birimlere ayrıldı (30). Sinirsel iletimin bu iki şekli reseptörlerin tanımlanması ile ilişkili çalışmalara katkıda bulundu. Muskarinic (ligand kapılı) ve nikotinic reseptörler (iyonotropik) aileleri keşfedildi (31).

Amanita muscaria adındaki mantarda bulunan muskarin mAChR'lerine geri dönüşümsüz olarak (irreversible) bağlanan, seçici olmayan agonistidir. mAChR'leri farmakolojik ve moleküler olarak M1-M5 olmak üzere 5 altiple ayrılmıştır. Muskarinic reseptörler kalpte, solunum yollarında, gastrointestinal sistemde, üriner yollarda, göz ve ekzokrin bezlerde bulunarak (32); ACh ile kalp atışı ve kan basıncının düzenlenmesinde, damarların gevşemesinde, vücut ısısının ayarlanması gibi fizyolojik süreçlerde fonksiyon göstererek hem merkezi hem de periferel sinir sisteminin motor ve otonom sinir sisteminin kontrolünde rol oynamaktadır (Messer, Bohnett, & Stibbe, 1990).

nAChR'lerinin aktivasyonu ile gerçekleşen kolinerjik iletinin anlaşılmasında sinir kas kavşağı uzun bir süre favori model olarak kullanıldı. *Torpedo marmorata* gibi balıkların elektriksel organları çok miktarda reseptör içermektedir, ayrıca büyük kas hücreleri fizyolojik kayıtlar ve biyokimyasal deneyler için uygundur. Sir Bernard Katz tarafından sinir kas kavşağı ile yapılan çalışmalar sinirsel iletinin anlaşılmasında temel oluşturmuştur. 1978'de Erwin Neher ve Bert Sakmann patch clamp yöntemini kullanarak tek kanal aktivitesini ilk olarak göstermişlerdir (33).

1.2.2 nAChR'lerinin Yapısı

Nikotinic asetilkolin reseptörleri, kimyasal sinaptik iletiye aracılık eden serotonin (5-HT₃), GABA_A, GABA_C ve glisin reseptörlerinin de içinde bulunduğu pentamerik ligand kapılı iyon kanalları süper ailesi üyesidir (34).

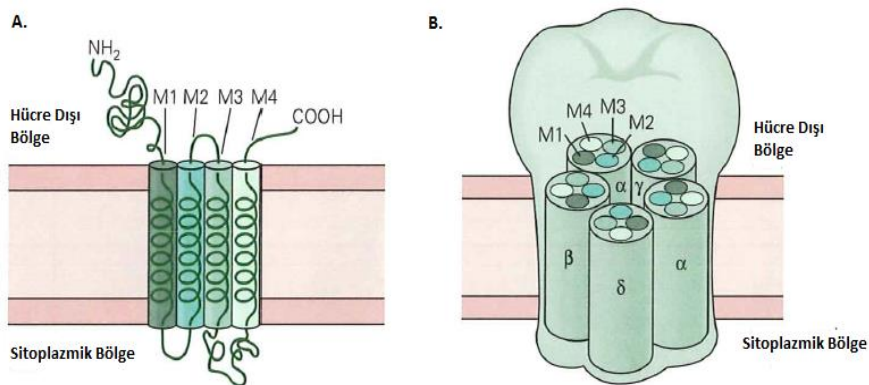
nAChR'leri kas ve nöronal tip olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kas tip nAChR'leri sinir-kas kavşağında ve *Torpedo californica* gibi balıkların elektrik organlarında bulunmaktadır. Nöronal nAChR'leri hetero- ve homomerik yapıda olup pre- ve postsinaptik sinir terminallerinde bulunmaktadır (34).

Torpedo'nun reseptörleri ile yapılan çalışmalar nAChR'lerinin genel yapısı hakkında bilgi edinilmesine yardımcı olmuştur. Torpedo'nun büyük seriler oluşturan dejenere plak uçlarından 600V'a kadar çıkan elektrik boşaltımı sağlanmaktadır. Tek bir plak ucunda sağlanan voltaj mV aralığındayken, sinir kas kavşağı büyük gruplar halinde sağlanan elektriksel boşaltım çok yüksek voltajlara çıkmaktadır. Torpedo'nun elektrik organından elde edilen protein ve elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarla nAChR'lerinin yapısı ve moleküler ağırlığı belirlenmiştir (35).

Uç plaktan saflaştırılan proteinleri yapay iki tabakalı sistem arasına koyduklarında bu proteinlerin iyonik porlar ve ligand bağlama bölgeleri oluşturduğunu göstermişlerdir. Elektrik organdan elde edilen pseudokristalize yapıdan 4 angstrom rezolüsyonlu görüntülerde nAChR'lerinin, membran içersinde 5 altüniteden oluşan merkezinde küçük bir iyonik por bulunan, yapısı gösterildi (31). Beş alt ünite 16 farklı gen tarafından kodlanan 16 bilinen alt üniteden (α 1- α 10, β 1-

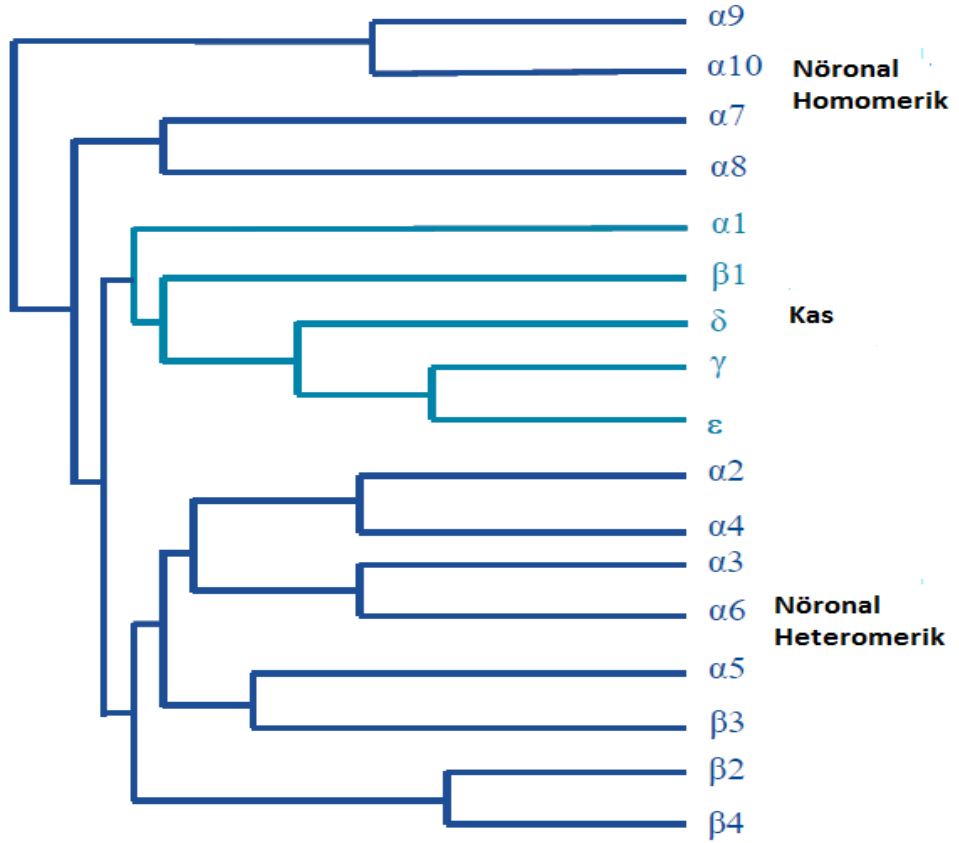
β 5, γ , δ , ϵ) meydana gelmektedir (36). α alt üniteler CHRNA (1–10), β alt üniteler CHRNB (1–4), γ CHRNG, δ CHRND ve ϵ CHRND genleri tarafından kodlanmaktadır. Tüm alt üniteler, membranı kat eden α -sarmal yapıdaki dört domainden oluşur (M1-M4), yaklaşık 200 aminoasitten oluşan korunmuş, ekstraselüler büyük bir NH₂-terminal domain ACh bağlanma bölgesini de içermekte olup, dördüncü transmembran domaini diğerlerine göre daha kısa olup ekstraselüler COOH-terminal sekansını içermektedir (28, 37).

nAChR'lerinde ACh bağlanma bölgesinin moleküler düzeyde açıklanması ve nAChR'lerinin agonist ve antagonistleri ile olan moleküler etkileşimlerinin ortaya konmasında AChBP (ACh bağlayan protein) ile yapılan çalışmalar önemlidir. AChBP'nin üç boyutlu yapısı bir yumuşakça olan *Lymnaea stagnalis*'in glial hücrelerinden salgılanan proteinin kristalize halde elde edilebilmesi ile gerçekleşmiştir. Bu küçük suda çözünebilir protein ACh'a yüksek afinite göstermektedir (38). nAChR'leri gibi AChBP de 5 altüniteden oluşmaktadır (pentamerik yapı). Yapı ve organizasyonu nAChR'lerinin ekstraselüler N-terminal domainine önemli ölçüde benzemektedir. AChBP, nAChR'lerinin ekstraselüler ACh bağlayan domaininin 3 boyutlu organizasyonunun tanımlanmasına ve reseptörün α -alt biriminin agonist ve antagonistleri ile olan etkileşimlerinin açıklanmasına olanak sağlamıştır (34).



ŞEKİL 3: nAChR'lerinin yapı ve düzenlenişi. A. AChR altünitelerinin genel yapısı. B. AChR altünitelerinin düzenlenmiş hali (37)

Homopentamerler nAChR'lerinin basit formlarıdır, bu reseptörler merkezi ve periferel sinir sisteminde geniş bir dağılım göstermektedir ve birçok fizyolojik fonksiyona katkıda bulunmaktadır. Heteromerik reseptörler 2 veya daha çok alt ünitelerden oluşmaktadır. Fizyolojik ve farmakolojik özellik ve fonksiyonlar açısından geniş bir spektrum göstermektedir. Otonom sinir sisteminde $\alpha 3$, $\beta 4$; CNS'de $\alpha 4$, $\beta 2$; periferel sinir sisteminde $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 4$ yaygın olarak görülmektedir. Beyin gelişimi sırasında ve hasar modellerinde bazı anahtar alt ünitelerin ekspresyonlarının duruma bağlı olarak düzenlendiği görülmüştür; örneğin, prenatal beyinde ve hasarlı nöronlarda $\alpha 3$ ekspresyonu artarken, erişkin beyinde ya da sağlıklı nöronlarda $\alpha 3$ ekspresyonu azalır $\alpha 4$ ekspresyonunun arttığı görülmüştür (28).



ŞEKİL 4: Omurgalılarda bulunan nAChR'leri

Herbir α alt ünitesinin asetilkolin için bağlanma bölgesi vardır. Asetilkolin α alt ünitelerden birine bağlandığı zaman proteinin konformasyonu değişir ve kanal açılır. Böylece Na^+ 'a ve diğer katyonlara olan geçirgenlik artar.

Memeli sempatik nöronlarındaki nAChR'lerinin aktive olması ile non-selektif katyon kanalları açılmakta ve hücre içine Na^+ girmektedir; böylece membran depolarizasyonu gerçekleşmekte ve voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları açılmaktadır. Ca^{+2} akışı direkt olarak nAChR'leri üzerinden indirekt olarak ise voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları aracılığı ile gerçekleşerek; transmitter salımının nikotinic modülasyonu, sinaptik plastisite yanı sıra nöronların hayatta kalmaları, farklılaşmaları ve göçleri ile ilişkili süreçlere de etki etmektedir (28).

Nikotinic reseptör aktivitesi depolarizasyona neden olmakta ve bunun yanı sıra Ca^{+2} gibi divalent katyonların geçirgenliğine etki ederek önemli fizyolojik süreçlere neden olmaktadır. Kalsiyumun sodyuma göre hesaplanmış geçirgenlik oranı kaslardaki nAChR'lerinde ~ 0.1 , heteromerik nöronal reseptörlerde ~ 2.0 ve $\alpha 7$ gibi homomerik ile $\alpha 9/\alpha 10$ gibi heteromeriklerde ise ≥ 10 'dir (39).

1.2.3 nAChR'lerinin Duyarsızlaşması "Desensitization"

nAChR'lerinin endogen agonisti ACh'dir. Agonistin reseptöre bağlanması ile iyon kanalı açık konformasyona geçer ve iyon akışı gerçekleşir. Birkaç milisaniye sonra reseptör konformasyonu değişir ve kanal kapanarak reseptör dinlenim konformasyonuna ya da duyarsız konformasyona geçer.

nAChR'leri, uzun süreli ya da tekrar eden agoniste maruz bırakılmaları sonucunda duyarsızlamakta ve bunun sonucunda iyon kanalı inaktive olmaktadır. Duyarsızlaşma temel olarak agonist bağlanmasına ve ortamda agonist bulunmasına rağmen reseptörün inaktif durumda kalmasıdır (39). Kronik olarak agonist uygulanması sonucu duyarsızlaşmaya karşı verilen homeostatik cevap reseptör sayısının artmasıdır (40).

Nikotinic AChR alttıplerinin farklı kombinasyonları, lokalizasyonları ve altünitelerin aminoasit sekansları, uygulanan agonistin dozu ve kinetiği nAChR'nün açılması-kapanması ve duyarsızlaşmasına etki etmesinin (40) yanı sıra agonistin bağlanması, antagonist afinitesi, iyon geçirgenliği, iletkenlik kinetiği, reseptör duyarsızlaşma derecesi ile ilişkili olup farklı farmakolojik, fizyolojik ve biyokimyasal süreçler üzerine etkilidir (41).

Kolinerjik sinapslarda sinaptik aralığa ACh salındıktan sonra birkaç milisaniye içinde ortamda yüksek konsantrasyonda ACh varken $\alpha 4\beta 2$ nAChRlerinin ACh'a olan afinitesi yüksek olup, yavaşça duyarsızlaşmaktadır; $\alpha 7$ 'nin duyarsızlaşma hızı ise yüksektir. $\alpha 4\beta 2$ nAChR'leri $0.1 \mu\text{M}$ 'ın altındaki agonist konsantrasyonlarında yavaşça duyarsızlaşmakta, $\alpha 7$ nAChR'leri ise $1 \mu\text{M}$ altındaki agonist konsantrasyonlarında etkili bir şekilde duyarsızlaşmamaktadır (42, 43) .

Nikotik asetilkolin reseptörlerinin duyarsızlaşmasının modülasyonu ekzojen ve endojen maddeler ile reseptör yapılarının kovalent modifikasyonları ile gerçekleşmektedir. Modülatörler nonkompetitif blokerler, kalsiyum, timüs ile ilişki hormon peptitleri (timopietin ve timopentin), P maddesi (substance P), kalsitonin gen ilişkili peptit ve reseptör fosforilasyonudur. Fosforilasyon önemli bir posttranslasyonel modifikasyondur; çeşitli protein kinazlar aracılığı ile reseptör duyarsızlaşması ve regülasyonu gerçekleşmektedir. Duyarsızlaşmanın moleküler mekanizması ile ilişkili çalışmalar ilk olarak *Torpedo californica* membranında yapılmıştır. cAMP bağımlı protein kinaz ve kalsiyum kalmodulin bağımlı protein kinaz nAChR'lerinin γ ve δ alt ünitelerinin serin rezidülerinin fosforilasyonunda; PKC nAChR'lerinin α ve δ alt ünitelerinin serin rezidülerinin fosforilasyonunda; tirozin spesifik protein kinaz ise nAChR'lerinin β , γ ve δ alt ünitelerinin tirozin rezidülerinin fosforilasyonunda rol oynayarak, toplam 7 farklı nAChR bölgesi fosforlanmaktadır (27).

Memelilerin beyinlerindeki nAChR'leri dört gruba ayrılmaktadır. Tipl nAChR'leri α –bungaratoksine bağlanmakta özellikle Ca^{+2} 'a yüksek geçirgenlik gösteren $\alpha 7$ alt üniteyi içermektedir. Tip II nAChR'leri $\beta 2$ altüniteyi içermekte olup α -bungaratoksin hariç, nikotik agonistlere yüksek afinite göstermektedir. Beynin birçok bölgesinde $\alpha 4 - \beta 2$ kompozisyonu görülmektedir. TipIII nAChR'leri, temel olarak $\alpha 3$ ve $\beta 4$ altünitelerinden oluşmakta olup, bir kurbağa zehri olan epibatidine yüksek afinite gösteren; *Fabaceae* ailesine ait bazı bitki türlerinden elde edilen toksik bir alkaloid olan sitisin (cytisine) yanı sıra nikotine de elektrofizyolojik açıdan yanıt oluşturan nAChR alt ünitelerinden oluşmaktadır. TipIV nAChR'leri sitisin ve epibatidine yüksek afinite göstermekte olup, elektrofizyolojik açıdan sitisin ve sitisin benzer ya da nikotine daha fazla cevap oluşturan nAChR altünitelerinden

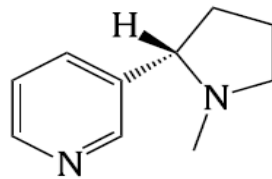
oluşmaktadır. TipIV nAChR'leri, tipIII nAChR'lerine göre yüksek doz nikotine karşı daha hızlı duyarsızlaşmaktadırlar (44).

1.3 Nikotin

1.3.1 Nikotinin Tarihçesi ve Yapısı

Nikotin Solanaceae familyasına ait patates, patlıcan, yeşilbiber, tütün bitkisi tarafından üretilen bir alkaloiddir. Tütün bitkisi şifalı ot olarak bilinip ayinler sırasında kullanılan bir gelenek haline geldiği Güney Amerika ve sonrasında Kuzey Amerika'da yüzyıllardır ekilip yetiştirilmiştir. Tütün bitkisi 16.yy'da Avrupa'da kullanılmaya başlanmıştır. Portekiz'deki Fransız büyükelçisi Nicot De Villemain 1560 yılında tütün bitkisini Paris'e getirmiştir. Başlangıçta ana kraliçe Catherine de Medice tarafından burunotu (burnuna çekerek) olarak kendi başağrısının tedavisinde kullanmıştır. Nicot De Villemain, tütün bitkisine *Nicotiana tabacum* adını vermiştir. *Nicotiana tabacum* birçok ülkede başarılı bir şekilde yetiştirilmiş ve kullanımı yaygınlaşmıştır. 17. yy'ın ortalarında İngiliz yetişkin erkekler tütün çiğniyor ya da sigara kullanıyorlardı. 20. yy'a doğru sigara üretimi giderek yaygınlaştı. Bunlarla paralel olarak artan sigara piyasası giderek büyüyerek tüm dünyada nikotin bağımlılığı pandemisine yol açmıştır.

Nikotin tütün bitkisinin kuru ağırlığının % 0,6-3'ünü oluşturmaktadır ve güçlü bir insektisittir. 1893'te Pinner ve Wolfenstein nikotinin kimyasal yapısını açıkladılar. Kimyasal formülü $C_{10}H_{14}N_2$ olup, molekül ağırlığı 162.23 'dür. Kimyasal yapısı 3-(1-Metil-2-pirrolidinil) piridin'dir. 1904'te ise Pictet, Crepieux ve Ritoschy tarafından sentezlendi. Nikotinin L- ve S- olmak üzere bir çift izomeri bulunmaktadır, bunlardan L-nikotin formu biyolojik olarak aktif formudur ve tütün bitkisinde sentezlenmektedir (31).



