



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALFA 7 NİKOTİNİK ASETİL KOLİN RESEPTÖRLERİNİN K562
HÜCRE ÇOĞALMASI VE SİNYAL İLETİSİNDEKİ ROLLERİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

GÖZDE ÖNDER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. HÜLYA CABADAK

2019-İSTANBUL



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALFA 7 NİKOTİNİK ASETİL KOLİN RESEPTÖRLERİNİN K562
HÜCRE ÇOĞALMASI VE SİNYAL İLETİSİNDEKİ ROLLERİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

GÖZDE ÖNDER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. HÜLYA CABADAK

2019-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Biyofizik
Tez Sahibi : Gözde ÖNDER
Tez Başlığı : Alfa 7 nikotinik asetil kolin reseptörlerinin K562 hücre çoğalması ve sinyal iletilisindeki rolleri üzerine çalışmalar
Sınav Yeri : M.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 09/04/2019

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr.Hülya Cabadak

Kurumu

Marmara Üniv. Tıp Fak.

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan,

Adı, Soyadı)

Prof.Dr.İlhan Onaran I.Ü.Cerrahpaşa Tıp.Fak.

Dr.Öğr.Ü.Cevdet Nacar Marmara Ü.Tıp.Fak.

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 17/04/2019 tarih ve 84 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

F. Arıcıoğlu.
Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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



GÖZDE ÖNDER

Sevgili Babama,

Anneme ve Babaanneme,



I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisansımın her aşamasında donanımından faydalanma fırsatı bulduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim, akademik birikimine hayran olduğum, beni her daim düşünen, çalışmaya teşvik eden, ılımlı tavırlarıyla anne güveni veren zarif danışmanım Prof. Dr. Hülya CABADAK' a,

Bu süreçte değerli zamanını ayırarak engin bilgileriyle bana yol gösteren, güler yüzlü yaklaşımı ile akademik birikimini paylaşan çok kıymetli hocam Prof. Dr. Ferit PEHLİVAN' a,

Sonsuz sabırlı ve anlayışlı davranarak tecrübelerini tüm açık yürekliliğiyle paylaşan, çalışmamda çok emeği geçen, maddi manevi her anlamda yardımına koşan ve abla sıcaklığı gösteren naif hocam Arş. Gör. Dr. Banu AYDIN'a,

Her daim sıcak tavırları, nezaketleri ve emeklerinden dolayı değerli hocalarım Doc. Dr. Ayşe GARİP, Doc. Dr. Oya ORUN, Doc. Dr. Pınar MEGA TİBER, Dr. Öğr. Üyesi Cevdet NACAR ve Arş. Gör. Olca KILINÇ'a,

Aynı ekipte olmaktan ötürü kendimi çok mutlu ve huzurlu hissettiğim, iyi kalpli, güler yüzlü, canım arkadaşlarım Ayşe Melek T.B., Zehra K. ve Onat K.' e,

Bütün desteği ile yol arkadaşı olan iyi kalpli kıymetli dostum Ozan ÇUHADAR başta olmak üzere, Hande İpek Y., Pınar İ., Melike K., Esra C.A.'a,

Güvenli ve huzurlu bir süreç geçirmemde bana yardımcı olan, evlerinin kapılarını açan koruyucu meleklerim, Hacı&Nimet DÖNMEZ ve Dönmez ailesinin bütün fertlerine, Ali&Fazilet KARADAĞ ve Karadağ ailesinin tüm fertlerine,

Sevgili kuzenim Elif Dağlaroğlu, çok değerli İbrahim Narin ve canım arkadaşım İrem İnceçay başta olmak üzere desteklerinden dolayı bütün arkadaşlarıma,

Teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ve Canım Ailem, Babam, Annem, Ablam, Eniştem, Kardeşim ve bu süreçte kaybettiğim canım Babaannem, desteğiniz, sabrınız, emekleriniz ve en başından beri bana sonsuz güvendiğiniz için en büyük teşekkürüm sizlere...