ŞEKİL 5: Nikotinin moleküler yapısı

1.3.2 Nikotinin Etki Mekanizması

Nikotin etkisini vücutta nörotransmitter olarak bulunan bir madde olan asetilkolini (ACh) taklit ederek gerçekleştirir. Asetilkolin beyinde nöromodulator, periferde ise primer eksitator nörotransmitter olarak görev yapan bir nörotransmitterdir (29). ACh hücre yüzeyinde bulunan asetilkolin reseptörlerine (AChRs) tutunarak etkisini gösterir. Vücutta temel olarak kendilerine bağlanan maddelerle anılmakta olup, muskarinik asetilkolin reseptörü (mAChRs) ve nikotinic asetilkolin reseptörü (nAChRs) olarak iki büyük grup asetilkolin reseptörü bulunmaktadır. Muskarinik etki parasempatik son organlarda, nikotinic AChRleri ise otonomik ganglion ve nöromüsküler kavşaktaki etkileri belirler. Santral sinir sistemindeki kolinerjik etkiler hem nikotinic hemde muskarinik mekanizmaları içermektedir. Böylece nikotinin vücuttaki etki yerlerinin kas-sinir kavşağı, otonomik ganglionlar ve merkezi kolinerjik sinapslar olduğunu görmekteyiz (1).

Nikotinin birçok akut ve kronik farmakolojik etkileri bulunmaktadır. Akut nikotin uygulaması beyinde birçok alanda nöronal nikotinic asetilkolin reseptörlerini uyararak nörotransmitter salınımına ve birçok akut davranışsal etkiye yol açmaktadır. Kronik nikotin uygulaması bağımlılığın oluşmasına ve nikotinin akut etkilerine karşı toleransın ya da hassasiyetin (sensitization) gelişimine neden olmaktadır. Nikotin, aynı zamanda bilişsel performansa etki etmektedir.

Nöronal nikotinic asetilkolin reseptörleri, merkezi ve periferel sinir sistemi nöronlarının soma, dentrit ve terminalinde, PC12 hücrelerinde ve adrenal medullada ifade edilmektedir. nAChR'lerinin nikotin ile uyarılması nöron içerisindeki Ca^{+2} akışının artışına neden olmaktadır. Presinaptik terminale Ca^{+2} akışının fazla olması transmitterlerin uyarı ve sekresyonunu arttırmaktadır. Nikotinle uyarılma ile birlikte Ca^{+2} 'a bağlı olarak sinaptosomdan transmitter salınımı gerçekleşmektedir. Nikotinin, terminallerden direkt olarak Ca^{+2} ile bağlantılı bir şekilde transmitter akışını sağladığı bildirilmiştir.

Beyinde nAChR'lerinin temel fonksiyonu presinaptik alandaki sinaptik iletiyi ayarlamaktır. Son zamanlara kadar somadaki nAChR'lerinin önemi keşfedilememiştir. Son zamanlarda yapılan bir çok çalışma silia ganglion ve hipokampusta hızlı ve eksitatör sinaptik ileti sağlayan nAChR'lerin bulunduğu gösterdi ve nöronlardaki postsinaptik AChR'lerinin fonksiyonel önemi belirlenmiş oldu (45).

Nikotin, nAChR'lerini aktive ederek lokomotor aktivitede ve şartlı yer tercihinde (CPP) artış görülmesi gibi davranışsal sonuçlara neden olmaktadır (46). Nikotin aynı zamanda endojen ACh iletimini sekteye uğratarak nAChR'lerinin duyarsızlaşmasına neden olmakta, böylece nöronal fonksiyon ve davranışsal değişikliklerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Nikotinin düşük konsantrasyonlarının presinaptik etkileri çalışılmıştır; bu çalışmalarda sıçanlarda, farelerde ve beyin kesitlerinde devam eden nikotin uygulamasının kalıcı bir şekilde seçici olarak $\alpha 7$ nAChR'lerinin bloklanmasına neden olurken, beyin kesitlerine devam eden nikotin uygulaması sonucu presinaptik etkinin bloklandığı ve seçici olarak $\beta 2$ nAChR'lerinin duyarsızlaştığı görülmüştür. Pre- ve post- sinaptik nAChR alt tiplerinin duyarsızlaşmaya hassasiyetleri arasındaki farklar açıkça bilinmemekle birlikte farklı nöronal popülasyonlarında değişim göstermektedir. Bunun yanı sıra nAChR'lerinin duyarsızlaşmasına bazı aracı proteinler etki etmektedir. Örneğin Lynx1 proteini çeşitli nAChR alt tiplerinin duyarsızlaşmasını hızlandırabilmektedir, Lynx1 proteini knockout olan farelerde nAChR aktivitesi artmış olup bunun sonucunda nöronal dejenerasyonun ortaya çıktığı görülmüştür (47).

Sigara kullanımı ile nikotin konsantrasyonu çok yavaş bir şekilde 0.1 μM civarına ulaşmaktadır (48, 49) ve nikotin, asetilkolin esterazlar tarafından parçalanamadığı için uzun süre ortamda bulunmaktadır. Düşük agonist konsantrasyonunun uzun süre uygulanması bazen nAChR'lerinin aktive olmadan duyarsız konformasyona geçmesine neden olmaktadır. Çünkü nAChR'lerinin duyarsız konformasyonunun agoniste olan afinitesi, reseptörün açık ya da dinlenim hali konformasyonundan daha yüksektir (41). İnsanlarda radyoizotoplar ile işaretlenmiş nikotinik maddelerin çok düşük konsantrasyonları kullanılarak yapılan deneylerde kronik nikotin uygulaması sonrası beyinde nikotin bağlanmasının ve kısmen duyarsız haldeki nAChR'lerinin miktarının arttığı görülmüştür (Picciotto,

Addy, Mineur, & Brunzell, 2008). Nikotin kullanımı sürecinde duyarsız reseptörün agoniste afinitesinin yüksek olması ve nAChR'lerinin çeşitli konformasyonlarının dağılımının değiştiği dikkate alınmalıdır. Böylece hücre membranı üzerindeki nikotinik reseptörler fonksiyonel olmayan bir hale geçebilmekte ya da uzun süre duyarsız halde kalabilmektedirler (41). Nikotin aracılığıyla nAChR'lerinin aktivasyonu ve spesifik nAChR'lerinin alt tiplerinin duyarsızlaşmaları arasındaki denge nikotin maruziyetine karşı oluşan fonksiyonel ve davranışsal cevaba etki etmektedir. Kronik nikotine maruz kalmanın sonucunda hem reseptörlerin aktivitesinin pik yapması hem de nAChR'lerinin uzun süreli olarak duyarsızlaşması sigara tüketiminin neden olduğu kronik nikotin maruziyeti ile ilişkili fonksiyonel cevabın ortaya çıkması ile ilişkili olduğu düşünüldü (47). Reseptörlerin uzun süre duyarsız halde kaldıkları ile ilişkili bilgi yoksunluk semptomlarının ve nikotine tolerans gelişmesinin anlaşılmasında önemlidir (41).

1.3.3 Nikotin ile İlişkili Fizyolojik Süreçler

Nikotin kullanımı en yaygın olan bağımlılık yapıcı ilaçların başında gelmektedir. Madde Kötüye Kullanımı ve Mental Sağlık İdaresi'nin (Substance Abuse and Mental Health Administration) 2013 verilerine göre Amerika'da 25 milyon kişi sigara ve benzeri ürünler kullanmaktadır (50). Dünya Sağlık Örgütü'nün Mayıs 2014 verilerine göre her yıl 6 milyon kişi sigaranın neden olduğu hastalıklardan dolayı hayatını kaybetmektedir (51).

Nikotin alındığında hızlıca kan dolaşımına katılır ve kan-beyin bariyerini geçebildiği için merkezi sinir sistemine direkt olarak etki eder. Sigaradan alınan nikotin mukoz membranlardan geçer ve protonlanmış hali akciğerlerde depolanır böylece fizyolojik pH ayarlanmış olur; protonlanmamış nikotin ise hücre membranı gibi lipid bariyerlerden geçerek hücre içine girer (40). Periferik sinir sisteminde nikotin sinir kas kavşağında nAChR'lerinin aktive ederek kas kasılmalarını, otonom sinir sistemindeki gangliyonik nöronlar boyunca sinir iletimini sağlayarak postganglionik adrenerjik ve kolinerjik lifleri aktive etmektedir. Adrenal bezdeki nAChR'lerinin aktive olması katekolamin seviyesini arttırmaktadır bu sayede kardiyovasküler ve metabolik yanıtlar oluşmakta (52) arterial kan basıncını ve kalp atım hızı artmaktadır (53).

Laboratuvar hayvanlarında tanımlanan bağımlılık davranışları, kendi kendine nikotin uygulama davranışında pekiştirme “*reinforce self-administration*”, ilaç arayışı, şartlı yer tercihinin nedeni olması, lokomotor aktivitede artış gibi özelliklerdir (54).

Vücutta fiziksel ve fizyolojik strese yanıt HPA aksı aracılığıyla oluşmaktadır. HPA aksı hipotalamustan CRH “*corticotropin release hormone*” salımı ile aktive olur. CRH anterior hipofizden ACTH “*adrenocorticotropic hormone*” salımına neden olur. ACTH ise adrenal bezde kortizol üretimini aktive etmektedir. Kortizol kardiovasküler sisteme, metabolik homeostazise, immun sisteme, davranış ve biliş üzerine etki eder. Nikotin CRH ve /veya arjinin-vazopresin (AVP)’yi uyararak HPA aksını aktive etmektedir (52).

Mezokortikolimbik döngü bağımlılık sürecine etki ederek bağımlılık ile ilişkili davranışların ortaya çıkmasında önemlidir. Orta beyindeki dopaminerjik merkez ve onun etki ettiği kısımlar uyarılma “*arousal*”, motivasyon, bilinç, motor fonksiyonlar ve ödül sistemi ile ilişkili davranışların pekiştirilmesinde rol oynamaktadır. Nikotin bağımlılığı dopaminerjik sistemde plastisiteye neden olmaktadır. En önemli dopaminerjik yolak VTA (ventral tegmental alan)’dan kaynaklanarak NAc (nükleus akumbens)’e ve oradan prefrontal korteks gibi ön beyin yapılarına, olfaktör tuberkül, amigdala, striatuma projekte olmaktadır (40). Nikotinin de içinde bulunduğu birçok bağımlılık yapıcı ilaç, özellikle bağımlılık edinim sürecinde NAc’de dopamin salımını arttırmakta böylece ilaç kullanımına olan pekiştirme artmaktadır. Antagonist ya da lezyonlar ile NAc’deki dopamin salımı bloklendiğinde nikotinin ödül etkisinin azaldığı görülmüştür. Sıçan beyin kesitlerinde sigarada kullanılan nikotin konsantrasyonunun VTA’daki dopamin nöronlarında nAChR’lerini aktive ederek, VTA’daki nöronların ateşlenmesine etki ettiği görülmüştür. Bunun yanı sıra nikotin glutamat salımını arttırarak VTA’da sinaptik plastisitenin başlamasına yardım etmektedir. Artan glutamat salımı bir postsinaptik depolarizasyonla eşleştirildiğinde NMDA (N-Methyl D-Aspartate) reseptörlerinin Mg^{+2} blokajının kalkmasını sağlar ve LTP (long term potentiation)’yi indükler. Böylece nikotinic aktivite dopaminerjik sistemde sinaptik plastisiteye neden olabilmektedir (41).

Enerji metabolizması ve beslenmenin düzenlenmesinde hipotalamus üzerinden homeostatik sistem ve kortiko-limbik-striatal sistem üzerinden beyin ödül merkezi iş birliği içindedir. Nikotin nAChR'leri aracılığı ile her iki sistem üzerine de etki etmektedir. Sıçanlara akut ve kronik nikotin uygulaması yapıldığında, besin alımının azalmasına, enerji metabolizmasının, lipolizin ve fiziksel aktivitenin artmasına bağlı olarak vücut ağırlığının azaldığı görülmüştür (55). Nikotin potansiyel bir salgı uyarıcıdır. Nörotransmitterlerin ve sinyal iletimi ile ilişkili hücre membran bileşenlerinin ekspresyon seviyesine etki ettiği düşünülmektedir. Nikotinin beslenme ile ilişkili etkileri NPY (nöropeptit Y), oreksin, leptin ve eşleşmemiş protein (UCP) aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu peptitlerden NPY ve oreksin besin alımını uyarırken; UCP1-2 dışında diğer peptitler besin tüketimini ve iştahı azaltıcı yönde etki etmektedirler. Bu peptitlerden bazılarının nikotin uygulamasına cevap olarak hücre-membran reseptör aktivite ve seviyesinin düzenlendiği gösterilmiştir. Nikotin leptin, NPY, oreksin, eşleşmemiş proteinler ile NYP ve oreksin reseptörleri seviyelerine etki ederek besin alımı ve enerji tüketimi üzerine düzenleyici etki göstermektedir (44). Alfa7 nAChR'leri aracılığı ile nikotinin POMC (proopiomelanocortin) ve NPY ile glutamat, GABA (gamma aminobutyric acid) ve seratonin gibi nörotansmitterlerin seviyelerine etki ederek iştahın baskılanmasına ve beynin ödül merkezine etki ettiğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (56).

Sigara kullanan insanlar sigarayı bıraktıklarında sigara kullanmayanlara göre daha fazla kilo alma eğiliminde oldukları monozigot ikiz kardeşler ile yapılan çalışmalarda ve hayvan çalışmalarında görüldü (44). Bazı sigara kullanıcıları sigara kullanmayanlara göre daha az kiloludur ve sigaranın bırakılması ile kilo alımı artmaktadır. Sigara kullanımının bırakılması ile besin alımının artması ödül mekanizmasındaki değişiklik sonucu gerçekleşmektedir; nikotin eksikliğini yerini artan besin alımı almaktadır. Moleküler seviyede, bu etkiler nAChR'in aktivitesi ile gerçekleşmektedir (57).

Nikotinin nAChR'leri aracılığı ile dikkat ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etki ettiği bilinmektedir. Nörofizyolojik çalışmalar, elektroensefalografi (EEG), genelde dikkat tepkisine işaret eden, uyarıcı sınıflaması, beklenti ve gelen uyarıcının farkına varma durumunda ortaya çıkan bir bilişsel bileşen olan P300 olayla ilişkilendirilmiş

potansiyeller (ERP, event-related potential), P50 işitme ile ilişkili olayla ilişkilendirilmiş potansiyel (ERP) ler, prepulse inhibisyon ve ağrının ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiş potansiyeller nikotin ya da sigara kullanımından etkilenmektedir. Nikotin işitsel ve görsel sistemlerde dikkat öncesi/bilinç dışı "preattention" sistemlere etki ettiği bilinmektedir. İşitme ve görsel sistemlerde olduğu gibi somotoduyusal değişiklik ile ilgili kortikal yanıtlar üzerine nikotin etki etmektedir (58).

Nikotin duysal işlevlere etki etmektedir. Gelişimsel süreçte sigaraya maruz kalmak, insanlarda bilişsel, dikkat, duysal işlevlerde kusurların olması ve ADHD (dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu) gibi nöropsikiyatrik hastalıklara yakalanma riskini artırmaktadır. Nikotine maruz bırakılarak yapılan hayvan modelleri ile gerçekleştirilen çalışmalar, insanlarda sigara kullanımı ile ortaya çıkan sonuçlarda sigarayı oluşturan birçok bileşenin katkıda bulunması ile bu etkilerin ortaya çıkabileceğini düşündürmüştür. Bunun yanı sıra kemirgenler ile yapılan çalışmalar da gelişimsel dönemde nikotine maruz kalmanın işitsel süreçler ile ilişkili işlevlerde bozukluklara neden olduğuna işaret edilmiştir; sıçanlarda gelişimsel süreçte nikotin maruziyetinin işitsel uyarılara karşı oluşan pre-pulse inhibisyonu azalttığı gösterilmiştir. Nikotin maruziyeti, düşük şiddetteki uyarılara karşı oluşan cevabın azalmasına neden olurken, yüksek şiddetteki uyarılara karşı oluşan cevaba etki etmediği görülmüştür. İnsanlarda gelişimsel süreçte nikotin maruziyeti beyin sapının işitme ile ilişki cevabını etkilemezken, talamus-duysal korteks bağlantısı ile ilişkili döngülerin etkilendiği görülmüştür (59).

Sigara, kadınlarda östradiole etki ederek iskemik felç görülme oranını artırmaktadır. Nikotin, kadınlarda östrojen metabolizması üzerine, azaltıcı yönde, etki ederek menstrual siklusun normal periyodunu bozmakta ve erken menapoz başlangıcına neden olmaktadır. Endojen östrojen, menapoz öncesi kadınlarda serebrovasküler hastalıkları önlemektedir. Özellikle 17- β östradiol, serebral iskemik hasardan beyni korumaktadır. Kronik nikotin, dişi sıçanlarda endojen ya da ekzojen östradiol varlığına rağmen östradiolün hipokampusu serebral iskemiden koruyucu etkisini ortadan kaldırdığı görülmüştür (60).

1.4 Kokain Amfetamin Regülatör Transkripti (CART)

1.4.1 CART Geni ve Promotorunun Yapısı

CART sıçanların farklı beyin bölgelerinde ve endokrin dokularında ekspresyonu gerçekleşen bir peptittir. CART proteininin hidrofobik bir sinyal sekansı içerdiği bulunmasıyla CART'ın yeni bir nöroendokrin sinyal molekülü olduğu düşünülmüş olup ardından yapılan çalışmalar ile bu durum kanıtlanmıştır.

İnsan CART cDNA sekansının tamamı analiz edilmiş olup nükleotit sekansının tamamı 900 nükleotit olduğu, 3 farklı ekson içerdiği ve genomik DNA'sının yaklaşık olarak 2 kb uzunluğunda olduğu bilinmektedir. Yaklaşık olarak 425 ve 540 baz çifti uzunluklarında 2 intron bulunmaktadır. İnsanlarda CART geni, kromozomun 5q13-14 bölgesinde lokalizedir (61).

İnsan ve sıçan gen yapısında farklılıklar bulunmaktadır: sıçan ve farelerde 129 ve 116 aminoasitlik 2 CART alternatif birleşme (alternative splice) varyantı bulunurken; insanlarda sadece 116 aminoasitlik polipeptit bulunmaktadır. ProCART'ın (öncü CART peptidinin) dokuya spesifik post-translasyonel işleme sonucu oluşan biyolojik olarak aktif peptitler; kemirgenlerde CART55-102 ve CART62-102; insanlarda ise CART42-89 ve CART 49-89'dur (61).

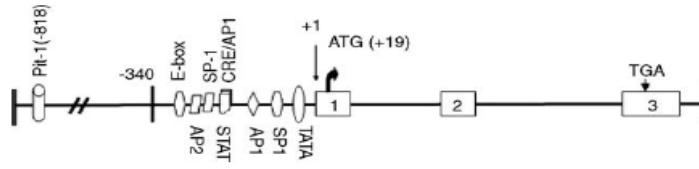
fare	MESSRLRLLP	LLGAALLLL	PLLGARAQED	AELQPRALDI	YSAVDDASHE	KEL-----	-----IEAL
insan	MESSRVRLLP	LLGAALLML	PLLGTRAQED	AELQPRALDI	YSAVDDASHE	KEL-----	-----IEAL
sıçan	MESSRLRLLP	VLGAALLLL	PLLGAGAQED	AELQPRALDI	YSAVDDASHE	KELPRQLRA	PGAVLQIEAL
domuz	MESPRRLLP	LLGAALLLL	PLLGALAQED	AELQPRALDI	YSAVEDASHE	KEL-----	-----IEAL
siğır	MESPRRLLP	LLGAALLLL	PLLGALAQED	AELQPRALDI	YSAVEDASHE	KEL-----	-----IEAL
korunmuşluk	***.*:***	:*****:*	***.*:***	*****	*****	***.*:***	***
fare	QEVLLKLSK	RIPIYEKYG	QVPMCDAGEQ	CAVRKGARIG	KLDCDCPRGTS	CNSFLKCL	
insan	QEVLLKLSK	RVPIYEKYG	QVPMCDAGEQ	CAVRKGARIG	KLDCDCPRGTS	CNSFLKCL	
sıçan	QEVLLKLSK	RIPIYEKYG	QVPMCDAGEQ	CAVRKGARIG	KLDCDCPRGTS	CNSFLKCL	
domuz	QEVLLKLSK	RIPIYEKYG	QVPMCDAGEQ	CAVRKGARIG	KLDCDCPRGTS	CNSFLKCL	
siğır	QEVLLKLSK	RIPIYEKYG	QVPMCDAGEQ	CAVRKGARIG	KLDCDCPRGTS	CNSFLKCL	
korunmuşluk	*****	*.*****	*****	*****	*****	*****	*****

ŞEKİL 6: CART peptit sekansının 5 farklı canlı türünde karşılaştırılması. Şekilde sarı ile renklendirilmiş kısım ekzon 3'ü göstermektedir. "*" tamamen korunmuş; "." yüksek oranda korunmuş; "." daha az korunmuş sekans karşılaştırmalarını göstermekte.

İnsanlardaki CART cDNA'sı sıçan cDNA'sı ile %81 identiktir. Protein kodlayan bölge ise %91 homoloji göstermektedir. Bu iki türde amino asit sekans seviyeleri %95 identik olup, karboksi terminal bölgede yani ekzon 3'te %100 identiktir. Karboksi

terminal bölgede bulunan 6 sistein rezidüsü biyolojik aktif CART peptitlerinin hepsinde korunmuş bir sekans olup; disülfid bağları ile oluşan tersiyer yapının oluşması için gereklidir (61). Sinyal peptid domaininde 3 korunmuş (V6→L, L11 →V ve M19 → L) ve 2 korunmamış (T25 → A, R26 → G) yer değiştirme gözlenmiştir (ŞEKİL 6). 90 aa boyunca sadece 1 korunmuş yer değiştirme (V26 →I) mevcuttur. İnsan CART mRNA'sının dağılımı daha önce sıçanlarda gözlenen ile benzerlik göstermekte olup tüm bu benzerlikler CART'ın memelilerin nöroendokrin sisteminde korunmuş bir rolü olduğunu düşündürmektedir (62). ŞEKİL 7'de insan NP_004282, sıçan NP_058806.1, fare NP_038760.3, domuz NP_001093395.1, sığır NP_001007821.1, tavuk AGG54990.1, kertenkele XP_003216314.1, kaplumbağa XP_007059294.1, kurbağa NP_001087565, zebrabalığı NP_001017570.1 erişim numaraları kullanılarak 10 farklı türün CART peptit sekansları tcoffe programı ile karşılaştırılması görülmektedir. '*' tamamen korunmuş; '.' yüksek oranda korunmuş; '.' daha az korunmuş sekans karşılaştırmalarını göstermektedir. Şekildeki renkler korunmuşluğu göstermekte olup, korunmuş bölgeler yüksek puan almak üzere 0-9 arası puanlama yapıldığında, koyu pembe bölgelerin tamamen korunmuş; sarı turuncu renkteki bölgelerin yüksek oranda korunmuş (>5); yeşil bölgelerin ise az korunmuş bölgeleri ifade etmektedir.

PACAP-38 gibi cAMP akivatörleri tarafından upregüle edilmektedir. GH3 hücrelerini -641 CART promotor bölgesini içeren plasmit ile transfekte edip forskolin uyguladıklarında ise forskolin uygulama süresine bağlı olarak promotor aktivitesinin arttığını görmüşlerdir. Forskolin adenilat siklaz enzimini aktive etmekte, böylece hücre içersinde cAMP'nin artması ile PKA (protein kinaz A) sinyal yolağı aktive olmaktadır. Forskolinin PKA sinyal yolağı aracılığı ile CART gen ifadesini arttırdığı da görülmüştür. Dominguez ve ekibin yaptığı bir diğer çalışma ile GH3 hücrelerine forskolin uygulaması sonucu hücre içi P-CREB miktarının arttığı CREB miktarının ise değişmediği görülmüştür (63).



ŞEKİL 8: CART promotorunun yapısı

CART mRNA'nin up-regülasyonunda PKA-CREB sinyalinin önemli olduğu bilinmektedir. CART mRNA'sı kokain ve amfetamin gibi psikostimulan ilaçlar, leptin, kolesistokinin, östradiol ve glukokortikoidler tarafından upregüle edilmektedir. CART gen ifadesini düzenlenmesi özellikle de baskılanması tamamiyle bilinmemekte olup transkripsiyonel baskılayıcı nöron sınırlayıcı susturucu elementin (NRSF, REST olarakta bilinmekte) 2 NRSF bağlanma elementinin CART promotoruna ve intron1'e bağlanması ile CART gen ifadesi baskılandığı son yapılan çalışmalarda görülmüştür (64).

1.4.2 CART Peptidinin Tarihiçesi ve İlişkili Olduğu Fizyolojik Süreçler

CART (Cocaine and Amphetamine Ragulated Transcript) ilk olarak koyun hipotalamusundan izole edilmiş bir peptit olup (65); kokain ve amfetamin gibi psikostimulan ilaçların akut olarak uygulanması sonrası striatumda yükseldiği gösterilmiş olan bir mRNA'dır (2).

CART mRNA ve peptitleri HPA aksı ve çeşitli beyin bölgelerinde yüksek seviyede ifade edilmektedir. Beynin limbik bölgelerinden prefrontal korteks, hipotalamus, amigdala da; beyin sapında ise nukleus solitorius ve parabrankial nukleusta ifadesi gerçekleşmektedir (2, 66, 67).

CART peptidinin ödül ve pekiştirme, beslenme, endokrin ve otonomik regülasyon ve anksiyete gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynadığı gösterilmiştir (4).

CART psikostimulan benzeri etkiler göstermektedir. Mezolimbik bölge içerisine CART peptidi (CART 55-102) enjeksiyonu sonucu psikostimulanlar ile ilişkili davranışsal etkiler görülmektedir. VTA içerisine CART enjekte edilmesi ile NAc'de dopamin salımında bir miktar artış meydana gelmekte, lokomotor aktivitede küçük bir artış ve CPP'nin teşvik edildiği gösterilmiştir. NAc'e CART enjekte edildiğinde, CART'ın kendi başına bir etki göstermediği, fakat sistemik kokain ya da amfetamin ile kombine edildiğinde ise CART ilacın neden olduğu artan lokomotor aktiviteyi azalttığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda CART'ın, VTA'da da NAc'de de küçük doz psikostimulanlara benzer etki gösterebileceği, fakat yüksek doz ilaca karşı ise karşıt etki oluşturma eğiliminde olabileceği düşünülmüştür. Yüksek doz kokain kurbanlarında NAc ve VTA'da CART mRNA seviyesinin değiştiği görülmüştür. CART'ın kokain tarafından ortaya çıkan büyük değişikliklere karşı homeostatik ya da iyileştirici etki gösterebileceği düşünülmüştür (68). Kokain uygulaması sonrası NAc'de CREB overekspresyonu sonucu CART mRNA'sı artmaktadır, bu yolak üzerinden CART kokainin neden olduğu ödül etkisini azaltıcı yönde etki etmektedir. Dolayısı ile CART bağımlılık üzerine dolaylı olarak etki etmektedir (69)

Birçok bağımlılık yapıcı ilaç mezolimbik DA sistemi aktive etmektedir. CART ve DA bağımlılık yapıcı ilaçlara karşı etkileşim halindedir. NAc'de CART içeren nöronların terminallerinde tirozin hidroksilaz içerdikleri elektron mikroskobu ile gösterilmiştir. Bunun yanı sıra D3 dopamin reseptör agonisti enjekte edildiğinde ise NAc'te CART mRNA seviyesi azaldığı görülmüştür (69). Bir başka çalışmada, kokain ve dopaminin neden olduğu lokomotor aktivitedeki artışın NAc'e CART enjekte edilmesi ile azaldığından yola çıkılarak dopamin reseptör agonistleri kullanılarak dopaminerjik reseptörlerin etkisi araştırılmıştır. İntra akumbal bölgeye D1 reseptör

agonistinin uygulanması lokomotor aktiviteyi arttırdığı, CART peptidi ile birlikte D1 reseptör agonistinin uygulanmasının ise lokomotor aktiviteyi daha fazla arttırdığı; D2 ve D3 reseptör agonistlerinin uygulanmasının ise böyle bir etkiye neden olmadığı görülmüştür. D1 ve D2 reseptör agonistlerinin birlikte verilmesi lokomotor aktiviteyi sadece D1 agonisti verilmiş olduğu duruma göre daha da artırırken; D1, D2 agonistleri ile birlikte CART verilmesinin lokomotor aktiviteyi azalttığı görülmüştür. Sonuç olarak CART peptidinin, psikostimulanların neden olduğu eş zamanlı D1 ve D2 reseptör aktivitesi ile ortaya çıkan etkileri azalttığı gösterilmiştir (70).

Stres sürecinde CART, hipotalamustan c-fos gen ifadesini arttırarak CRH salımını uyarmakta; CRH ön hipofizden ACTH salımına neden olmakta ve ACTH ise adrenal bezden CORT (kortikosteron – kortizol) salımını uyarması ile HPA aksının aktivitesini düzenleyerek stres ile ilişkili süreçlerde rol oynamaktadır. CART peptidi hipotalamustan CRH salımını arttırmakta ve plazmada/kandaki ACTH ve CORT seviyeleri artmaktadır. Dolayısı ile CART hipotalamus aracılığı ile HPA aksının aktivitesine direkt olarak etki ederek HPA aksının aktivitesini düzenlemektedir (67). Hipokampus strese cevap oluşmasında düzenleyici rol oynayan limbik bölgelerden biri olup, HPA aksının aktivitesini inhibe etmektedir. Hipokampal lezyonlarda glukokortikoid sekresyonu artıp, hipotalamusun PVN'dan CRH mRNA ekspresyonu artmaktadır. Amigdalanın uyarılması ile ise HPA aksının aktivitesi artmakta böylece CRH artması ile ACTH ve CORT sentez ve sekresyonu artmaktadır. CART cinsel farklılaşma göstermektedir. Kokain uygulanması erkek sıçanların amigdalasında CART mRNA ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır (71).

CART iştah kontrolü ve enerji homeostazını düzenleyici role sahiptir. CART, VMN (ventral medial nukleus), LH (lateral hypothalamus), ARC (arcuate nucleus), PVN (paraventricular nucleus), NTS (nucleus tractus solitarius), NAc gibi beslenme ile ilişkili beyin bölgelerinde, beslenmenin regülasyonunda rol oynayan peptitler ile kolokalize bulunmaktadır. Yaygın merkezi sistemdeki dağılımının yanı sıra beslenme ile ilişkili periferik alanlarda, ileum ve gastrointestinal yolaktaki birçok myenterik nöronda CART ekspresyonu gerçekleşmektedir. CART, beslenme ile ilişkili olan NPY ve leptin ile etkileşim halindedir. I.C.V CART peptit uygulanmasının sıçanlarda beslenmeyi inhibe ettiği, CART antikorunun uygulanması ise besin alımını uyardığı

görülmüştür. Dolayısı ile endojen CART peptidinin beslenme üzerine inhibe edici etkisi olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra i.c.v. CART uygulaması plazma insülin ve leptin seviyesini düşmesinde rol oynamakta ve lipit oksidasyonunu arttırarak yağ depolanmasını sınırlandırmaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda glukokortikoid ekspresyonunun artması obezite ile ilişkilidir. Bazı merkezi ve periferel dokularda glukokortikoidler CART ekspresyonu üzerine düzenleyici etki göstermektedir (72).

İn vivo ve in vitro çalışmalarda CART'ın beyni beyin hasarlarına karşı koruyucu bir nöropeptit olarak görev yaptığı gösterilmiştir . Nöroendokrin habis tümör ve metastatik meme kanseri hastalarının kan dolaşımında CART peptidinin arttığı görülmüştür. CART'ın nöroendokrin tümör ve östrojen reseptör (ER) pozitif ve lenf nod negatif meme kanseri hastaları için tanı faktörü olabileceği de düşünülmektedir (64).

CART, MAPK yolağı aracılığı ve otokrin/parakrin döngü içerisinde tümör hücrelerinin CART sinyalini arttırması ile liganddan bağımsız olarak ER α 'nın transkripsiyonel aktivitesini arttırmaktadır. ER-pozitif meme kanser hücre hattında CART ekspresyonunun tamoksilen aracılı hücre ölümlerine karşı koruyucu olduğu görülmüştür (73).

CART serebral iskemiye karşı endojen bir nöroprotektif peptittir. CART geninin knockdown edilmesi oksijen ve glukoz yoksunluğuna bağlı nöronal hücre ölümlerini arttırmaktadır. Orta serebral arter enfarktüs modellerinde CART geninin knockdown edilmesinin enfarktüs boyutunu arttırdığı görülmüştür. Oksijen glukoz yoksunluğundan sonra CART verilen/uygulanan nöronlarda p38 ya da JNK aktivasyonu gerçekleşmediği, CART'ın koruyucu etkisini ERK1/2 yolağı aracılığı ile gerçekleştirdiği görülmüştür (74)

Çeşitli fizyolojik ve homeostatik süreçlerde CART peptidinin rolü ile ilişkili çalışmalar mevcut olup nikotin bağımlılığındaki olası rolüne ilişkin herhangi bir literatür bilgisi bulunmamakta olup, sunulan tez çalışmasında nikotinin CART promotörü üzerindeki rolüne bakılmıştır.

1.5 PC12 Hücre Hattı

PC12 sıçan feokromositoma hücre hattı, sıçan adrenal medullasından elde edilmiş bir hücre hattı olup, doğal nöronal dokudan türevlenmiş olması nedeni ile nöronal çalışmalar için iyi bir model oluşturmaktadır. PC12 hücrelerinde nAChR tipleri bulunmakta olup, bu hücelere NGF uygulanması ile nAChR alttip ve sayısı artmaktadır. Dolayısı ile PC12 hücreleri nAChRleri ile ilişkili çalışmalar için uygun bir hücre hattıdır. PC12 hücreleri, sıçan adrenal bezinden elde edilmiş bir hücre hattıdır, adrenal bez medullasında noradrenarjik kromafin hücrelerinde, CART ekspresyonu gerçekleşmektedir (3, 67, 75). PC12 hücreleri endojen olarak CART peptiti sentezliyor olmasının yanı sıra katekolaminlerin sentezi (dopamin ve norepinefrin), saklanması ve salınımı gibi adrenal kromaffin hücrelerin ve sempatik hücrelerin (Greene & Tischler, 1976) özelliklerini göstermektedir.

PC12 hücreleri sinir büyüme faktörü olan NGF ile farklılaşmaktadırlar. NGF 1950'li yıllarda Rita-Levi Montalcini tarafından keşfedilmiş olup, nöronların gelişimi ve sağ kalımlarını düzenleyen nörotrofinler adındaki polipeptid ailesinin üyesidir (76). 1970 Yılında Ruth Houge Angeletti ve Ralph Bradshaw NGF'in çoklu moleküler bir kompleks olduğunu gösterip, NGF'i 7S NGF olarak tanımlamışlardır. α alt ünitenin fonksiyonu bilinmemekte, γ alt ünite proteaz aktivitesi göstermekte ve β altünite ise biyolojik aktivite gösteren yapıdır (77). NGF'e düşük afinite gösteren p75 ve NGF'e yüksek afinite gösteren tirozin kinaz reseptörlerinden trk ailesine ait trkA reseptörü olmak üzere yapısal olarak ilişkisiz iki reseptör NGF'in biyolojik aktivitesini düzenlemektedir. (78).

Sempatik nöron özelliği gösteren PC12 hücreleri NGF için reseptör bulundurmaktadır, ve bu nörotrofinin uyarısına yanıt olarak PC12 hücrelerinde, hücre bölünmesinin durması, sempatik nörona benzer şekilde hücre gövdesinin yassılaşması ve nöritlerin uzaması görülmektedir (5). Dolayısı ile PC12 hücreleri NGF ile tetiklenen nörit gelişim mekanizmalarında (79) yaygın olarak kullanılan hücre hattıdır. NGF, ERK, AKT ve p38 MAPK (80) gibi birçok fonksiyonel protein kinazı ve Ras ve PI3K sinyal yollarını aktive ederek hücrenin kaderinin belirlenmesinde rol oynamaktadır (79, 81). NGF, MAPK sinyal yolağını uzun süreli olarak aktive ederek farklılaşmayı (82, 83) EGF ise kısa süreli olarak MAPK sinyal yolağını aktive ederek

hücre bölünmesini sağlamaktadır (14). PC12 hücrelerinin NGF ve EGF ile uyarılması sonucu Ras ve Rap1 adlı 2 küçük G proteini aktive olmaktadır. Hem NGF hem de EGF' e yanıt olarak Ras kısa süreli olarak aktive olmaktadır, Rap1 ise EGF ile kısa süreli; NGF ile uzun süreli olarak aktive olmaktadır (83). NGF, PC12 hücrelerinde TrkA (reseptör tirozin kinaz) ve p75^{ntr} (nörotrofin) reseptörünü aktive etmektedir.

“Transient Receptor Potential Canonical” (TRPC) proteinleri çeşitli hücre tiplerinde, nöronal ve nöroendokrin, plasma membranında, bulunan Ca⁺²'a geçirgen kanallar olup nöronal hücrelerde, nörit gelişimi, akson rehberliği ve sinir rejenerasyonun düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. PC12 hücreleri TRPC 1, TRPC 5 ve TRPC 6 gibi bazı TRPC kanallarını da eksprese etmektedir. PC12 hücrelerinde NGF ile gerçekleşen farklılaşma süreçlerinde TRPC paterni de değişmektedir. Örneğin TRPC 6, hipokampal nöronlarda ve PC12 hücrelerinde nörit gelişimini kolaylaştıran bir kanal olup ekspresyon seviyesi NGF ile gerçekleşen farklılaşma sürecinde artmaktadır (84).