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR.....	ii
II. İÇİNDEKİLER	iii
III. KISALTMALAR ve SİMGELER.....	v
IV. ŞEKİL LİSTESİ	vi
V. TABLO VE RESİM LİSTESİ.....	viii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Kolinergik Reseptörler.....	5
4.2. Nikotinik Reseptörler.....	7
4.2.1. Nikotinik reseptörlerin sınıflandırılması ve tanımlanması.....	7
4.2.2. Nikotinik reseptörlerin kromozomal lokalizasyonu.....	9
4.2.3. Nikotinik reseptörlerin yapısal özellikleri.....	9
4.3. Nikotinik Reseptörlerin Fizyolojik Fonksiyonları ve Dokularda Dağılımı .	11
4.4. Nikotinik Reseptörlerin Hücre Çoğalmasındaki Roller.....	12
4.5. Nikotinik Reseptörler ve Kanser.....	16
4.6. Nikotinik Agonist ve Antagonistler	23
4.6.1. Asetilkolin	26
4.6.2. Nikotin	27
4.6.3. MLA.....	28
4.7. Kalsiyum.....	29
4.7.1. EGTA	31
4.8. K562 Kronik Miyeloid Lösemi Hücreleri	32
5. GEREÇ ve YÖNTEM	36
5.1. Gereçler.....	36
5.1.1. Kimyasal maddeler.....	36
5.1.2. Cihazlar	38
5.1.3. Tampon ve çözeltilerin bileşimi.....	39
5.1.3.1. Protein izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	40
Hücre Lizatının hazırlanması	40
5.1.3.2. Lowry metodunda kullanılan çözeltiler.....	41

5.1.3.3. Elektroforez ve Western emdirimi analizlerinde kullanılan çözeltiler	41
5.2. Yöntem.....	44
5.2.1. Çalışmada kullanılan hücrelerin hazırlanması	44
5.2.1.1. Hücrelerin çoğaltılması	44
5.2.1.2. Hücrelerin agonist, antagonist ve inhibitörlerle muamelesi	44
5.2.1.3. Hücrelerin sayılması	45
5.2.1.4. Ca^{+2} ölçüm deneyleri	46
5.2.1.5. Hücrelerin toplanması	46
5.2.2. Hücre özütlerinin hazırlanması	46
5.2.3. Elektroforez	46
6. BULGULAR	48
6.1. K562 Hücre sayımı sonuçları	48
6.1.1. K562 hücre çoğalmasının hemositometrede tripan mavisi yöntemi ile belirlenmesi	48
6.1.2. K562 hücre çoğalmasının BrDU yöntemi ile belirlenmesi	48
6.1.2.1. K562 hücre çoğalmasına ACh konsantrasyonlarının etkisi	48
6.1.2.2. K562 hücre çoğalmasına MLA konsantrasyonlarının etkisi	49
6.1.2.3. K562 hücre çoğalmasına agonist ve antagonistlerin etkisi.....	50
6.1.2.4. K562 hücre çoğalmasına ATR' nin etkisi	50
6.1.2.5. K562 hücre çoğalmasına MLA' nın etkisi	52
6.1.3. K562 hücrelerinde agonist ve antagonist konsantrasyonuna bağlı Ca^{+2} akışı	54
6.1.4. K562 hücrelerinde agonist ve antagonist varlığında Ca^{+2} akışı.....	56
6.2. Western Blot Deneyi.....	59
6.2.1. K562 hücrelerinde nikotinik $\alpha 7$ reseptör ekspresyonu	60
6.2.2. K562 hücrelerinde agonist ve antagonistlerin $\alpha 7$ nikotinik reseptör ekspresyonuna etkisi	60
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
8. KAYNAKLAR.....	71
9. ÖZGEÇMİŞ.....	98

III. KISALTMALAR ve SİMGELER

4DAMP: 4-difenil-asetoksi-N-metil-piperidin methiodid

ACh: Asetilkolin

BSA: Sığır serum albümini

BrDU: Bromodeoksiuridin

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FDS: Fetal dana serumu

GDP: Guanozin difosfat

GTP: Guanozin 5'-trifosfat

HEPES: N-(2-Hidroksietil) piperazin N-(2-etansülfonik asit)