PC12 hücreleri doğal nöronal dokudan tüvelendikleri için nAChR'lerinin regülasyonu ile ilişkili yapılan nöronal çalışmalar için iyi bir model oluşturmaktalar. PC12 hücrelerine NGF uygulanması sonucu hücreler tipik sempatik sistem nöronlara benzer biyokimyasal ve fizyolojik özellikler kazanmaktadırlar. NGF uygulaması PC12 hücrelerinin nAChR kompozisyonunu değiştirmektedir. 1992'de Rogers ve ekibinin yaptığı çalışmaya göre PC12 hücrelerine NGF uygulanması sonucu $\beta 2$ alt ünitenin mRNA'sı artarken; $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 3$ ve $\beta 4$ altünitenin mRNA ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir (85). NGF, PC12 hücrelerinin ACh duyarlılığını arttırmaktadır. 1994 yılında Henderson ve ekibinin yaptığı çalışmada ise NGF uygulaması ile ; $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ ve $\beta 4$ nAChR alttiplerinin mRNA'larının seviyesinin arttığı görülmüş olup (86) yapılan bir başka çalışmada $\alpha 5$, $\alpha 7$ ve $\beta 4$ transkriptlerinin de NGF uygulaması ile arttığı gösterilmiştir (87). Rogers ve Henderson'nun buldukları sonuçlar arasındaki fark PC12 hücre tipine, deney koşullarına, kültür koşullarına bağlanmıştır. Bunun yanı sıra $\alpha 7$ nAChR'i bakımından defektli bir PC12 hücre hattında ise NGF'in $\beta 4$ gen ifadesinin azaltabildiği de (85) gösterilmiştir. 2000 yılında Nakayama ve ekibi paternal PC12 hücre hattında NGF uygulamasının $\alpha 3$ nAChR alttipi üzerine etkisine bakmışlar ve $\alpha 3$ mRNA seviyesinin NGF ve cAMP ile regüle edildiğini, NGF

uygulanması ile TRK-A reseptörleri üzerinden Ras-MAPK kaskadı ve CREB aktivasyonu sonucu $\alpha 3$ mRNA'sının azaldığını bulmuşlardır (88).

PC12 hücrelerine nikotin uygulanması ile hücre içine Ca^{+2} girişi artmaktadır ve bunu takiben birçok genin ifadesi gerçekleşmektedir (89). 2001 yılında Nakamura ve ekibinin yaptığı çalışmada NGF uygulaması ile $\alpha 5$, $\alpha 7$ ve $\beta 4$ 'nin; nikotin uygulaması ile ise $\alpha 5$ ve $\beta 2$ 'nin mRNA seviyelerinin arttığı gösterilmiş olup (87); Avila ve ekibinin yaptığı çalışmada ise NGF uygulaması ile çalışmada $\beta 4$ 'ün, nikotin uygulanması sonucu ise $\beta 2$ 'nin arttığını bulmuşlardır (90).

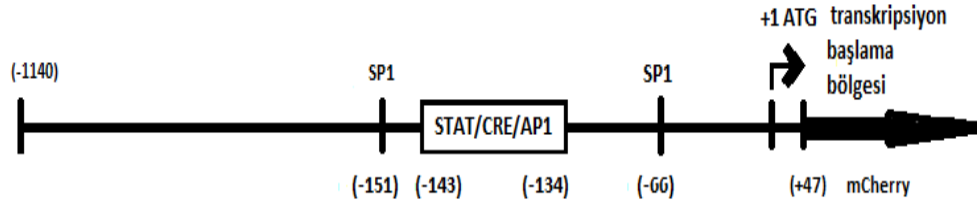
DNA'ya bağlanan Sp-1 transkripsiyon faktörünün cJun koaktivatörü ile etkileşime girerek NGF'e cevap oluşturduğu, bunun sonucunda da $\beta 4$ ekspresyonunun arttığı görülmüştür (81). Nöron benzeri hücre hatlarında (Neuro2A ve PC12) yapılan çalışmalarda, bu transkriptlerin ekspresyonlarının sınırlandırılmasında SCIP/Tst-1/Oct6 gibi faktörlerinin etkileşimi ve Sox10 tarafından transaktivasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Bu faktörler fibroblast ve kas hücrelerinde bulunmayıp, PC12 hücrelerinde ise NGF uygulaması ile seviyeleri artmaktadır. PC12 hücre hattında bu transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi hücre hattının orijinine ve hücre kültür ortamına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (28).

Sonuç olarak hücre hatları ile yapılan çalışmalarda NGF gibi trofik faktörlere cevap oluşturarak nAChRleri'nin transkripsiyonunun gerçekleşmesinde Ras bağımlı MAPK ile PI3K ve MEK sinyal yolları katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

1.6 Haberci Sistemler

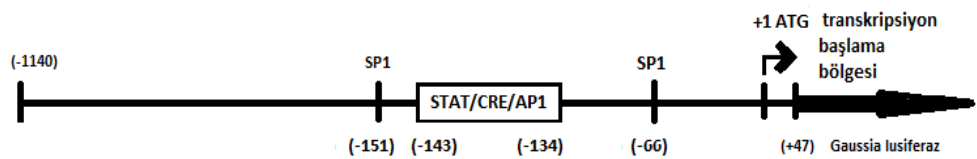
Haberci sistemler hem biyomedikal hem de farmasötik araştırmalarda gen ekspresyonu, regülasyonu ve sinyal iletimi gibi hücresel olayların takip edilmesinde önemli bir araçtır. Haberci genlerin seçiminde haberci genin duyarlılığı, güvenilirliği, çalışmaya uygun pratik bir yöntem olması tercih sebeplerindedir. Transkripsiyonel aktivitenin değerlendirilmesi amacı ile kullanılan haberci istemlerde, haberci gen promotor sekansa bağlıdır. Promotor bölgeye bağlı haberci geni içeren vektör ile transfeksiyon işlemi (hücreye aktarılır) gerçekleştirilir. Transfeksiyondan sonra

haberci sisteme yönelik aktivite tayini aracılığı ile transkripsiyon değerlendirilmiş olur (91).



ŞEKİL 9: CART promotrunun mCherry haberci sistemine bağlı olduğu pDNA bölgesi

Bu çalışmada floresan ve luminesans olmak üzere iki farklı haberci sistem kullanılmıştır. Floresan haberci sistem olarak mCherry floresan proteini kullanılmıştır. mCherry, proteini *Discosoma* sp.'den elde edilmiş kırmızı floresan bir proteindir. mCherry floresan proteini 587 nm dalga boyundaki ışık ile uyarılmakta (eksitasyon değeri) olup; 610 nm dalga boyunda ışık yaymaktadır (maksimum emisyon değeri) (7). mCherry, *Discosoma*'dan elde edilen kırmızı dalga boyunda ışık veren floresan proteinler içinde, monomer yapıda olup, pH direnci, parlaklığı, olgunlaşma hızı ($t_{0,5}=15$ dakika) ve fotostabilite (ışık kararlılığı) özelliklerini en iyi sağlayan proteindir (92).

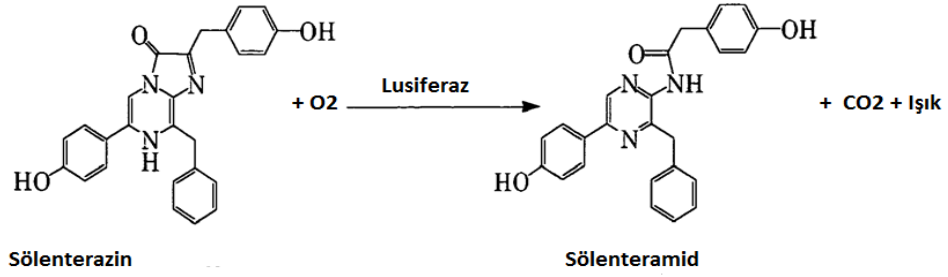


ŞEKİL 10: Çalışmada kullanılan pDNA'nın CART promotrunun Gaussia Lusiferaz haberci sistemine bağlı olduğu kısım

Çalışmada kullanılan bir diğer haberci sistem lusiferazdır. Substratın (lusiferin) oksidasyonu sırasında ortama ışık yayılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan lusiferaz sistemler firefly, renilla ve yeni bir haberci sistem olan gaussia lusiferazdır. Gaussia lusiferazın diğer lusiferaz sistemlere göre bazı avantajları bulunmaktadır: Gaussia

lusiferazın, Firefly ve Renilla lusiferaza göre memeli hücrelerindeki biyoluminesans sinyal yoğunluğu en az 100 kat daha fazladır. 16 aminoasit büyüklüğünde sekresyon sinyal sekansı taşıması nedeni ile hücre ya da organizmanın lizisine gerek duyulmadan ortama salınabilen bir proteindir. Gaussia lusiferazın kodlanan bölgesi 555 nükleotit boyutunda olup, en küçük lusiferaz haberci sistemdir.

Gaussia lusiferaz (GLuc) bir deniz kabuklu canlısı olan *Gaussia princeps*'ten elde edilmiş 185 amino asitten oluşmakta (19.9 kDa), monomerik yapıda olup, güçlü aktivite ve yüksek stabilite gösteren bioluminesans bir proteindir.



ŞEKİL 11: Gaussian Lusiferaz haberci sistemi aracılığı ile gerçekleşen kimyasal tepkime sonucu ışık açığa çıkmaktadır

Solenterazinin (coelenterazine) imidazopirozin yapısı lusiferaz enzimi aracılığı ile sölenteramide dönüşmekte ve bu sırada 480 nm dalga boyundaki ışık yayılmaktadır (93) bu tepkime sırasında ATP gibi herhangi bir kofaktöre gerek yoktur (94).

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1 Kullanılan Plazmit DNA'lar

CART promotorunun (transkripsiyon başlama bölgesinden -1140 upstream bölgesi ve transkripsiyon başlama bölgesinden +47 downstream bölgesini içeren), 1188 baz çiftlik bölgesinin farklı haberci sistemlere bağlı olduğu 2 farklı plazmid DNA (promotorun mCherry haberci sistemine bağlı olduğu pEZX-PM02 ve promotorun gaussia lusiferaz haberci sistemine bağlı olduğu pEZX-PG04 plazmit DNA'ları) GeneCopoeia (Rockville, USA)'dan temin edildi.

Kullanılan haberci sistemlerden bir tanesi, pEZX-PM02 plazmiti, mCherry floresan sistemini içermekte olup eksitasyon ve emisyon değerleri sırası ile 587 nm ve 610 nm'dir. mCherry haberci genini içeren plazmid ile transfekte edilen hücreler floresan mikroskop altında incelenerek transfeksiyon etkinliği gözlenmiş olup, etkili transfeksiyon oranlarının ve denemelerin (ilaç uygulamalarının) zamana bağlı optimizasyonu yapıldı.

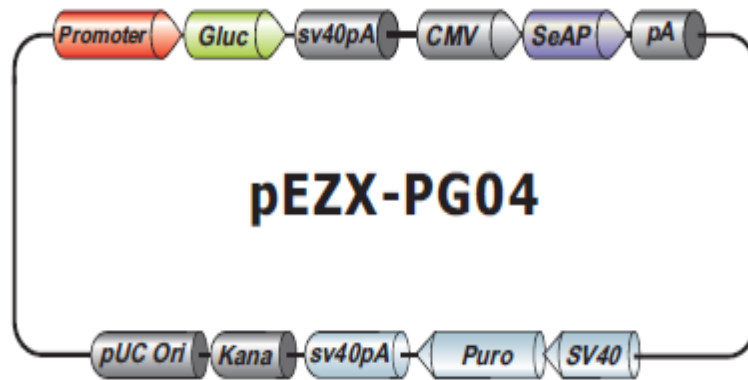
Çalışmada kullanılan bir diğer haberci sistemi içeren, pEZX-PG04 plazmiti, Gaussia lusiferaz haberci sistemine sahiptir. Gaussia lusiferaz ortama salınan bir haberci sistem olup, ölçüm yapılması için hücrelerin lizisine gerek yoktur. Hücrelerin bulunduğu ortamdan 5-20 µL'lik örnekler toplanarak ölçüm yapılabilmekte, farklı zaman dilimlerinde toplanan örnekler +4°C'de saklanabilmektedir. Saklanan örneklerin yarılanma ömürleri 6 gündür. Okutma sırasında alınan sinyal çok güçlü ise toplanan örnek medium ile 1/10 oranına kadar dilue edilebilir (8). Gaussia lusiferaz haberci sisteminin daha hassas ölçüm alınabilmesine olanak tanınması nedeni ile çalışmada ilaç uygulamalarına ait ölçümler, CART promotorunun gaussia lusiferaz haberci sistemine bağlı olduğu pDNA ile transfekte hücrelerde yapılmıştır.

pEZX-PG04/PM02 vektörlerinde sv40 (Simian virus 40 PolyA) 240 bç'lik DNA sekansı olup transkripsiyonun terminal bölgesine polyA kuyruğunu eklemektedir. sv40pA, sv40'ın intron bölgelerini taşımayan sekansıdır. pUC ori replikasyon orijini

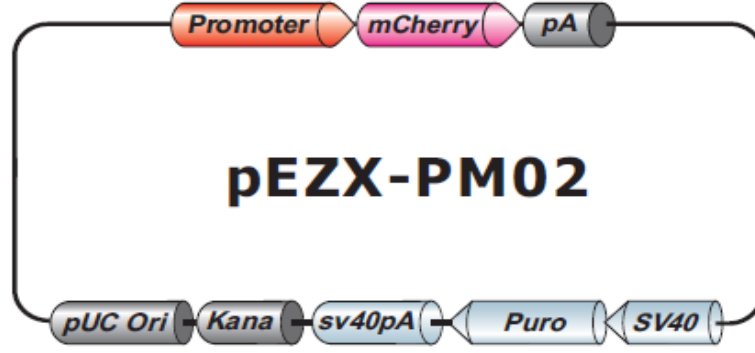
yüksek kopya sayıda ifade edilen vektörü ifade etmektedir, transformasyon işlemi (plazmit bakteriye aktarılması) sonrasında pDNA'nın yüksek kopya sayıda, her bir bakteri hücresinde 300-700 kopya çağlmasını sağlar. Vektörler kanamisin (Kana) için direnç genine sahip olup, transformasyon işleminde kanamisin kullanılmaktadır. Puromisin (Puro), memeli hücre hattına stabil transfeksiyon yapılmak istendiğinde kullanılması gereken antibiyotiktir. sv40 erken promotör genidir.

pEZX-PG04 vektöründe, CART promotörü gaussia lusiferaz haberci genine bağlı olup eş zamanlı promotör aktivitesini luminometrik olarak ölçmekte kullanılmaktadır. pDNA'nın memeli hücresindeki aktivitesi CART promotörünün aktivitesine bağlıdır. CART promotörünün aktive olması ile haberci sistemler aktif hale geçerek ölçüm ve değerlendirme yapılmasına olanak tanımaktadır. CMV (cytomegalovirus) erken cevap (immediate early) promotörüdür; SeAP (sekrete olan alkalen fosfataz) genine bağlıdır. SeAP, ikinci bir reporter genidir ve sinyal normalizasyonu için internal kontrol görevi görmektedir.

pEZX-PM02 vektöründe, CART promotörü mCherry haberci genine bağlı olup eş zamanlı promotör aktivitesini florometrik olarak ölçmekte kullanılmaktadır. Bu çalışmada mCherry reporter genine bağlı olan vektör transfeksiyon etkinliğini değerlendirerek transfeksiyonun optimizasyonunda ve transfekte hücrelerin yoğunluğunu ile lokalizasyonunu değerlendirme amaçlı kullanılmıştır.



ŞEKİL 12: Çalışmada kullanılan CART geninin promotör bölgesinin 'Gaussian Lusiferaz' haberci genine bağlı olduğu plazmit DNA'nın yapısı.



ŞEKİL 13: Çalışmada kullanılan CART geninin promotor bölgesinin 'mCherry' haberci genine bağlı olduğu plazmit DNA'nın yapısı

2.1.1 Transformasyon protokolü

Gerekli Malzemeler ve Ekipmanlar

- kompetant haldeki *E. Coli DH5α*
- plazmit
- LB besi ortamı
- kanamisin
- polipropilen tüp (Falcon 2059)
- buz
- 42°C' deki sıcak su banyosu
- 37°C 'deki sıcak su banyosunda
- santrifüj

- 1) Kompetant (transformasyon işlemi için uygun haldeki bakteri hücresi) hücreler buz üzerinde çözüldü.
- 2) Buz üzerinde transformasyon için bir 2 adet polipropilen tüp (Falcon 2059) gerekmektedir. Kompetant hücreler erimesi için ele alınmamalıdır. Hücrelerin kompetant özelliklerinin devam etmesi için hücreler buz üzerinde tutulmalı ve iyi sonuç almak için çöz-dondur yapılmamalıdır.
- 3) Kompetant hücreler yavaşça karıştırılıp, 100-120 µL'si ayrı bir tüpe transformasyonda kullanmak üzere transfer edildi. İki farklı pDNA olduğu için iki ayrı tüpe 100-120 µL kompetant haldeki bakteri hücresi eklendi.

- 4) Erimiş kompetant hücrelerden birinin bulunduğu tüpe 165 ng/μl olan pEZX-PM02'dan; diğer bir tüpe ise 286 ng/μL olan pEZX-PG04 plazmit DNA'sından 4'er μL eklendi. Tüplere hafifçe karıştırılarak DNA ile hücrelerin karışması sağlandı. (pipetleme yapılmamalı)
- 5) DNA ile hücreler 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Her 10 dakikada bir tüplere hafifçe tıklandı.
- 6) Isı şok uygulaması için hücreler 42°C' deki sıcak su banyosunda 60 saniye bekletildi. Isı şok uygulaması süresince tüplerin çalkalanmamasına özen gösterildi.
- 7) Hücreler hemen buz üzerine alındı. 2 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- 8) Önceden ısıtılmış LB besi ortamı her bir tüpe 500 μL eklenmeli. Besi ortamı ile hücrelerin süspanse hale gelebilmesi için tüpler 2-3 kez ters-düz edildi.
- 9) Transformasyon kültürlerinin bulunduğu tüpler 1 saat 37°C 'deki sıcak su banyosunda inkübe edildi
- 10) 50 mL LB içine çalışma/son konsantrasyonu 50 μg/ml kanamisininden 50 μL eklendi.
- 11) Antibiyotigi eklenmiş olan 50 mL LB besi ortamı içine 750 μL transformasyon kültürü eklendi.
- 12) Transformasyon kültürü 37°C'de 200 rpm'de 12-16 saat inkübe edildi.

2.1.2 Plazmit DNA İzolasyonu

Gerekli Malzemeler ve Ekipmanlar

- Kit (invitrogen hipure plasmid filter midiprep kit ürün kodu: K210014)
- Soğutmalı santrifüj
- Santrifüj tüpleri
- Oda sıcaklığında izopropanol
- %70 etanol
- TE (pH:8)
- Seçici besiyerinde büyütülmüş organizma (DH5α + pDNA (LB plate + kanamisin))

Transformasyon kültüründen plazmit DNA izolasyonu, midiprep kullanılarak yapıldı.