MAPK: Mitojenle-aktive olan protein kinaz

MLA: Methyilkakonitine

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

nAChR: Nikotinik Asetilkolin Reseptörü

NBT/BCIP: Nitroblutetrazolyum/Bromokloroindol fosfat

PMSF: Fenil metil sülfonil klorür

SDS: Sodyum dodesil sülfat

TEMED: N, N, N', N',-tetrametiletildiamin

Tris: Trishidroksimetilaminometan

v/v: Hacim / hacim

w/v: Ağırlık / hacim

IV. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1. <i>Urtica dioica</i>	5
Şekil 4.2. Nikotinik reseptörlerin genel yapısı (tipik ligand kapılı iyon kanalı), asetilkolinin bağlanma bölgesi.	10
Şekil 4.3. nAChR yapısının homopentamerik ve heteropentamerik olarak gösterimi.	11
Şekil 4.4. Alfa 7 nikotinik asetil kolin reseptörünün şematik gösterimi.	11
Şekil 4.5. Nikotinik Alfa 7 reseptör sinyal yolları	21
Şekil 4.6. Nöronal olmayan kanser hücrelerinde nAChR' nin etkileri	22
Şekil 4.7. Nikotinik reseptörlere agonist ve antagonist bağlanma bölgeleri.	25
Şekil 4.8. Asetilkolinin Kimyasal Yapısı.	26
Şekil 4.9. Nikotinik kimyasal yapısı.	28
Şekil 4.10. MLA' nın Kimyasal Yapısı.	29
Şekil 4.11. EGTA' nın kimyasal yapısı.	32
Şekil 4.12. Hücre farklılaşması.	33
Şekil 4.13. Philadelphia kromozomunu oluşturan translokasyonun şematik diyagramı.	34
Şekil 4.14. Yapısal olarak aktif olan BCR-ABL tirozin kinaz.	35
Şekil 6.1. K562 hücre çoğalmasına asetilkolinin etkisi.	49
Şekil 6.2. K562 hücre çoğalmasına MLA' nın etkisi.	50
Şekil 6.3. K562 hücre çoğalmasına ATR' nin etkisi. K562 hücre çoğalmasına ACh, ve/veya ATR' nin etkisi.	51
Şekil 6.4. K562 hücre çoğalmasına ATR' nin etkisi.	52
Şekil 6.5. K562 hücre çoğalmasına MLA' nın etkisi. K562 hücre çoğalmasına MLA' nın 24.saatdeki etkisi.	53
Şekil 6.6. K562 hücre çoğalmasına MLA' nın 48. saatdeki etkisi.	54
Şekil 6.7. K562 hücrelerinde ACh konsantrasyonunun zamana bağlı Ca^{+2} akışına etkisi.	55
Şekil 6.8. K562 hücrelerinde MLA konsantrasyonunun zamana bağlı Ca^{+2} akışına etkisi.	56
Şekil 6.9. K562 hücrelerinde agonist ve antagonist varlığında Ca^{+2} akışı (1.2. ve 3. okumalar).	57

Şekil 6.10. K562 hücrelerinde ACh varlığında Ca^{+2} akışı.....	58
Şekil 6.11. K562 hücrelerinde MLA varlığında Ca^{+2} akışı.....	59
Şekil 6.12. K562 hücrelerinde bulunan nikotinik $\alpha 7$ asetil kolin reseptör ekspresyonu.....	61



V. TABLO VE RESİM LİSTESİ

Tablo 4.1. nAChR alt birimlerini kodlayan genlerin kromozomal lokalizasyonu.....	9
Tablo 4.2. nAChR alt birimlerini ifade eden kanser hücresi tipleri	20
Tablo 4.3. Nikotinik reseptörlerin bazı antagonistleri	25
Resim 6.1 K562 hücre çoğalmasının hemositometrede tripan mavisi yöntemi ile belirlenmesi	48



Alfa 7 Nikotinik asetilkolin reseptörlerinin K562 hücre çoğalması ve sinyal iletisindeki rolleri üzerine çalışmalar

Öğrenci: Gözde ÖNDER

Danışman: Prof. Dr. Hülya CABADAK

Anabilim Dalı: Biyofizik

1. ÖZET

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR'leri) hücre fizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. nAChR'leri kanseri de içeren birçok hastalıkla ilişkilidir. nAChR'ler iyonotropik katyon kanallarıdır. Bu reseptörler nöronal ve nöronal olmayan hücrelerde eksprese olmaktadır. nAChR'lerin nöronal olmayan hücrelerdeki ekspresyonu tam olarak bilinmemektedir. Nikotinik reseptörler sinapslarda aksiyon potansiyeline aracılık eden ligand kapılı iyon kanalı olarak bilinmesine rağmen çeşitli nöronal olmayan dokularda hücre kominikasyonları, hücre çoğalması, adhezyon, migrasyon, salgı, hücre sağkalımı ve apoptoz gibi hücresel fonksiyonlarda önemlidir. Bu çalışmanın amacı asetilkolinin insan eritrolösemi hücrelerinde $\alpha 7$ nikotinik reseptör ekspresyonuna, hücre çoğalmasına ve kalsiyum düzeyine etkisini belirlemektir. Eritrolösemi hücrelerinde $\alpha 7$ nAChR ekspresyonu düzeyi Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Asetilkolinin hücre çoğalmasına ve kalsiyum düzeyine etkisi sırasıyla BrdU kiti ve ELISA kiti kullanılarak belirlenmiştir. Eritrolösemi hücrelerinde nikotinik agonist ve/veya antagonistler ile hücre çoğalması, kalsiyum düzeyinin, $\alpha 7$ nAChR nikotinik reseptör ekspresyonunun belirlenmesi nikotinik reseptörlerin farklı sinyal ileti yolları ile etkileşiminin aydınlatılmasına ve literatüre katkı sağlayacak ve gerekli tedaviler için bilgi oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Nikotinik reseptör, asetilkolin, antagonist, agonist, K562 hücreleri