- 1) Kitteki kolonların oturabileceği genişlikte ağzı olan 500 mL'lik steril erlenler içine kolonlar yerleştirildi. İki farklı plazmit DNA olduğu için iki düzenek hazırlandı. Kolonlar ve erlenler PM02 ve PG04 olarak etiketlendi.
- 2) Membranların ıslanması ve DNA'nın membrana tutunması için kolonlara 15'er mL dengeleme tamponu (Equilibration Buffer) koyularak membranlar yıkandı.
- 3) Çözülme/liziz tamponu (Lysis buffer) çökebileceği için kullanım sırası gelinceye kadar 37°C'de bekletildi.
- 4) 2 adet 50 mL'lik falkon etiketlenerek, 20'şer mL yeniden süspansiyon hale getirme tamponu (resuspension tamponu) falkonlara konuldu üzerine 112 µL RNase eklendi.
- 5) Transformasyon kültürüne ait pelletin bulunduğu tüplere 10'ar mL yeniden süspansiyon hale getirme tamponu eklenerek pellet yeniden suspense hale getirildi.
- 6) 50 mL'lik falkonlar içerisine süspansiyonlar konularak üzerine 10'ar mL lysis buffer eklendi. Falkonlar 2-3 kez nazıkçe alt-üst edildikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- 7) Çözülme/Liziz tamponu eklenmiş olan süspansiyonlar üzerine 10 mL çökeltme tamponu (Precipitation Buffer) eklendi ve falkon birkaç kez alt-üst edildi.
- 8) Falkonda hazırlanmış olan hücre lizatı kolona aktarıldı.
- 9) Sıvının tamamı kolondan geçtikten sonra 10 mL yıkama tamponu (wash buffer) kolona eklendi. Yıkama tamponunun tamamı kolondan geçtikten sonra üstteki kolon atıldı.
- 10) 12000xg'ye dayanıklı steril tüpler etiketlenerek, DNA'nın bağlanmış olduğu filtrenin bulunduğu alttaki kolonlar bu tüplerin üzerine yerleştirildi.
- 11) Kolon içine 5 mL yürütme tamponu (Elution Buffer) eklendi. Yürütme tamponunun kolondan geçmesi tamamlanınca kolon atıldı.
- 12) Tüp içerisindeki plazmit DNA-yürütme tamponu karışımı içine 3,5 mL oda sıcaklığındaki izopropanol alkol eklendi ve karışım 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra +4°C'de 12000xg'de 30 dakika santrifüj edildi.
- 13) Üst sıvı atıldıktan sonra pelletlerin üzerine 3'er mL +4°C'deki %70 etanol eklendi ve pellet yeniden süspansiyon hale getirildi.

- 14) Süspansiyonlar 1,5 mL'lik ependorflara alınarak +4°C'de 5 dakika 12000xg'de santrifüj edildi.
- 15) Ependorflar alkolleri uçması amacı ile önceden 44°C'ye ayarlanmış olan sıcak tablada 1-2 dakika bekletildi.
- 16) Plazmit DNA tris-EDTA'da çözüldü. Bu nedenle önceden 37°C'ye getirilmiş olan TE'den 200 µL plazmit DNA pelleti üzerine eklendi.
- 17) DNA'nın tamamen TE'de çözülmesi amacı ile plazmit DNA-TE karışımı 10-15 dakika sıcak tablada bekletildi.
- 18) İzole ettiğimiz plazmit DNA'ların konsantrasyonları nanodropta ölçüldü:
PM02: 740 ng/µL
PG04: 1100 ng/µL

2.2 Transfeksiyon

Transfeksiyon yabancı bir genetik materyalin hücre içerisinde aktarılması işlemidir. Gen fonksiyonu, gen fonksiyonunun düzenlenmesi ya da protein fonksiyonunu çalışmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem hücre içerisine aktarılacak olan genetik materyalin ev sahibi hücrenin (konak hücrenin) genomuna girmesi, stabil transfeksiyon ya da ev sahibi hücrenin genetik materyaline dahil olmayarak konak hücrede geçici süre varlığını koruması, geçici transfeksiyon olarak ikiye ayrılmaktadır. Geçici transfeksiyonda plazmit DNA'nın konak hücre içerisindeki varlığı çevresel faktörlere, konak hücrenin bölünmesine bağlı olarak değişmektedir.

Transfeksiyon işlemi biyolojik, kimyasal ya da fiziksel yöntemler kullanılarak yapılabilmektedir. Kullanılan kimyasal yöntemler, katyonik polimer, kalsiyum fosfat, katyonik lipid ve katyonik aminoasittir. Bu kimyasal yöntemlerdeki temel ilke aynı olup pozitif yüklü kimyasal bileşenler negatif yüklü nükleik asitler ile pozitif yüklü nükleik asit/kimyasal kompleksini oluşturmaktadır. Nükleik asit/kimyasal kompleksin hücre membranından nasıl geçtiği kesin olarak bilinmemekte olup endositoz ve fagozitoz ile geçtiği düşünülmektedir (95).

Lipitler amfifilik organik moleküllerdir. Non-polar (hidrofobik) kısım ve polar (hidrofilik) baş kısımdan oluşmaktadır. Lipit molekülleri hidrofilik baş grupları

sayesinde sulu faz ile bağlantılarını sürdürürken, hidrofobik kısımlarını sıvı ortamdan uzaklaştırmak için çift tabakalı kapalı bir yapı oluştururlar (96)

Kimyasal yöntemlerin transfeksiyon etkinliği nükleik asit/kimyasal oranına, solüsyonun pH'sına, hücre hattının pasaj numarasına ve hücre membranına bağlı olarak değişebilmektedir.

Bu çalışmada transfeksiyon işlemi için *X-tremeGENE HP DNA transfection Reagent* (Roche, ürün kodu:06366244001 version 07) kullanıldı.

X-tremeGene™ HP transfeksiyonu zor gerçekleşen hücreler için üretilmiş bir ürün olup, %80 etanol içerisinde lipid ve diğer bileşenleri içeren nonliposomal karışımdır.

Nonlipozomal lipidler ve polimerler nükleik asitler ile birlikte miçel ya da damlacık (droplet) yapısında bir kompleks oluşturmaktadır. Transfeksiyon işlemi genellikle sıvı ortamda gerçekleşmektedir, bu sıvı ortam içerisinde amfifilik bileşenin lipofilik kısmı ya da hücre membranı gibi yağ asidi bileşenlerine afinite gösteren damlacık kısımları nükleik asitleri içine alan miçel kapsülü oluşturmaktadır (97).

Transfeksiyonun optimizasyonu amacı ile kitin prosedüründe belirtildiği kimyasal ajan (μL):pDNA (μg) oranları denenerek etkili transfeksiyon oranı belirlendi.

Bu amaçla, 350.000 hücre/kuyucuk olarak 6 kuyucuklu kültür kabına ekilen PC12 hücreleri (yoğunluk (confluence) %5-10) ekimden 3 gün sonra %1 horse serum, %0.5 FBS içeren RPMI 1640 ortamına geçirildi. 6 kuyucuklu hücre kültür kabında her kuyucukta 2 mL ortam bulunmaktadır.

Besin ortamı değişikliğinden yaklaşık olarak 30 dakika sonra transfeksiyon işlemi *X-tremeGENE HP DNA transfection reagent* (ürün kodu: 06366244001 version 07) kullanılarak yapıldı.

Transfeksiyonda kullanılan pDNA, CART promotoruna bağlı olup mCherry floresan genini içermektedir. pDNA konsantrasyonu:740 ng/ μL . (1 μL 'de 0,74 μg pDNA varsa; 1 μg pDNA 1,35 μL 'de olduğu hesaplanarak pDNA kullanıldı.)

X-tremeGENE HP DNA transfection reagent kit protokolünde belirtilen oranlara göre kimyasal ajan:pDNA oranları denenerek en etkili transfeksiyon oranını bulmak amaçladı.

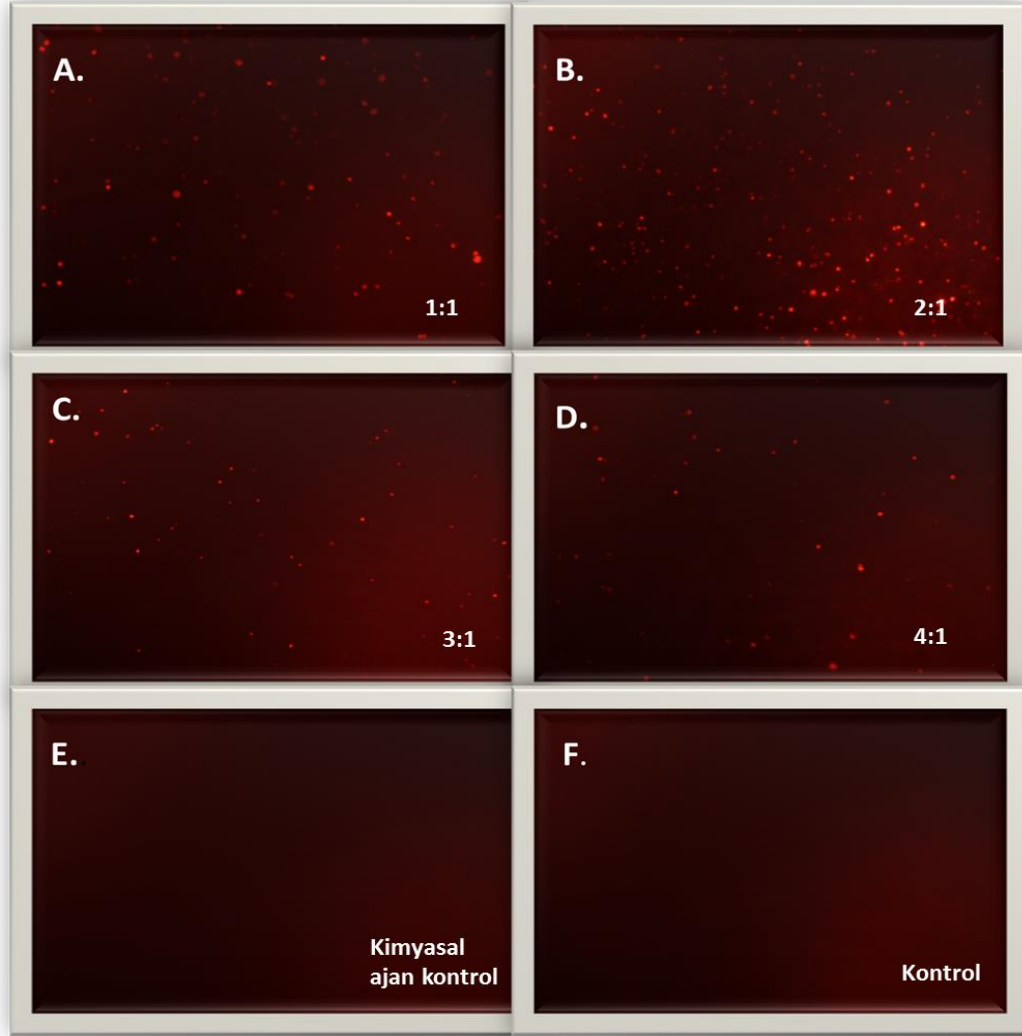
Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler kontrol edildiğinde floresan aktivite görüldü (**ŞEKİL 14**). *X-tremeGENE HP DNA transfection reagent* kit ile transfeksiyondan 48 saat sonra güçlü sinyal alınabildiği daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (98). Buna göre en etkili transfeksiyon oranınının 2:1 olduğuna karar verildi.

6 kuyucuklu hücre kültür kabında;

1. Kuyucuk → kimyasal ajan:pDNA oranı 4:1 için;
200 µL RPMI 1640 + 8 µL kimyasal ajan + 2,7 µL pDNA (mCherry)
2. Kuyucuk → kimyasal ajan: pDNA oranı 3:1 için;
200 µL RPMI 1640 + 6 µL kimyasal ajan + 2,7 µL pDNA (mCherry)
3. Kuyucuk → kimyasal ajan: pDNA oranı 2:1 için;
200 µL RPMI 1640 + 4 µL kimyasal ajan + 2,7 µL pDNA (mCherry)
4. Kuyucuk → kimyasal ajan: pDNA oranı 1:1 için;
200 µL RPMI 1640 + 2 µL kimyasal ajan + 2,7 µL pDNA (mCherry)
5. Kuyucuk → kimyasal ajan kontrolü
200 µL RPMI 1640 + 4 µL kimyasal ajan
6. Kuyucuk → kontrol
Herhangi bir işlem yapılmadı, sadece hücreler düşük serum içeren besin ortamına geçirildi.

NOT1: RPMI +pDNA + kimyasal ajan karışımına kimyasal ajanı eklemeyen önce kimyasal ajan oda sıcaklığına getirilmiş olmalı ve kimyasal ajan karışım içine eklemeyen hemen önce 2 sn karıştırıldı.

NOT2: RPMI +pDNA + kimyasal ajan karışımı 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.



ŞEKİL 14: *Transfeksiyon optimizasyonu. Transfeksiyondan 5 gün sonra, A. Kimyasal ajan:pDNA 1:1 oranında, B. Kimyasal ajan:pDNA 2:1 oranında, C. Kimyasal ajan:pDNA 3:1 oranında, D. Kimyasal ajan:pDNA 4:1 oranında E. Kimyasal ajan kontrol, F. Transfeksiyon yapılmayan sadece ortamı değiştirilen grup. (inverted floresan mikroskobu, 10x büyütmede.)*

İlaç uygulamaları için hücrelerin transfekte edilmesi amacı ile hücreler P100 (çapı 10 cm olan kültür kabı)'e $6-7 \times 10^6$ hücre ekilip hücre yoğunluğu %60-70 olduğunda transfeksiyon işlemi yapıldı.

Transfeksiyon için roche X-tremeGENE HP DNA transfeksiyon kitinde belirtildiği oranlarda transfeksiyon karışımı hazırlandı;

(kit protokolünde P100 (55 cm²) için; 10 mL ortam olması gerektiği, bunun için de 1ml RPMI için + 10 µg pDNA + (2:1 pDNA: kimyasal ajan oranı için) 20 µL transfeksiyon kimyasal ajanı olması gerektiği belirtilmiştir.)

- Transfeksiyon öncesi hücrelerin ortamı %1 hs, %0.5 fbs içeren RPMI ile değiştirildi.
- P100 içerisindeki son volüm 7750 µL olacak şekilde pDNA: kimyasal ajan karışımı hazırlandı.
- Gaussia lusiferaz reporter genini içeren plazmitin transfeksiyonu için; 7 ml besin ortamı içindeki hücreler için, 1500 µL'lik bir ependorf tüpüne 750 µL RPMI içerisine ilk önce (pDNA 1100 ng/µL konsantrasyonda) 7µL pDNA eklendi.
- Oda sıcaklığındaki kimyasal ajan 2 sn karıştırıldı ve kimyasal ajanın 15µl'si RPMI+pDNA içerisine eklendi. 37°C deki sıcak su banyosunda 15-20 dk inkübe edildi.
- Hücrelerin üzerine damla damla RPMI+pDNA+ kimyasal ajan karışımı eklendi.

2.3 PC12 Hücre Hattının Büyütülmesi

PC12 hücreleri kültür kabına tutunarak büyüyen, ankoraj bağımlı, bir hücre hattıdır, bu nedenle hücre kültür kabının kollajen, lizin gibi hücre tutunması için uygun bir madde ile kaplanması gerekmektedir. Bu deneyde tüm çalışmalar kollajen kaplı kültür kapları ile yapılmıştır.

2.3.1 Kollaj Kaplama

Stok kollajenin çözülmesi:

- 10 mg liyofilize kollajen (Roche, collagen (rat tail) version:15 ürün no:11 179179001)
- 20 uL %20'lik asetik asit
- 5 mL dH₂O (otoklavlanmış)

- 1) 1 mL %20'lik asetik asit hazırlandı. (200 µL asetik asit+ 800 µL dH₂O ependorfa konuldu. 1 mL'lik enjektör ile 0.2 µM filtreden geçirildi.)
- 2) 20 µL %20'lik asetik asit liyofilize kollajenin üzerine damlalar halinde her yerine damlatıldı.
- 3) 5 mL dH₂O liyofilize kollajenin her tarafına gelecek şekilde eklendi.
- 4) Şişe ara ara yavaş yavaş çalkalanarak iyice çözülmesi sağlandı.
- 5) Ağızı kapalı şekilde bir gece oda sıcaklığında kabinde bekletildi.
- 6) Ertesi sabah tamamının iyice çözülüp çözülmediğini kontrol edilip, +4°C'ye kaldırıldı.
- 7) 10 mg kollajenin 5 mL dH₂O'da çözülmesi sonucu konsantrasyonu 2 mg/mL olan ara stok kollajen hazırlandı.

Hücre Kültür Kaplarının Kollajen İle Kaplanması

- 50 mL'lik falkon
 - 39 mL dH₂O (otoklavlanmış)
 - 1 mL 2mg/mL ara stok kollajen
- 1) Final konsantrasyonu 50 ng/mL olan kollajen, hücre kültür kaplarına cm² başına 100 µL olacak şekilde eklenerek kaplama işlemi yapıldı.
 - 2) Bunun için, 39 mL dH₂O + 1 mL 2mg/mL ara stok kollajen karıştırılarak 50 ng/mL konsantrasyondaki kollajen hazırlandı.
 - 3) Final konsantrasyonu 50 ng/mL olan kollajen, hücre kültür kaplarına cm² başına 100 µL olacak şekilde eklenerek kaplama işlemi yapıldı.
P100 →5500 µL
T25 →2500 µL
96 kuyucuklu kültür kabı için → her kuyucuğa 40 µL
12 kuyucuklu kültür kabı için → her kuyucuğa 400 µL
6 kuyucuklu kültür kabı için → her kuyucuğa 900 µL ekledik.
 - 4) Kollajen kültür kabının her tarafına iyice yayıldı.
 - 5) Kültür kapları 20 dk inkübatörde bekletildi, ardından kapağı açık şekilde gece boyunca kabinde kurumaya bırakıldı.
 - 6) Fazladan kaplanan kültür kapları alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de saklandı.

2.3.2 Çalışmada Kullanılan İlaçların Hazırlanması

NGF: PC12 hücrelerinin farklılaştırılması amacı ile kullanılan NGF, ürünün veri sayfasında belirtildiği gibi yüksek protein içeriğine sahip ortamda; %10 serum içeren besin ortamında çözülerek ara stok NGF hazırlandı, alikotlar -20°C'de saklandı.

Forskolin: Hücre içi cAMP miktarını arttırarak CART mRNA ve peptit seviyesini arttırdığı bilinen forskolin DMSO içerisinde çözülerek ara stok forskolin hazırlanarak, alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

Nikotin: Nikotin dH₂O içerisinde çözülerek NaOH ile pH'sı 7,4'e ayarlanarak alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

2.3.3 PC12 Hücrelerinin Büyütülmesi

PC12 hücreleri önceden kollajen (roche rat tail collagen ref: 11 179179 001) ile kaplanmış T25 flasklarına 1x10⁶ ekilerek, %10 at serumu (HS) (sigma, H1270), %5 fetal sığır serumu (FBS) (sigma F9665), %1 penisilin/streptomisin (gibco, ref: 15140-122) içeren RPMI 1640 (gibco ref:52400-025) da büyütülmüştür. Her üç günde bir ortam değiştirilmiş olup, hücreler haftada bir, hücre yoğunluğu %80 olduğunda, pasajlanmıştır. Transfeksiyon için hücreler P100 petri kaplarına ekilerek, transfeksiyondan 2 gün sonra ilaç uygulaması için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 30.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Tüm deneylerde düşük pasaj sayısına sahip PC12 hücreleri kullanıldı (8-25 pasajlar).