Studies on the role of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in K562 cell proliferation and signaling

Student: Gözde ÖNDER

Supervisor: Prof. Dr. Hülya CABADAK

Department: Biophysics

2. SUMMARY

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) play an important role in cellular physiology. nAChRs are closely associated with many human diseases including cancer. These nAChRs typically are ionotropic cationic nicotinic receptor channels. These receptors are widely expressed on neuronal and non-neuronal cells. Expression pattern of nAChRs in nonneuronal cells is largely unknown. Nicotinic receptors are important in cellular functions such as cell communication, cell proliferation, adhesion, migration, secretion, cell survival and apoptosis in various non-neuronal tissues, although ligand-gated ion channels mediate synaptic potency at synapses. Aim of the study at examining the effect of acetylcholine on expression of $\alpha 7$ nAChRs, determining in cell proliferation and levels of calcium in human erythroleukemia cells. Immuno blotting is used to quantify $\alpha 7$ -nAChR expression in erythroleukemia cells. The effect of acetylcholine on cell proliferation and calcium level are detected by BrDu kit and ELISA kit respectively. Determination of cell proliferation, calcium level, $\alpha 7$ nAChR nicotinic receptor expression by nicotinic agonists and / or antagonists in erythroleukemic cells will elucidate the interaction of nicotinic receptors with different signaling pathways and will contribute to the literature and provide information for the necessary therapies.

Keywords: Nicotinic receptor, acetylcholine, antagonist, agonist, K562 cells

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Bu tezde, insan eritrolösemi hücrelerinde asetilkolin'in hücre çoğalmasına, $\alpha 7$ nikotinik reseptör ekspresyonuna etkisi yanısıra kalsiyum düzeyine etkisi belirlenmiştir. Asetilkolin (ACh), kanser hücreleri için "otokrin ve / veya parakrin büyüme faktörü" olarak görev almaktadır (Russo ve Bufalo, 2014). Asetilkolin (ACh) kolinerjik sisteme aracılık eden nörotransmitterdir. Asetilkolin iki farklı reseptör ailesi ile etkileşmektedir. Bunlar nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) veya muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR)dir (Zdanowski ve ark. 2015). Nöronal olmayan hücrelerin kolinerjik kontrolü, farklı reseptörler aracılığıyla tetiklenir. ACh'nin nAChR ile etkileşimi kanalın açılmasına ve kalsiyum akışına neden olurken, ACh'nin mAChR'ye bağlanması ile G protein aracılı metabolik olaylar tetiklenir (Russo ve Bufalo, 2014). Nikotinik reseptörler hem nöronal hem de nöronal olmayan hücrelerde eksprese olmaktadır. Nikotinik asetilkolin reseptörleri nöronlarda hızlı sinaptik iletime aracılık eden heterojen bir iyon kanalı ailesidir (Zdanowski ve Krzyżowska, 2015). Çeşitli hastalıklarla tütün kullanımının ilişkisi bulunmuştur. Nöronal olmayan nAChR sinyal yolağının kanser ve kardiyovasküler hastalıklarda önemli etkileri vardır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, kanser hücrelerinde $\alpha 7$ nikotinik reseptörünün nikotinin proliferatif etkilerine aracılık eden ana nAChR alt birimi olduğunu göstermiştir (Gotti ve Clementi, 2004).

Homomerik $\alpha 7$ nAChR'leri, nikotin aracılı hücre çoğalmasına aracılık eden birincil reseptörlerdir, ancak diğer reseptör alt birimleri de katılabilmektedir (Schaal ve Chellappan, 2014). Nikotin asetilkoline (ACh) göre daha yüksek afinite ile nAChR'lere bağlanır (Russo ve Bufalo, 2014).

Nikotinin kanser gelişimine katkısı olduğunu gösteren çeşitli kanıtlar vardır. *In vitro* hücre kültürleri üzerine yapılan deneysel çalışmalar, *in vivo* kemirgenler üzerindeki çalışmalar ve insanlardaki epidemiyolojik çalışmalar da dahil yapılan çalışmalar, diğer tütün bileşenlerinden bağımsız olarak nikotinin kanser gelişiminde önemli etkileri uyardığı gösterilmiştir (Schaal ve Chellappan, 2014; Sergei ve Grando 2014) $\alpha 7$ nAChR'ü, Ca^{+2} 'a oldukça seçicidir (Russo ve Taly, 2012; Le Novère ve Corringier, 2002; Cardinale ve ark., 2012; Barik ve Wonnacott, 2009) ve hücre sağkalımını artırmaktadır.

Kronik olarak nikotine maruz kalma ile nAChR ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Russo ve Taly, 2012; Cardinale ve ark., 2012; Barik ve Wonnacott, 2009; Govind ve ark., 2009). Kanser hücrelerinin çoğalması ve sağkalımında hücreler arası ve hücre içi sinyal yolları önemlidir. Kanser hücresi türüne bağlı olarak, farklı asetilkolin reseptörleri belirlenmiştir.

In vitro Akut Miyeloid Lösemi (AML) hücreleri ile çalışmak bu hücrelerin canlı kaldığı süre ile sınırlıdır. K562 hücre soyu granülosit soyunun erken farklılaşma evresini temsil eder, insan natural killer hücre tayininde hassas hedef hücre olarak kullanılır (Andersson ve ark., 1979). K562 hücreleri miyeloid lösemi, normal miyeloid gelişiminde, farklılaşmanın kontrolünde ve gen ekspresyonu çalışmalarında kullanışlı bir model sistem olarak kullanılmaktadır (Koeffler ve Golde, 1980). K562 hücre soyu 1975 yılında Lozzio ve arkadaşları tarafından kronik miyeloid lösemi hastasının blastik kriz evresinde plevra sıvısından geliştirilmiştir (Lozzio ve Lozzio, 1975). İnsan eritrolösemi K562 hücrelerinde ACh'nin nikotinik reseptörler aracılı hücre çoğalması ve kalsiyum düzeyine etkisi ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Nöronal olmayan kolinerjik sistemin nikotinik reseptörler ile ilişkisini belirlemek üzere, yaptığımız bu projede kolinerjik agonist ACh'nin ve/veya nikotinik antagonist varlığında $\alpha 7$ nikotinik reseptor ekspresyonuna, hücre çoğalmasına ve kalsiyum düzeyine etkisi çalışılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kolinerjik Reseptörler

Kolinerjik sistem en önemli ve filogenetik olarak bilinen en eski yollara sahiptir (Gotti ve Clementi, 2004). İlk olarak, *Urtica* ısırgan otu üyesi olan, *Urtica dioica* bitkisinin, kolinerjik reseptörlerinin agonistleri veya antagonistlerine maruz bırakılan deneyler kurgulanmıştır. Bu deneyler, *Urtica dioica*'da, kolinerjik sistemin, su homeostazının ve fotosentezin düzenlenmesinde rol oynadığına dair ilk deneysel kanıtları sağlar. Ek olarak, bitkilerde eksprese edilen asetilkoline duyarlı reseptörlerin hayvan dokusuyla karşılaştırılabilir olduğu açıktır, çünkü klasik antagonistler atropin ve kürarın her ikisi de alkaloid etkilidir (Wessler ve ark., 2001). *Urtica dioica* bitkisinin fotoğrafı Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Urtica dioica*

Photograph by: Lindman, C.A.M., Bilder ur Nordens Flora, vol. 2: t. 364 (1922-1926)

Günümüzde insan kolinerjik sistemi, hem nöronal hem de nöronal olmayan hücrelerde, hücresel sinyal iletilişinde ve hücresel lokalizasyonu nedeniyle farklı süreçleri düzenler (Russo ve ark., 2012). Nöronal olmayan hücrelerde, hem nAChR'ler (nikotinik asetil kolin reseptörler) hem de mAChR'ler (muskarinik asetil kolin reseptörler), hücreler arası iletişim için, fenotipik fonksiyonlarını korumak ve

dolayısıyla organ homoeostazisi için kullanılırlar (Wessler ve ark., 2001; Russo ve ark., 2012). Kolinerjik sistemde nöronlar tarafından sentezlenen asetil kolin (ACh), depolanan ve salınan bir nörotransmitterdir. ACh'nin bağlandığı muskarinik ve nikotinik reseptörler, kolinerjik reseptörlerdir. Günümüzde kolinerjik reseptörlerin nöronal olmayan ACh salınımının “oto- ve parakrin- düzenleyici döngüsü”nün bir parçası olduğuna inanılmaktadır (Wessler ve Kirkpatrick, 2008).