2.3.4 Pasaj

Gerekli Malzeme ve Ekipmanlar

- 37°C tripsin (25 cm² için 1000-1500 µL)
- 37°C serum (25 cm² için 1000-1500 µL)
- 37°C %15 serum içeren hücre besin ortamı
- 15 mL'lik falkon
- santrifüj cihazı

- 1) Kültür kabı içerisinde %80 yoğunluğa erişen hücreler pasajlandı.
- 2) Pasaj işlemi için hücrelerin içinde bulunduğu ortam vakum ile çekilerek atıldı.
- 3) Hücrelerin üzerine sıcaklığı 37°C'ye gelmiş olan tripsin eklenerek inkübatörde ortalama 3 dakika bekletildi. Hücrelerin yerlerinden kalktıkları gözlemlendikten sonra, hücrelerin üzerine sıcaklığı 37°C'ye getirilmiş olan serum eklendi.
- 4) Hücreler falkona alındı.
- 5) Hücre kültür kabı ortam ile yıkandı ve ortam falkona alındı.
- 6) Falkon üzerine yeterli miktarda ortam eklendikten sonra , hücreler 5 dakika ortalama 1000 rpm'de santrifüj edildi.
- 7) Süpernatant atıldı.
- 8) Hücre pelleti üzerine 2 mL ortam eklenerek, pastör pipeti ile pellet çözülerek sayım için homojen hale getirildi.
- 9) 100 µL hücre süspansiyonu 900 µL tripan mavisi (gibi uygun miktarlarda hücre süspansiyonu:tripan mavisi kullanılarak) ile karıştırılarak hücreler thoma lamı aracılığı ile sayıldı böylece cm² deki hücre miktarı hesaplanarak, gerekli miktarlarda dilusyonları yapılan hücreler yeni kültür kaplarına ekildi.

2.3.5 PC12 Hücrelerinin Farklılaştırılması ve İlaç Uygulamaları

Pasajdan bir gün sonra hücreler farklılaşmaları için %3 HS, %1FBS, %1 P/S, 100 ng/mL 7S-NGF (Sigma N0513, Saint Louis, Missouri, USA) içeren RPMI 1640 ortamında büyütülmüş olup, ortam iki günde bir değiştirilmiştir. 3-7 gün NGF uygulanması sonucu farklılaşan hücrelere nikotin (sigma “(-)-Nicotine hydrogen tartrate salt” N5260) (50nM-100nM-300nM-1µM-3µM-10µM-100µM) ve forskolin (20 µM) (sigma F6886) uygulanmış olup 6 ve 24 saat örnekleri (20 µL) 96 kuyucuklu düz tabanlı beyaz opak kaplara (Nunc™ F96 MicroWell™ Black and White Polystyrene Plate, ürün kodu: 137865) toplandı.

Toplanan örneklerin luminometrik ölçümleri Gaussia Lusiferase Assay Kiti (NEB, ürün kodu:E3300L) aracılığı ile Thermo Varioskan Flash Reader cihazında yapıldı;

- Enjektörlü luminometre ekipmanında 100 kuyucuk ölçümü için 50 mL’lik bir falkon tüp içerisine 5 mL Biolux assay tamponu eklenip üzerine 50 µL BioLuxGluc substratı eklenmiştir.
- Falkon tüp cihaza yerleştirildi ve uygun protokoller skant software 2.4.3 programına girilerek okutma işlemi yapıldı.

2.5 İstatiksel analiz

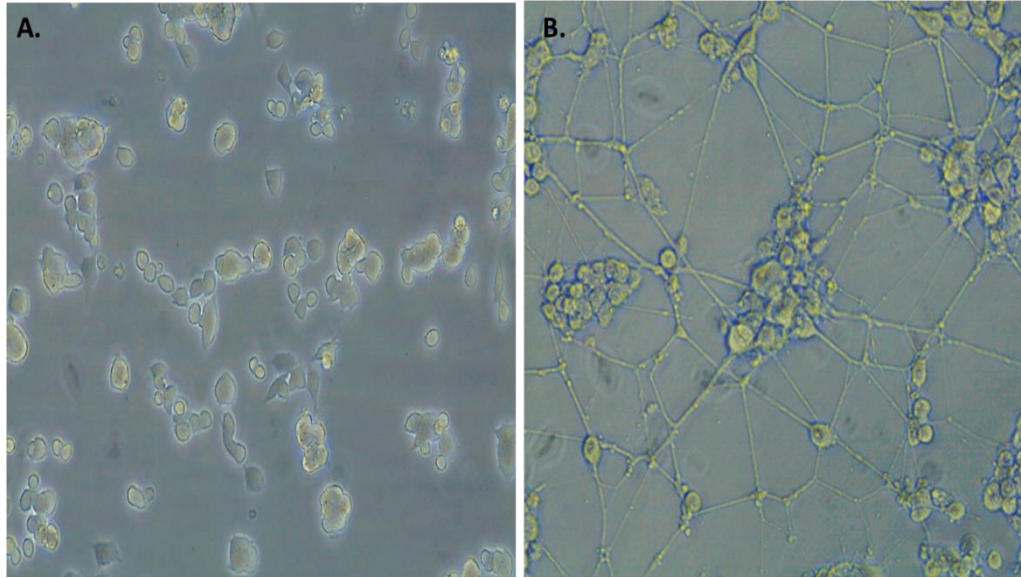
Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 16 istatistik programı kullanıldı. Grupların ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığını değerlendirmek için parametrik testlerden Bağımsız Örneklem Testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak kullanıldı.

BÖLÜM III

BULGULAR

3.1 PC12 Hücreleri NGF ile Farklılaşmaktadır

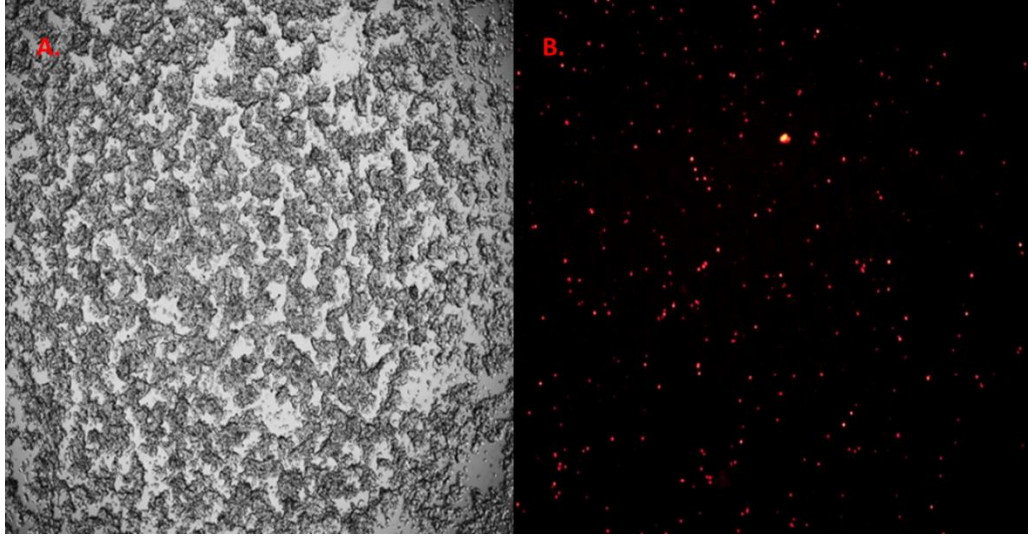
PC12 hücrelerinin farklılaştırılması amacı ile NGF kullanıldı. Literatürde 50-100 ng/mL NGF 3-7 gün uygulanarak farklılaştırılan PC12 hücreleri ile çalışmalar bulunmaktadır. Sunulan tez çalışmasının uygulamaları sürecinde PC12 hücrelerinin 3. gün itibari ile farklılaştığı, bir haftalık süreçte hücre uzantılarının giderek uzadığı görüldü.



ŞEKİL 15: PC12 hücreleri 20x inverted mikroskop görüntüleri. **A.** Farklılaşmamış PC12 hücreleri **B.** Yedi gün 100 ng/ml 7S-NGF uygulanması sonucu farklılaşmış PC12 hücreleri.

3.2 PC12 Hücre Hattında CART Gen İfadesi Gerçekleşmektedir

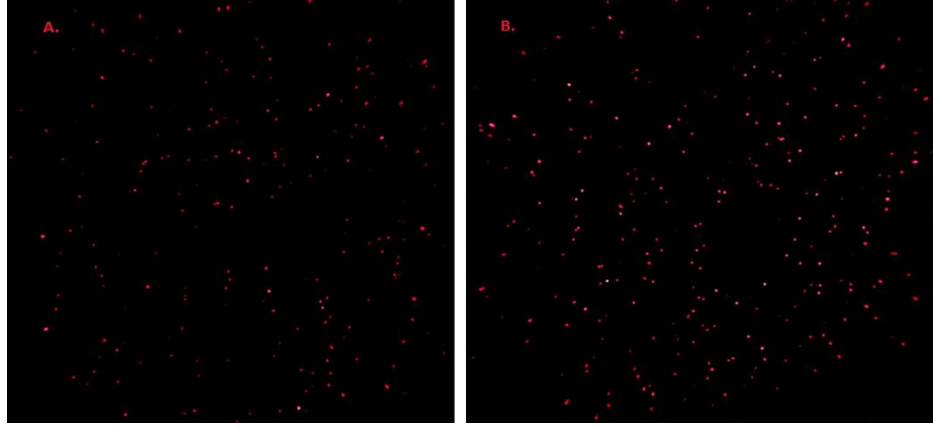
PC12 hücre hattı endojen olarak CART peptidini sentezleyebilmektedir. Herhangi bir ilaç uygulamaksızın PC12 hücrelerinde aktive olan sinyal yollarının transfeksiyonu yapılan plazmit DNA'da bulunan CART promotörünü de aktive ettiği görüldü. Dolayısı ile kullanılan plazmit DNA'nın PC12 hücrelerine transfeksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve aktive olabildiği mCherry floresan protein aktivitesinin floresan mikroskop görüntüleri ile görüldü (**ŞEKİL 16**).



ŞEKİL 16: PC12 hücrelerinin 4x mikroskop görüntüleri. Şekil A ve şekil B birbirinin eşi olup aynı bölgeden çekilmiştir. **A.** CART promotorunun mCherry haberci sistemine bağlı olduğu plazmit ile transfekte PC12 hücrelerinin transfeksiyondan 2 gün sonra ışık mikroskobu görüntüsü. **B.** Şekil A'daki hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü.

3.3 Forskolin CART Promotorunu Aktive Etmektedir

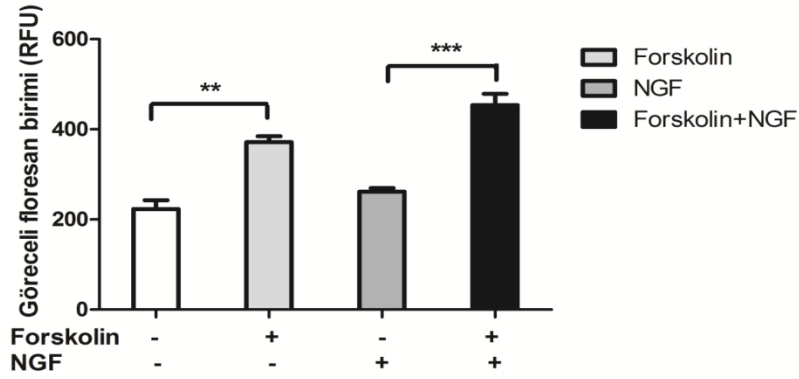
CART promotorunda yer alan CRE bölgesinin cAMP-PKA sinyal yolağının CREB fosforilasyonuna neden olması ile promotor aktivitesinin düzenlendiği ve forskolinin (adenilat siklaz enzimini aktive ederek) bu aktiviteyi arttırdığı bilinmektedir (63). Forskolinin yanı sıra, dibütril cAMP, PACAP38'in GH3 hücrelerinde CART promotor aktivitesini artırdığı bilinmektedir (6). Transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelere 20 μ M forskolin 24 saat uygulanmıştır. Forskolin uygulamasının CART promotorunu aktive ettiği görüldü. Forskolinin etkisi CART promotorunun gaussia lusiferaza bağlı olduğu plazmit DNA'ların luminometrik değerlendirilmesi ile de görülmüştür (ŞEKİL 2 ve 3). PC12 hücreleri farklılaştıktan sonra yapılan ilaç uygulamasında 6 saat (M=137,1; SD=30,99; SEM=8,94; t(22)=-3,459 p=0,002) ve 24 saat (M=190,60; SD=44,23; SEM=12,76; t(22)=-6,791 p=.000 (P<0,001) 20 μ M forskolin etkisi ölçüldü. Her iki zaman diliminde de forskolin CART promotorunun aktivesini istatistiksel olarak anlamlı olarak arttırdığı görüldü.



ŞEKİL 17: Transfeksiyondan 48 saat sonra PC12 hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri. **A.** Kontrol grubu **B.** 20 µm forskolin uygulanmış grup

3.4 NGF CART Promotor Aktivitesine Katkıda Bulunmaktadır

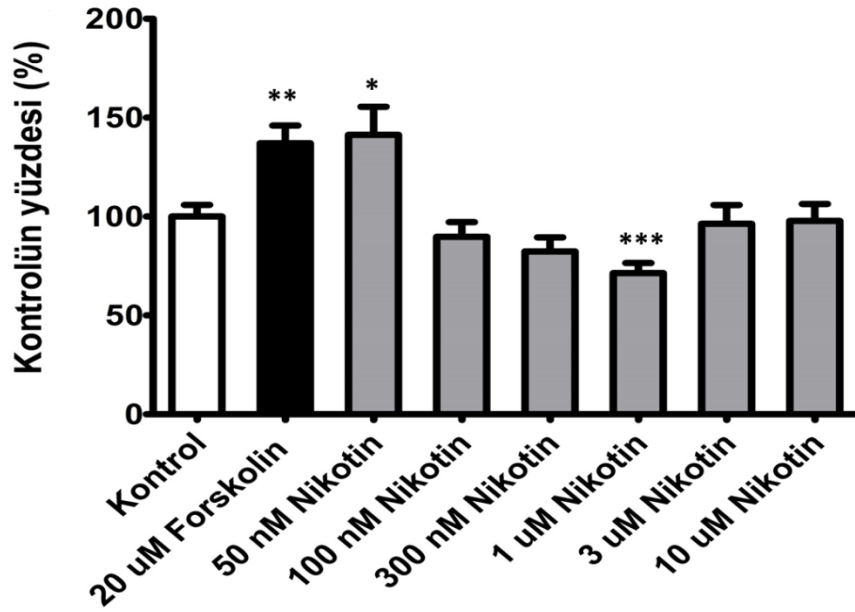
PC12 hücrelerini farklılaştırma amacı ile kullanılan NGF'in CART promotorunun aktivitesini arttırıcı yönde etki ettiği görülmüştür. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan forskolin ile birlikte NGF uygulandığında ise NGF ve forskolinin CART promotoru üzerine sinerjik etki gösterdiği görülmüştür.



GRAFİK 1: Transfekte hücrelere NGF, forskolin, NGF+forskolin uygulaması. Transfeksiyondan 48 saat sonra yapılan ilaç uygulaması sonucu elde edilen 24 saat NGF, forskolin, NGF+forskolin uygulanan PC12 hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinin image J programı ile değerlendirilmesi sonucu elde edilen grafik. ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$

3.5 Altı Saat Süresince Farklı Dozlarda Nikotin Uygulaması CART Promotoru Üzerine Bifazik Etki Etmektedir

Uygulanan dozlarda 6 saat nikotin uygulaması CART promotoru üzerine bifazik etki ettiği görüldü. 6 saat 50 nM nikotin uygulaması ile tetiklenen olası sinyal yolları CART promotor aktivesini arttırırken (M=141,1; SD=49,02; SEM=14,15; t(22)=-2,694 p=0,013); 1 µM nikotin uygulaması ise, muhtemelen nAChRlerinin hızlı duyarsızlaşmasına neden olarak CART promotor aktivitesi üzerine azaltıcı yönde etki ettiği görüldü (M=71,42; SD=17,63; SEM=5,09; t(22)=3,661 p=0.001). Deneyde kullanılan diğer nikotin dozlarının 6 saatlik süreçte CART promotor aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü.

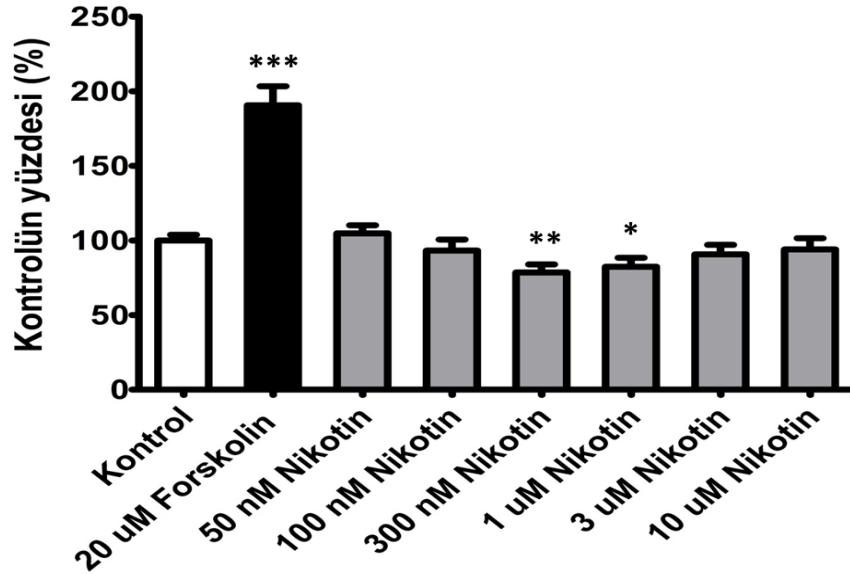


GRAFİK 2: Altı saat ilaç uygulamasının luminometrik ölçümleri. *Gaussia lusiferaz* aktivitesinin luminometrik ölçüm sonuçlarına bağlı olarak 6 saat ilaç uygulaması sonucu CART promotor aktivitesindeki değişiklikler. 6 saat 50 nM nikotin ve 20 µM forskolin uygulamasının CART promotor aktivitesini arttırdığı; 1 µM nikotin uygulamasının ise CART promotor aktivitesini azalttığı görüldü.

* p<0,05; ** p<0,005; *** p<0,001 (bağımsız örneklem testi)

3.6 Farklı Dozlarda 24 Saat Nikotin Uygulanması CART Promotor Aktivitesini Azaltmaktadır

Farklı dozlarda 24 saat nikotin uygulanması CART promotor aktivitesi üzerine azaltıcı yönde etki etmektedir. Deneyde 50 nM-100 nM-300 nM-1 μ M-3 μ M-10 μ M nikotin konsantrasyonları denenmiş olup; bunlardan 300 nM (M=78,54; SD=18,79; SEM=5,42; t(22)=3,219 p=0,004) ve 1 μ M (M=82,46; SD=20,44; SEM=5,90; t(22)=2,485 p=0,021) nikotin konsantrasyonlarının 24 saatte CART promotor aktivitesi üzerine azaltıcı yönde etki ettiği görüldü. 300 nM ve 1 μ M nikotin konsantrasyonlarının 24 saatlik süreçte gösterdiği bu etki nAChRleri'nin büyük bir kısmının desentisize hale geçmesi nedeniyle gerçekleşmiş olabileceği düşünüldü. Deneyde kullanılan diğer nikotin dozlarının 24 saatlik süreçte CART promotor aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir oranda değiştirmedeği görüldü.



GRAFİK 3: Yirmidört saat ilaç uygulamasının luminometrik ölçümleri. *Gaussia lusiferaz* aktivitesinin luminometrik ölçüm sonuçlarına bağlı olarak 24 saat ilaç uygulaması sonucu CART promotor aktivitesindeki değişiklikler. 24 saat 20 μ M forskolin uygulamasının CART promotor aktivitesini arttırdığı; 300 nM ve 1 μ M nikotin uygulamasının ise CART promotor aktivitesini azalttığı görüldü. * p<0,05; ** p<0,005; *** p<0,001 (bağımsız örneklem testi)

6 saat süresince 50 nM nikotin uygulanması ile tetiklenen olası sinyal yolları CART promotor aktivitesini arttırmaktadır ($M=141,1$; $SD=49,02$; $SEM=14,15$; $t(22)=-2,694$ $p=0,013$). Deneyde pozitif kontrol amaçlı forskolin kullanılmıştır; 6 saatlik ilaç uygulama sürecinde 50 nM nikotin; forskoline göre CART promotorunun aktivitesini daha fazla arttırdığı görüldü. 50 nM nikotin ile forskolinin 6 saatlik uygulamada CART promotorunu aktive etmeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P=0.804$).