Asetil kolin reseptörleri (AChR), kolinerjik nöronlar tarafından sentezlenen, depolanan ve son olarak salınan ACh bağlanmasına cevap veren integral zar proteinleridir (Changeux ve ark., 1970). Diğer birçok ligandla aktive edilmiş nörotransmitter reseptörleri gibi, AChR'ler farmakolojik özelliklerine veya çeşitli moleküller için afinitelerine göre sınıflandırılır (Russo ve ark., 2014). Bu nedenle, iki ana alt tipe ayrılabilirler:

1- mAChR'ler: Omurgalı iskelet kaslarında bulunan metabotropik mAChR'ler, omurgalı iskelet kaslarında bulunur, nöromüsküler kavşakta nöromüsküler geçişe aracılık eder (Ishii ve Kurachi, 2006). mAChR'ler heptahelik GTP bağlayıcı protein (G-protein) - kenetli reseptörlerin sınıfına aittir. Beş alt türü vardır: M₁-M₅ (Caulfield ve Birdsall, 1998). Genellikle, M₁, M₃ ve M₅ mAChR alt türleri, tercihen G_q / 11 ailesinin G proteinlerine (adenilil siklazı inhibe etmez) fosfolipaz C (PLC)'yi aktive eder; M₂ ve M₄ alt tipleri Gi / Go ailesi G proteinleri aracılı adenilat siklazı inhibe eder, ancak PLC'yi uyarmazlar (Hassall ve ark., 1993). Bununla birlikte, bu spesifiklik tam değildir, çünkü M₂ ve M₄ reseptörleri, spesifik hücre tiplerinde yüksek seviyelerde eksprese edildiğinde PLC'yi aktive edebilir. Bu etki, $\beta\gamma$ alt birimlerin Gi / Go'dan serbest bırakılması ile ilgilidir (Katz ve ark., 1992). Hem M₃ hemde M₂ reseptörlerinin yüksek çözünürlüklü yapıları, her bir reseptörün yapısal özelliklerini farklı G proteinleri birleştirme seçiciliği ile doğrudan ilişkilendirme olanağını sağlayabilir. M₃ / M₂ yapı analizi, her mAChR alt tipinin ligand bağlanma bölgelerindeki farklılıklarını ortaya koymuştur (Kruse ve ark., 2012).

2- nAChR'ler: Özellikle nikotine cevap veren ve sadece periferik ve merkezi sinir sistemlerinde değil aynı zamanda nöronal olmayan dokularda da bulunan iyonotropik reseptörlerdir (Changeux ve Edelstein, 2001).

Nikotinik ve muskarinik reseptörler arasında farmakolojik farklılıklar vardır. Bu reseptörler hem asetilkolin hem de karbakol ile uyarılmaktadır. Bu alt tiplerin her ikisi de endojen nörotransmitter ACh tarafından aktive edilir ve vücutta hem nöronal hem de nöronal olmayan hücrelerde eksprese edilir (Dani ve Bertrand, 2007). nAChR bir Ca^{+2} / Na^{+1} iyon kanalıdır. Ca^{+2} / Na^{+1} değişim oranı, AChR alt tipine bağlıdır ve $\alpha 7$ alt tipinin Ca^{+2} / Na^{+1} iyonuna afinitesi Na^{+1} 'a göre daha yüksektir (Thunnissen, 2009). mAChR, zarı yedi kez kateden G proteini ile kenetli reseptörler ailesine aittir ve beş alt tipe (M_1 - M_5) sahiptir. nAChR'ye benzer şekilde, mAChR'ler ayrıca genetik olarak farklı alt birimleri olan proteinlerdir (Thunnissen 2009; Wess, 1996).

4.2. Nikotinik Reseptörler

Nikotinik reseptörler hem nöronal hemde nöronal olmayan hücrelerde eksprese olmaktadır. Nöronal olmayan hücrelerdeki rolleri henüz tam açıklanamamıştır.