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasında farklılaştırılan PC12 hücrelerinde farklı doz ve farklı sürelerde nikotinin CART promotörü üzerindeki etkileri araştırıldı.

PC12 hücreleri, feokromositoma hücreleri olup, sıçan adrenal bez tümöründen elde edilmiştir. Sıçan adrenal bezinde CART peptidi sentezlenmektedir (3, 67). Literatürde PC12 hücrelerinin CART peptidi sentezlediğine yönelik bir bilgi bulunmamaktadır. PC12 hücrelerinde CART peptidi ile ilgili yapılan çalışmalar genellikle CART peptidinin bağlanmasına yönelik çalışmalardır. Sunulan tez çalışmasında görülmektedir ki, PC12 hücreleri CART promotörünü içeren bir plazmit ile transfekte edildiğinde, herhangi bir ilaç uygulamadan CART promotörünün aktive olabildiği hem mCherry hem de gaussia lusiferaz haberci geninin aktivitesi ile görülmüştür.

2012 yılında Balkan B. ve ekibinin yaptığı çalışmada, CART peptidinin öncü formunun adrenal bezde bulunduğu, zorlu yüzme testi ile adrenal bezde biyolojik olarak aktif CART peptitlerinin arttığı görülmüştür (67). Bu çalışmada zorlu yüzme testi ile stres uygulanan sıçanların beyin dokularında *western blot* yöntemi ile CART peptidine bakılmıştır. Yüzme stresi sonrası adrenal bez medullasındaki noradrenarjik kromaffin hücrelerde hem toplam CART peptidi hem de 3,4-6,5kD olan (CART 55-102) CART peptit ifadesi arttığı görülmüştür (67). Dolayısı ile CART peptit seviyesinin stresle düzenlenebildiği görülmektedir. Bunun yanı sıra stres sürecinde hipotalamustan CRH salgısına neden olan CART ve nikotin, stres sürecinde HPA aksını aktive ederek strese yanıt oluşmasında benzer roller üstlenmektedir. Dolayısı ile stres ile seviyesi değişen ve strese cevap oluşmasında nikotin ile benzer roller üstlenen CART peptidinin nikotin ile etkileşime girmesi de olasıdır

PC12 hücrelerinin farklılaştırılması amacı ile NGF kullanılmıştır ve NGF uygulaması ile PC12 hücrelerinin bölünmeyi durdurarak nörona farklılaştığı gösterilmiştir. Literatürde PC12 hücrelerine 3-7 gün 50-100 ng/ml NGF uygulanması sonucu hücrelerin farklılaştıkları belirtilmiştir. Bu çalışmalarda ilaç uygulaması için kullanılan serum konsantrasyonu %1 at serumu içeren RPMI 1640 (99, 100) ya

da % 1 at serumu ile % 0,5 fetal sığır serumu içeren RPMI 1640 (101) 7 gün boyunca kullanılmıştır. Sunulan tez çalışmasının uygulamaları sırasında %1 ve %2 at serumu içeren RPMI 1640 ile NGF uygulaması durumunda 96 saatte hücrelerin öldüğünü görüldü. Bu nedenle ilaç uygulamaları için kullanılan ortamdaki serum miktarı daha yüksek kullanılmıştır (%3 at serumu, %1 fetal sığır serumu içeren RPMI 1640 kullanıldı).

Sunulan tez çalışmasında PC12 hücrelerinin farklılaşması amacı ile kullanılan NGF'in pozitif kontrol amaçlı kullanılan forskolin ile sinerjik etki göstererek 24 saat uygulanması sonucunda, CART promotor aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırdığı da görüldü (**GRAFİK 1**). Bununla ilişkili olarak forskolinin PC12 hücrelerinde hücre büyümesini durdurarak, nörit gelişimini uyardığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (102). PC12 hücrelerine forskolinin 0,01; 0,1; 1; 10 μ M konsantrasyonlarının uygulanması ile 3-24 saatten 2-5 gün süresince nöritlerin ölçümü yapıldığında düşük dozların (0,01 ve 0,1 μ M) 3-24 saatlik süreçte kontrolle aralarında anlamlı bir farklılık bulunmazken, 2-5 gün içerisinde hücrelerin %15-20'si farklılaştığı; 10 μ M forskolinin ise nörit uzamasına etkisi kısa süre içinde ortaya çıkmıştı ve 5 günlük süreçte hücrelerin %80'inin farklılaşmıştı belirtmiştir (103). Farklılaştırma amacı ile kullanılan NGF'in pozitif kontrol amaçlı kullanılan forskolin ile sinerjik etki göstererek 24 saat uygulanması sonucunda, CART promotor aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırması, adenilat siklaz aktivatörü olan forskolin ile NGF'in farklı yollarla aynı sinyal kaskadlarını (MEK/ERK) aktive etmesi (102) nedeni ile gerçekleşmiş olabilir.

2002 yılında Dominguez ve ekibinin yaptığı çalışmada sıçan hipofizinden elde edilmiş olan GH3 hücre hattına lusiferaz eksprese eden, farklı uzunluklardaki CART promotor bölgelerine sahip plazmitlerin transfeksiyonu yapılarak CART promotor aktiviteleri değerlendirilmiştir. CART gen promotorunun 5' -3451, -641 ve -102 nükleotitik kısımlarını içeren plazmitlerin aktarılmış olduğu GH3 hücrelerinde lusiferaz aktivitesine bakıldığında CART gen promotorunun 5' -3451 ve -641 nükleotit kısımlarını içeren promotorlarda güçlü aktivite gözlenmiştir. CART gen promotorunun 5' -102 nükleotitik kısmını içeren plazmit ile transfekte hücrelerdeki aktivite ise kontrol plazmiti ile transfekte edilmiş hücrelerdeki gibidir, bu promotor bölgesi CART gen promotorunda yer alan transkripsiyon faktörlerinin bağlanma

bölgelerinden CRE (cAMP response element) bölgesini içermemektedir. CART mRNA'sı cAMP aktivatörleri olan forskolin, dibütil-cAMP ve PACAP-38 tarafından upregüle edilmektedir. Aynı çalışmada GH3 hücrelerini -641 CART promotör bölgesini içeren plazmit ile transfekte edip forskolin uyguladıklarında ise forskolin uygulama süresine bağlı olarak promotör aktivitesinin arttığı görülmüştür (6).

Sunulan tez çalışmasında PC12 hücrelerinde 20 µM forskolinin 6 saat ve 24 saat uygulamalarında -1140 CART promotörünü aktive ettiği görüldü. 2002 yılında Kuhar ve ekibinin yaptığı çalışmada ise PC12 hücrelerini -641 CART promotörünü içeren plazmit ile transfekte edip, 20 µM forskolin uygulandığında CART promotöründe bir aktivite artışı görülmemiştir. Kuhar ve ekibinin yaptığı çalışmada PC12 hücrelerine yapılan diğer işlemler ve ilaç uygulama süresi yanında belirtilmemiştir. Sunulan tez çalışmasında ise NGF ile farklılaştırılmış hücreler kullanılmış olup, ilaç uygulamaları %3 serum içeren ortam ile yapılmıştır.

Yapılan bu iki çalışmadaki farklılık kullanılan hücre hattının orijinininden, hücre kültür şartlarından ya da kullanılan promotör uzunluğunun farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Fakat forskolin ve CART peptidi ile yapılan çalışmalardan bildiğimiz kadarı ile forskolin adenilat siklazı aktive ederek hücre içerisinde cAMP miktarını artırıp PKA sinyal yolağı üzerinden CREB fosforilasyonuna neden olmakta böylece CART ifadesini arttırmaktadır; her iki çalışmada da kullanılan promotör bölgeleri bu bölgeyi içermektedir. CART promotörünün -153 -127 nükleotitlik bölgesinin CRE bağlanma bölgesi olduğu ve forskolin uygulanması ile fosforile CREB miktarının arttığı gösterilmiştir (63). Promotorda yer alan farklı bölgeler ile olası etkileşime giren transkripsiyon faktörleri de bu durumu destekleyerek farklı sonuçlar çıkmasına neden olmuş olabilir. Bunun yanı sıra yapılan diğer çalışmalarda kullanılan GH3 (sıçan hipofiz), (6, 63), AtT20 (fare hipofiz) (6) ve CATH.a (fare beyin tümör hücre hattı/ fare MSS den elde edilen katekolaminerjik hücre hattı) (104) hücre hatlarında CART promotörünün aktivitesinin forskolin ile arttığı gösterilmiştir.

Yüksek doz kokain kullananlarda NAC'de CART mRNA'sı artmaktadır. Yapılan çalışmalarda CART'ın kokaine karşı oluşan ödül etkisini azaltarak, kokain bağımlılığı üzerine etki ettiği görülmüştür (69). CART'ın nikotin bağımlılığı ile ilişkili süreçlerdeki

rolü bilinmemekte; bu çalışmada farklılaşmış PC12 hücrelerinde bulunan nAChR'leri üzerinden nikotinin CART gen regülasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Çeşitli nAChR alttipleri aracılığı ile aktive olduğu bilinen çeşitli sinyal yollarının CART genini de aktive etmesi olasıdır. Çalışmada 50 nM nikotinin 6 saat boyunca uygulanması CART promotor aktivitesini arttırdığı görüldü (**GRAFİK 2**). Dolayısı ile diyebiliriz ki nikotin aracılığı ile aktive olan sinyal yolları CART geninin aktivitesini arttırmaktadır. Fakat çalışmada 50 nM nikotin konsantrasyonunun 24 saat uygulanması durumunda artan CART promotor aktivitesinin bazal seviyeye geri döndüğü görüldü (**GRAFİK 3**). Bunun yanı sıra 6 saat süresince uygulanan diğer nikotin dozları ve 24 saat uygulanan nikotin dozları, CART promotor aktivitesini ya etkilemediği ya da aktivitesini azalttığı görüldü. Çalışmada uygulanan nikotin dozuna ve süresine bağlı olarak ortaya çıkan farklı yanıtların nAChR'lerinin biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Uzun süreli nikotin uygulamasının $\alpha 4\beta 2$ reseptörlerinin sayısını artırırken "upregüle ederken" (28, 105); kemirgen ve maymun beynindeki $\alpha 6\beta 3$ (28) ve presinaptik $\beta 2$ (105) reseptörlerinin sayısını azaltmaktadır (downregüle etmektedir). Bu çalışmada kullanılan hücre hattının sahip olduğu reseptör kompozisyonu tam olarak bilmiyor olsakta azalan CART promotor aktivitesine etki eden mekanizmanın reseptör sayısındaki azalma olabileceğini söyleyebiliriz.

Nikotin tüm nAChR alttiplerini aktive edebilmektedir. Nikotinin farklı beyin bölgelerindeki farklı nAChR alttiplerine bağlanma afinitesi değişkenlik göstermektedir. Agonistin reseptöre olan afinitesi Kd değeri "*dissociation constant*" ile ifade edilmektedir. Kd, agonistin reseptörlerin %50 (EC50) 'sine bağlı olduğu agonist konsantrasyonunu ifade etmektedir. Kd değeri ne kadar küçükse agonistin reseptöre bağlanma afinitesi o kadar fazladır (106). Beyindeki asetilkolinin $\alpha 4\beta 2$ reseptörleri için Kd değeri, 7-20 μM ; nikotin için bu değer 4,2 μM 'dir. $\alpha 3\beta 4$ için asetilkolinin Kd değeri 34 μM iken; nikotin için bu değer 10,2 μM 'dir. $\alpha 7$ için asetilkolinin Kd değeri 1100 μM iken; nikotin için bu değer 40-83 μM 'dir (107). Bu verilerden yola çıkarak diyebiliriz ki nikotinin nAChR'lerine bağlanabilme afinitesi ACh'tan daha güçlüdür ve reseptör alttipine bağlı olarak ligand afinitesi farklılık

göstermektedir. Bunun yanı sıra reseptörün nikotine afinitesi arttıkça reseptörün duyarsızlaşma hızı da artmaktadır (28).

Bilinmektedir ki nAChR'lerinin endojen agonisti ACh'dir, ACh'nin reseptöre bağlanması sonucu iyon kanalı açık konformasyona geçer ve iyon akışı gerçekleşir, birkaç ms sonra ise kanal kapanır ya da duyarsız hale geçer. ACh'nin asetilkolinesteraz aracılığı ile ortamdan uzaklaştırılması nedeni ile ACh aracılığı ile gerçekleşen duyarsızlaşma çok uzun sürmemekte, dolayısı ile sinir-kas kavşağı için duyarsızlaşma önemli değildir (108). Fakat nikotin gibi nAChR agonistlerinin ortamda uzun süre kalması ya da tekrarlayan uygulamaların nAChR'lerini duyarsız hale getirdiği bilinmektedir (39). J. A. Dani ve ekibinin 2000 yılında, ventral tegmental alan kesitleri ve sıçan hipokampal nöron kültür hücrelerini kullanılarak yaptıkları çalışmada nikotin uygulaması yapılarak elektrofizyolojik ölçümler ile hücrelerin duyarsızlaşma aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sigara kullanan kişilerdeki nAChR aktivitesini görebilmek için araştırmacılar öncelikle muskarinik asetilkolin reseptörleri inhibe edilmiş ventral tegmental alan hücrelerini kullandılar. Hücre gövdelerinin 15-30 μM uzağına 1mM konsantrasyonda 20s ara ile düzenli olarak asetilkolin enjekte eden bir düzenek yerleştirilerek, 0.5 μM nikotin düzenli olarak yıkama- uygulama "*bath-applied*" işlemi yapılmış ve 2 dakika ara ile voltaj klemp "*voltage clamp*" tekniği ile ölçüm alınmıştır. Sigara kullanan kişilerdeki durumun taklit edildiği bu çalışmada başlangıçta nikotin varlığı ile hücrede aksiyon potansiyalinin oluşarak hücrenin depolarize olduğu fakat devam eden süreçte reseptör aktivitesinin basal düzeye geri döndüğü (reseptörlerin duyarsızlaştığı) görülmüştür. Hipokampal nöron kültür hücreleri ile yapılan çalışmada ise, hücrelere 500 μM nikotin uygulanmış olup, reseptörlerin aktivitesine, duyarsızlaşmasına ve çeşitli antagonistlere duyarlılıklarına bağlı olarak; nikotin uygulamasına cevap veren 3 farklı akım "*current*" tanımlanmıştır. (Örneğin tiplA denen akımın $\alpha 7$ nAChR'lerine bağlı olduğu, $\alpha 7$ nAChR'leri olmayan mutant farelerde tiplA akımının olmaması ile görülmüştür.) Yüksek doz nikotin uygulanması sonucunda reseptör duyarsızlaşmasını takiben yıkama işlemi sonrasında reseptörlerin duyarsız halden çıkma/iyileşme "*recovery*" süreleri ölçülmüştür, bu sürenin reseptör alt tipine bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (40, 108). Bunun yanı sıra ortamda bulunan Ca^{+2}

konsantrasyonunun da aynı reseptör alttipinin duyarsızlaşma süresine etki ettiği belirtilmiştir (108). Nikotik reseptör alttipleri agonist konsantrasyonuna, agonsitin uygulandığı süreye ve duyarsızlaşmanın ortadan kalkma süresine bağlı olarak farklılık göstermektedir, örneğin $\alpha7$ nAChR'leri milisaniyeler içinde çok hızlı bir şekilde duyarsızlaşırken; $\alpha3\beta4$ ve $\alpha4\beta2$ nAChR'leri daha yavaş, saniyeler içinde duyarsız hale gelmektedir (40, 109).

Dolayısı ile sunulan tez çalışmasında görülen yüksek doz ve uzun süreli nikotin uygulamasına karşı alınan azalmış CART promotor cevabının nAChR'lerinin duyarsızlaşması nedeni ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu sonuç, nAChR'lerinin duyarsızlaşması CART geninin dolaylı negatif düzenleyici olabileceğini göstermektedir.

BÖLÜM V

SONUÇ VE ÖNERİLER

Nikotin düşük dozda uygulandığında kısa zaman aralığı içinde PC12 hücrelerinde CART promotor aktivitesini artırır. Yüksek dozlar ve sürenin uzaması durumunda ise promotor aktivitesini baskılar. Bu bifazik etki nAChR'lerinin duyarlılaşma ve duyarsızlaşmasından kaynaklanıyor olabilir.

PC12 hücreleri çeşitli nAChR alttiplerini bulundurmaktadır, literatürde belirtildiği üzere NGF ve nikotin uygulaması sonucu bu hücrelerdeki reseptör kompozisyonu da değişmektedir. Literatürde PC12 hücrelerinin içerdiği nAChR alt tiplerinin seviye ve çeşitliliğine yönelik farklı bilgiler bulunmaktadır, bu farklılığın ise hücre orijinine ve hücre kültür ortamına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Dolayısı ile bu çalışmanın devamında kullanılan hücre hattının gerek NGF, gerekse nikotin uygulaması sonucu değişmesi muhtemel olan reseptör çeşitliliğine bakılması ortaya çıkan sonucun değerlendirilmesi bakımından önemli olabilir. Çünkü CART peptidi beyinde tüm bölgelerde sentezlenmemektedir, sentezlendiği bölgelerdeki nAChR alttip kompozisyonu büyük ölçüde bilinmektedir. Dolayısı ile CART promotoru üzerine etki eden sinyal yollarının hangi nAChR alttipleri aracılığı ile gerçekleştiği bilirse gerek kolinerjik yollar gerekse nikotin etkisi ile değişen CART peptid sentezi netlik kazanabilir.

Sunulan tez çalışmasında nikotinin 6 saatlik süreçte 50 nm konsantrasyonda CART promotorunu aktive ettiği luminometrik ve floresan haberci sistemler aracılığı ile görüldü. İleri aşamalarda gen aktivasyonu mRNA düzeyinde değerlendirilerek çalışma desteklenebilir. Bu çalışmayı takiben, PC12 hücrelerinde nikotin uygulaması sonucu aktive olan genin proteine dönüşmesine de bakılabilir. 2012 yılında Balkan ve ekibinin yaptığı çalışmada, CART peptidinin öncü formunun adrenal bezde bulunduğu, zorlu yüzme testi ile adrenal bezde biyolojik olarak aktif CART peptitlerinin arttığı görülmüştür (67). Bu çalışmadan da yola çıkarak, nikotin uygulanması ile CART geni aktive oluyor ve proteine dönüşüyorsa, açığa çıkan CART peptidinin biyolojik olarak aktif form olup olmadığı da değerlendirilebilir.

BÖLÜM VI

KAYNAKÇA

1. Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. Trends in neurosciences. 1997;20(2):92-8. Epub 1997/02/01.
2. Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1995;15(3 Pt 2):2471-81. Epub 1995/03/01.
3. Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Ling NC, DeSouza EB, Kuhar MJ. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. Journal of neuroendocrinology. 1997;9(11):823-33. Epub 1998/01/07.
4. Jones DC, Kuhar MJ. Cocaine-amphetamine-regulated transcript expression in the rat nucleus accumbens is regulated by adenylyl cyclase and the cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase a second messenger system. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2006;317(1):454-61. Epub 2005/12/03.
5. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1976;73(7):2424-8. Epub 1976/07/01.
6. Dominguez G, Lakatos A, Kuhar MJ. Characterization of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide gene promoter and its activation by a cyclic AMP-dependent signaling pathway in GH3 cells. Journal of neurochemistry. 2002;80(5):885-93. Epub 2002/04/12.
7. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. Nature biotechnology. 2004;22(12):1567-72. Epub 2004/11/24.
8. Tannous BA. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo. Nature protocols. 2009;4(4):582-91. Epub 2009/04/18.
9. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. Annual review of biochemistry. 1990;59:783-836. Epub 1990/01/01.
10. Deneff C. Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. Journal of neuroendocrinology. 2008;20(1):1-70. Epub 2007/12/18.
11. Jessell TM, Kandel ER. Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. Cell. 1993;72 Suppl:1-30. Epub 1993/01/01.
12. Cooper GM, R.E. . The cell: a molecular approach. USA: ASM Press: Boston University; 2004.
13. Franco R. G-protein-coupled receptor heteromers or how neurons can display differently flavoured patterns in response to the same neurotransmitter. British journal of pharmacology. 2009;158(1):23-31. Epub 2009/05/09.
14. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell. 1995;80(2):179-85. Epub 1995/01/27.
15. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. Science. 2002;296(5573):1636-9. Epub 2002/06/01.
16. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science; 2002.
17. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2000;103(2):211-25. Epub 2000/11/01.
18. Broughton SE, Hercus TR, Lopez AF, Parker MW. Cytokine receptor activation at the cell surface. Current opinion in structural biology. 2012;22(3):350-9. Epub 2012/04/24.

19. Johnson FM, Gallick GE. SRC family nonreceptor tyrosine kinases as molecular targets for cancer therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2007;7(6):651-9. Epub 2007/11/30.
20. Brivanlou AH, Darnell JE, Jr. Signal transduction and the control of gene expression. *Science*. 2002;295(5556):813-8. Epub 2002/02/02.
21. Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annual review of biochemistry*. 1997;66:807-22. Epub 1997/01/01.
22. Lodish H BA, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. 2000.
23. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological reviews*. 1998;50(2):197-263. Epub 1998/07/02.
24. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal*. 2000;351 Pt 2:289-305. Epub 2000/10/12.
25. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410(6824):37-40. Epub 2001/03/10.
26. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298(5600):1911-2. Epub 2002/12/10.
27. Ochoa EL, Chattopadhyay A, McNamee MG. Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cellular and molecular neurobiology*. 1989;9(2):141-78. Epub 1989/06/01.
28. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*. 2009;89(1):73-120. Epub 2009/01/08.
29. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*. 2012;76(1):116-29. Epub 2012/10/09.
30. Dale HH. Discussion on the Therapeutic Value of Hormones. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1914;7(Ther Pharmacol Sect):34-40. Epub 1914/01/01.
31. Hurst R, Rollema H, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;137(1):22-54. Epub 2012/08/29.
32. Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological reviews*. 1998;50(2):279-90. Epub 1998/07/02.
33. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1981;391(2):85-100. Epub 1981/08/01.
34. Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, et al. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*. 2001;411(6835):269-76. Epub 2001/05/18.
35. Changeux JP. The TiPS lecture. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends in pharmacological sciences*. 1990;11(12):485-92. Epub 1990/12/01.
36. Lukas RJ, Changeux JP, Le Novere N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, et al. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacological reviews*. 1999;51(2):397-401. Epub 1999/06/03.
37. Kandel E, Schwartz JH, Jessell T, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. *Principle Of Neural Science*. 5th ed: McGrawHill; 2012 October 26.
38. Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, et al. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature*. 2001;411(6835):261-8. Epub 2001/05/18.

39. Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2007;47:699-729. Epub 2006/10/03.
40. Dani JA, Jenson D, Broussard JI, De Biasi M. Neurophysiology of Nicotine Addiction. *Journal of addiction research & therapy*. 2011;S1(1). Epub 2012/03/29.
41. Dani JA, De Biasi M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2001;70(4):439-46. Epub 2002/02/14.
42. Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA. Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(8):3176-85. Epub 2003/04/30.
43. Buisson B, Bertrand D. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4((beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(6):1819-29. Epub 2001/03/14.
44. Li MD, Parker SL, Kane JK. Regulation of feeding-associated peptides and receptors by nicotine. *Molecular neurobiology*. 2000;22(1-3):143-65. Epub 2001/06/21.
45. Nakayama H, Numakawa T, Ikeuchi T, Hatanaka H. Nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase and CREB in PC12h cells. *Journal of neurochemistry*. 2001;79(3):489-98. Epub 2001/11/10.
46. Picciotto MR, Corrigall WA. Neuronal systems underlying behaviors related to nicotine addiction: neural circuits and molecular genetics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(9):3338-41. Epub 2002/04/30.
47. Picciotto MR, Addy NA, Mineur YS, Brunzell DH. It is not "either/or": activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Progress in neurobiology*. 2008;84(4):329-42. Epub 2008/02/05.
48. Gourlay SG, Benowitz NL. Arteriovenous differences in plasma concentration of nicotine and catecholamines and related cardiovascular effects after smoking, nicotine nasal spray, and intravenous nicotine. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1997;62(4):453-63. Epub 1997/11/14.
49. Rose JE, Behm FM, Westman EC, Coleman RE. Arterial nicotine kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction. *Drug and alcohol dependence*. 1999;56(2):99-107. Epub 1999/09/11.
50. Society AC. Questions About Smoking, Tobacco, and Health. 2014; Available from: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/tobaccocancer/questionsaboutsmokingtobaccoandhealth/questions-about-smoking-tobacco-and-health-how-many-use>.
51. Organization WH. Tobacco. 2014; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>.
52. Tweed JO, Hsia SH, Lutfy K, Friedman TC. The endocrine effects of nicotine and cigarette smoke. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2012;23(7):334-42. Epub 2012/05/09.
53. Guan J, Mao C, Xu F, Zhu L, Liu Y, Geng C, et al. Low doses of nicotine-induced fetal cardiovascular responses, hypoxia, and brain cellular activation in ovine fetuses. *Neurotoxicology*. 2009;30(2):290-7. Epub 2009/05/22.
54. De Biasi M, Dani JA. Reward, addiction, withdrawal to nicotine. *Annual review of neuroscience*. 2011;34:105-30. Epub 2011/03/29.
55. Zoli M, Picciotto MR. Nicotinic regulation of energy homeostasis. *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*. 2012;14(11):1270-90. Epub 2012/09/20.
56. McFadden KL, Cornier MA, Tregellas JR. The role of alpha-7 nicotinic receptors in food intake behaviors. *Frontiers in psychology*. 2014;5:553. Epub 2014/06/18.

57. Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Sulem P, Besenbacher S, Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, et al. A common biological basis of obesity and nicotine addiction. *Translational psychiatry*. 2013;3:e308. Epub 2013/10/03.
58. Kodaira M, Wasaka T, Motomura E, Tanii H, Inui K, Kakigi R. Effects of acute nicotine on somatosensory change-related cortical responses. *Neuroscience*. 2013;229:20-6. Epub 2012/11/13.
59. Heath CJ, Picciotto MR. Nicotine-induced plasticity during development: modulation of the cholinergic system and long-term consequences for circuits involved in attention and sensory processing. *Neuropharmacology*. 2009;56 Suppl 1:254-62. Epub 2008/08/12.
60. Raval AP, Hirsch N, Dave KR, Yavagal DR, Bramlett H, Saul I. Nicotine and estrogen synergistically exacerbate cerebral ischemic injury. *Neuroscience*. 2011;181:216-25. Epub 2011/02/22.
61. Dominguez G. The CART gene: structure and regulation. *Peptides*. 2006;27(8):1913-8. Epub 2006/05/24.
62. Douglass J, Daoud S. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene*. 1996;169(2):241-5. Epub 1996/03/09.
63. Lakatos A, Dominguez G, Kuhar MJ. CART promoter CRE site binds phosphorylated CREB. *Brain research Molecular brain research*. 2002;104(1):81-5. Epub 2002/07/16.
64. Zhang J, Wang S, Yuan L, Yang Y, Zhang B, Liu Q, et al. Neuron-restrictive silencer factor (NRSF) represses cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) transcription and antagonizes cAMP-response element-binding protein signaling through a dual NRSE mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(51):42574-87. Epub 2012/10/23.
65. Barrett P, Davidson J, Morgan P. CART gene promoter transcription is regulated by a cyclic adenosine monophosphate response element. *Obesity research*. 2002;10(12):1291-8. Epub 2002/12/20.
66. Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *The Journal of comparative neurology*. 1998;391(1):115-32. Epub 1998/04/04.
67. Balkan B, Keser A, Gozen O, Koylu EO, Dagci T, Kuhar MJ, et al. Forced swim stress elicits region-specific changes in CART expression in the stress axis and stress regulatory brain areas. *Brain research*. 2012;1432:56-65. Epub 2011/12/06.
68. Kuhar MJ, Jaworski JN, Hubert GW, Philpot KB, Dominguez G. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides play a role in drug abuse and are potential therapeutic targets. *The AAPS journal*. 2005;7(1):E259-65. Epub 2005/09/09.
69. Hubert GW, Jones DC, Moffett MC, Rogge G, Kuhar MJ. CART peptides as modulators of dopamine and psychostimulants and interactions with the mesolimbic dopaminergic system. *Biochemical pharmacology*. 2008;75(1):57-62. Epub 2007/09/15.
70. Moffett MC, Song J, Kuhar MJ. CART peptide inhibits locomotor activity induced by simultaneous stimulation of D1 and D2 receptors, but not by stimulation of individual dopamine receptors. *Synapse*. 2011;65(1):1-7. Epub 2010/05/28.
71. Balkan B, Gozen O, Yasarbas G, Koylu EO, Akinturk S, Kuhar MJ, et al. CART expression in limbic regions of rat brain following forced swim stress: sex differences. *Neuropeptides*. 2006;40(3):185-93. Epub 2006/04/29.
72. Vicentic A, Jones DC. The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;320(2):499-506. Epub 2006/07/15.
73. Brennan DJ, O'Connor DP, Laursen H, McGee SF, McCarthy S, Zagazdzon R, et al. The cocaine- and amphetamine-regulated transcript mediates ligand-independent activation of ERalpha, and is an independent prognostic factor in node-negative breast cancer. *Oncogene*. 2012;31(30):3483-94. Epub 2011/12/06.

74. Jia J, Chen X, Zhu W, Luo Y, Hua Z, Xu Y. CART protects brain from damage through ERK activation in ischemic stroke. *Neuropeptides*. 2008;42(5-6):653-61. Epub 2008/07/23.
75. Balkan B. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: a possible regulator of the stress response. *OA Neuroscience*. 2013;6. OA publishing London.
76. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: thirty-five years later. *The EMBO journal*. 1987;6(5):1145-54. Epub 1987/05/01.
77. Aloe L. Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends in cell biology*. 2004;14(7):395-9. Epub 2004/07/13.
78. Meakin SO, Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends in neurosciences*. 1992;15(9):323-31. Epub 1992/09/01.
79. Chen JY, Lin JR, Cimprich KA, Meyer T. A two-dimensional ERK-AKT signaling code for an NGF-triggered cell-fate decision. *Molecular cell*. 2012;45(2):196-209. Epub 2011/12/31.
80. Yung LY, Tso PH, Wu EH, Yu JC, Ip NY, Wong YH. Nerve growth factor-induced stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase in PC12 cells is partially mediated via G(i/o) proteins. *Cellular signalling*. 2008;20(8):1538-44. Epub 2008/05/30.
81. Melnikova IN, Gardner PD. The signal transduction pathway underlying ion channel gene regulation by SP1-C-Jun interactions. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(22):19040-5. Epub 2001/03/23.
82. Qui MS, Green SH. PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron*. 1992;9(4):705-17. Epub 1992/10/01.
83. Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(21):18169-77. Epub 2001/03/30.
84. Kumar S, Chakraborty S, Barbosa C, Brustovetsky T, Brustovetsky N, Obukhov AG. Mechanisms controlling neurite outgrowth in a pheochromocytoma cell line: the role of TRPC channels. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(4):1408-19. Epub 2011/05/28.
85. Rogers SW, Mandelzys A, Deneris ES, Cooper E, Heinemann S. The expression of nicotinic acetylcholine receptors by PC12 cells treated with NGF. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1992;12(12):4611-23. Epub 1992/12/01.
86. Henderson LP, Gdovin MJ, Liu C, Gardner PD, Maue RA. Nerve growth factor increases nicotinic ACh receptor gene expression and current density in wild-type and protein kinase A-deficient PC12 cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1994;14(3 Pt 1):1153-63. Epub 1994/03/01.
87. Nakamura S, Takahashi T, Yamashita H, Kawakami H. Nicotinic acetylcholine receptors and neurodegenerative disease. *Alcohol*. 2001;24(2):79-81. Epub 2001/08/28.
88. Nakayama H, Ueno S, Ikeuchi T, Hatanaka H. Regulation of alpha3 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA levels by nerve growth factor and cyclic AMP in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*. 2000;74(4):1346-54. Epub 2000/03/29.
89. Nakayama H, Shimoke K, Isosaki M, Satoh H, Yoshizumi M, Ikeuchi T. Subtypes of neuronal nicotinic acetylcholine receptors involved in nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase in PC12h cells. *Neuroscience letters*. 2006;392(1-2):101-4. Epub 2005/10/13.
90. Avila AM, Davila-Garcia MI, Ascarrunz VS, Xiao Y, Kellar KJ. Differential regulation of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells by nicotine and nerve growth factor. *Molecular pharmacology*. 2003;64(4):974-86. Epub 2003/09/23.
91. Jiang T, Xing B, Rao J. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnology & genetic engineering reviews*. 2008;25:41-75. Epub 2008/01/01.

92. Li Y, Sierra AM, Ai HW, Campbell RE. Identification of sites within a monomeric red fluorescent protein that tolerate peptide insertion and testing of corresponding circular permutations. *Photochemistry and photobiology*. 2008;84(1):111-9. Epub 2008/01/05.
93. Rathnayaka T, Tawa M, Nakamura T, Sohya S, Kuwajima K, Yohda M, et al. Solubilization and folding of a fully active recombinant *Gussia luciferase* with native disulfide bonds by using a SEP-Tag. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1814(12):1775-8. Epub 2011/09/29.
94. Cheng G, Davis RE. An improved and secreted luciferase reporter for schistosomes. *Molecular and biochemical parasitology*. 2007;155(2):167-71. Epub 2007/08/08.
95. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010;397(8):3173-8. Epub 2010/06/16.
96. Bhattacharya S, Bajaj A. Advances in gene delivery through molecular design of cationic lipids. *Chem Commun (Camb)*. 2009(31):4632-56. Epub 2009/07/31.
97. Grigoryev Y. Principles and Mechanisms of Mammalian Cell Transfection. 2012; Available from: <http://bitesizebio.com/9288/principles-and-mechanisms-of-mammalian-cell-transfection/>
98. Sandbichler AM, Aschberger T, Pelster B. A method to evaluate the efficiency of transfection reagents in an adherent zebrafish cell line. *BioResearch open access*. 2013;2(1):20-7. Epub 2013/03/22.
99. Cimato TR, Ettinger MJ, Zhou X, Aletta JM. Nerve growth factor-specific regulation of protein methylation during neuronal differentiation of PC12 cells. *The Journal of cell biology*. 1997;138(5):1089-103. Epub 1997/09/08.
100. Brynczka C, Merrick BA. The p53 transcriptional target gene *wnt7b* contributes to NGF-inducible neurite outgrowth in neuronal PC12 cells. *Differentiation; research in biological diversity*. 2008;76(7):795-808. Epub 2008/01/08.
101. Lai HC, Wu MJ, Chen PY, Sheu TT, Chiu SP, Lin MH, et al. Neurotrophic effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone: promotion of neurite outgrowth via cAMP/PKA/CREB pathway in PC12 cells. *PLoS one*. 2011;6(11):e28280. Epub 2011/12/06.
102. Ferrari A, Faraci P, Cecchini M, Beltram F. The effect of alternative neuronal differentiation pathways on PC12 cell adhesion and neurite alignment to nanogratings. *Biomaterials*. 2010;31(9):2565-73. Epub 2009/12/29.
103. Park KH, Park HJ, Shin KS, Choi HS, Kai M, Lee MK. Modulation of PC12 cell viability by forskolin-induced cyclic AMP levels through ERK and JNK pathways: an implication for L-DOPA-induced cytotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2012;128(1):247-57. Epub 2012/04/28.
104. Dominguez G, Kuhar MJ. Transcriptional regulation of the CART promoter in CATH.a cells. *Brain research Molecular brain research*. 2004;126(1):22-9. Epub 2004/06/23.
105. Changeux JP. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nature reviews Neuroscience*. 2010;11(6):389-401. Epub 2010/05/21.
106. David L, Nelson MMC. *Lehninger Principle Of Biochemistry*. 5th edition ed: W.H. Freeman & Company; 2008 January 1, 2008.
107. Sacco KA, Bannon KL, George TP. Nicotinic receptor mechanisms and cognition in normal states and neuropsychiatric disorders. *J Psychopharmacol*. 2004;18(4):457-74. Epub 2004/12/08.
108. Dani JA, Radcliffe KA, Pidoplichko VI. Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *European journal of pharmacology*. 2000;393(1-3):31-8. Epub 2000/04/20.
109. Giniatullin R, Nistri A, Yakel JL. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends in neurosciences*. 2005;28(7):371-8. Epub 2005/06/28.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Müzeyyen UĞUR

Doğum: 30/01/1987

Eğitim

- 2014- :Yüksek Lisans
Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Ab.D
- 2012- :Yüksek Lisans,
Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilim Ab.D
- 2007-2012:Lisans,
Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik

Opsiyonu

Deneyim

- 31/01/2012 - :Nikotin Tercih Eden ve Etmeyen Sıçanlarda Oral Nikotin Alımının Takibi
- 31/01/2012 - 10/10/2013 :Nikotin Tercih Eden ve Etmeyen Sıçanlarda, Oral Nikotin Alımı, Nikotin Yoksunluğu ve Yoksunluk Sonrası Yeniden Nikotin Tercih Çalışması (EÜBAM)
- 04/07/2011 - 16/08/2011:Staj (EÜBAM)
- 15/07/2008 – 15/08/2008:Staj (Ege Üniversitesi, Tıp Fak. Patoloji)

Sertifika ve Katılım Belgeleri

- Deney Hayvanları Kullanım Kursu
- Pedagojik Formasyon Sertifika Programı
- Nöropsikofarmakoloji Sempozyumu (Üsküdar Üniversitesi)
- 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi (Erciyes Üniversitesi)
- 11.Ulusal Sinirbilim Kongresi (Ege Üniversitesi)
- Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Genetik 4.Bahar Okulu (KTÜ)
- Uluslararası Ege Üniv. 3. ve 4. Moleküler Biyoloji ve Genetik Uygulamaları Platformu (Ege Üniversitesi)
- Ege Üniv. Yapay Doku ve Organ Sempozyumu (Ege Üniversitesi)
- Ege Üniv. 1., 2. ve 3. Kök Hücre Sempozyumu (Ege Üniversitesi)

Mail Adresi: muzeyyenugur@gmail.com