AChR'lerinin bir alt tipi olan nAChR hızlı iyonotropik katyonik reseptörlerdir. Bu iyon kanalları asetilkolin ve nikotin ile aktivasyona duyarlıdır ve çok hızlı aktive olurlar (Albuquerque ve ark., 2009). Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChRs), nöronlarda hızlı sinaptik iletme aracılık eden heterojen bir iyon kanalı ailesini oluştururlar. Bronşiyal epitel ve keratinositler gibi nöronal olmayan hücrelerde de bulunurlar ve sinir iletiminin dışında farklı işlevlere sahiptirler. Çeşitli hastalıklarla tütün kullanımı birlikte göz önüne alındığında nöronal olmayan nAChR sinyal yolağının kanser ve kardiyovasküler hastalıklar için önemli etkileri vardır. Son yıllardaki araştırmalar, kanser hücrelerindeki $\alpha 7$ nAChR'nin, nikotinin proliferatif etkilerine aracılık eden ana nAChR altbirimi olduğunu göstermiştir (Egleton ve ark., 2008). Sonuç olarak, $\alpha 7$ nAChR'ü, akciğer kanseri ve mezotelyoma gibi kanserlerin tedavisi için önemli bir moleküler hedef olabilir. Geliştirilmiş seçiciliğe sahip nAChR antagonistlerinin tasarımı içeren gelecekteki çalışmalar, tütüne bağlı kanserlerin tedavisi için yeni stratejiler belirleyebilir (Egleton ve ark., 2008).

4.2.1. Nikotinik reseptörlerin sınıflandırılması ve tanımlanması

Nöronal nikotinik reseptörler (nACh) sinir sisteminde yaygın bir şekilde bulunur. Merkezi sinir sisteminde (MSS), nAChR'ler yoluyla iletilen kolinerjik innervasyon, uyanıklık, uyku, yorgunluk, anksiyete, ağrı duyusunun merkezi olarak

işlenmesi, gıda alımı ve çok sayıda bilişsel işlev gibi fizyolojik işlevlerde kritik önemi bulunan nörotransmitter salınımı, hücre uyarılabilirliği ve nöronal entegrasyon gibi süreçleri düzenler (Paterson ve ark., 2004).

“Nöronal olmayan kolinerjik sistem” ve “nöronal olmayan asetilkolin” terimleri ise ilk olarak 1970’lerde Sastry ve Sadavongvivad tarafından tanıtılmıştır (Sastry ve Sadavongvivad 1978). O zamandan beri, farklı nöronal olmayan dokulardaki nAChR işlevini araştırmak üzere çok sayıda çalışma yapılmıştır. Keratinositlerde nikotinik asetilkolin reseptörleri (Zia, 2000) lenfositler, makrofajlar, mast hücreleri, dendritik hücreler, bazofiller (Kawashima ve ark., 2007), mikroglia, endotelial hücreler (Wang ve ark., 2001) epitel hücreleri ve fibroblastlar dahil olmak üzere kan hücrelerinde (Zia ve ark., 1997) bulunmuştur. Bu reseptörün ekspresyonu, tümör hücrelerinde de gözlenmiştir ve kanser progresyonunda potansiyel rolü olduğunu düşündürmektedir (Improgo ve ark., 2013; Cooke ve Ghebremariam, 2008; de Jonge ve Ulloa, 2007). Nikotinik reseptörler sinapslarda aksiyon potansiyeline aracılık eden ligand kapılı iyon kanalı olarak bilinmesine rağmen çeşitli nöronal olmayan dokularda hücre kominikasyonları, hücre çoğalması, adhezyon, migrasyon, salgı, hücre sağkalımı ve apoptoz gibi hücre fonksiyonlarda önemlidir (Gotti ve Clementi, 2004).

Şimdiye kadar, dokuz farklı nikotinik reseptör tanımlanmıştır. Farklı nikotinik reseptör tipleri MSS, ganglionlar ve kaslar dahil olmak üzere çeşitli yapılarda eksprese edilir. Nikotinik reseptörler beş farklı alt birim tarafından oluşturulur: α , β , δ ve γ (fetal) veya ϵ (yetişkin) (Cooper ve ark., 1991). Bu alt birimlerin farklı kombinasyonları çeşitli nikotinik reseptörleri oluşturur. Kas ve gangliada eksprese edilen kolinerjik nikotinik reseptörler, iki α alt ünitesinden ve diğer üçünün herbirinden oluşur. Öte yandan, nöronal nikotinik reseptörler sadece iki tip alt birim ($\alpha 2$ -10 ve $\beta 2$ -4) kombinasyonu ile oluşur (Nai ve ark., 2003). Bu farklı alt birimleri birleştirerek çok sayıda farklı nikotinik reseptörler üretilebilir. Sonuç olarak, her nikotinik reseptör tipi farklı özelliklere ve işlevlere sahip olabilir (Fenster ve ark., 1997). MSS’deki en yaygın olarak ifade edilen nikotinik alt birim $\alpha 7$ ’dir (Séguéla ve ark., 1993). İlginç bir şekilde, bazı nAChR bileşimleri, örneğin homopentamerik $\alpha 7$

nAChR, sadece iyon kanalı fonksiyonlarına sahip olmakla kalmayıp, aynı zamanda metabotropik reseptör olarak fonksiyoneldir (De Jonge ve ark., 2005; Dasgupta, 2006).

4.2.2. Nikotinik reseptörlerin kromozomal lokalizasyonu

Memelilerde bulunan nikotinik kolinerjik reseptör alt birimlerinin farklı kromozomlardaki lokalizasyonu ve her bir alt üniteyi kodlayan genler Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

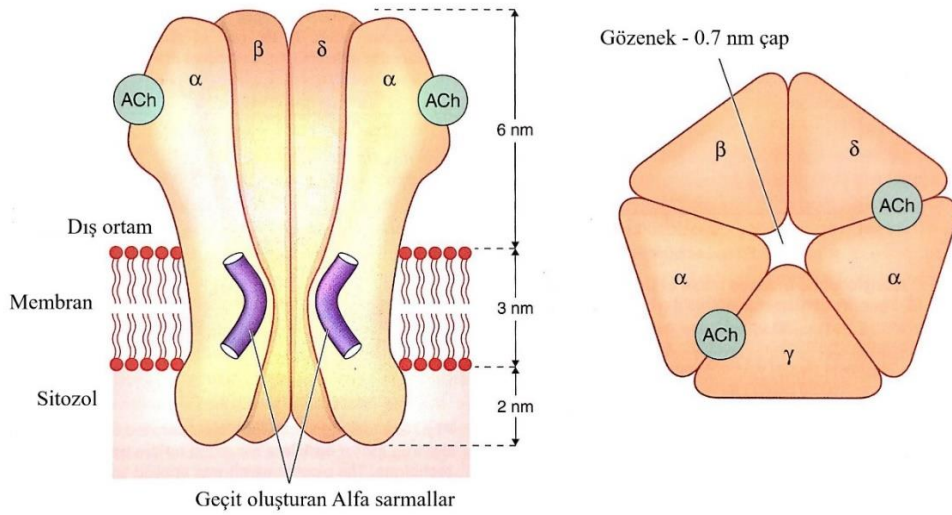
Alt birim	Gen	Kromozomal lokasyon
		İnsan
$\alpha 2$	<i>CHRNA2</i>	8p21
$\alpha 3$	<i>CHRNA3</i>	15q24
$\alpha 4$	<i>CHRNA4</i>	20q13.2-q13.3
$\alpha 5$	<i>CHRNA5</i>	15q24
$\alpha 6$	<i>CHRNA6</i>	8p11.21
$\alpha 7$	<i>CHRNA7</i>	15q14
$\alpha 9$	<i>CHRNA9</i>	4p14
$\alpha 10$	<i>CHRNA10</i>	11p15.5

Tablo 4.1. nAChR alt birimlerini kodlayan genlerin kromozomal lokalizasyonu.

(Maglott, 2011; Improgo ve ark., 2013).

4.2.3. Nikotinik reseptörlerin yapısal özellikleri

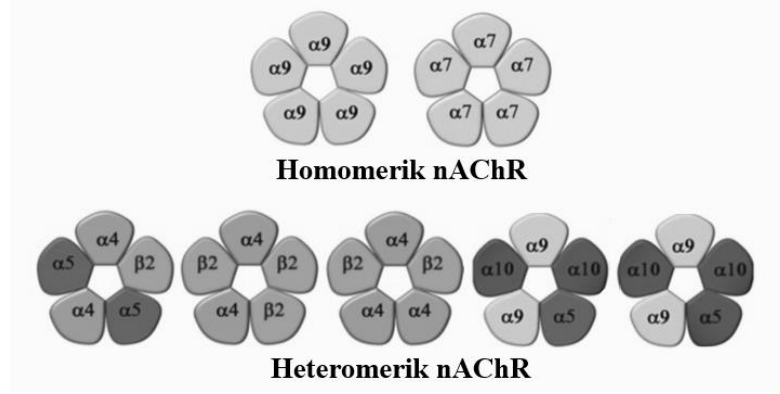
nAChR'ler, bir rozet gibi bağlanmış, molekül kütlesi ~ 290 kDa olan, farklı α ($\alpha 2$ -10), agonistik bağlanma bölgesi ve β ($\beta 2$ -4) alt birimler tarafından şekillendirilen, iyonik kanalı, ~ 8 nm çapında ve ~ 16 nm uzunluğunda olan bir silindirik pentamerik yapıya sahip integral zar proteinleridir (Russo ve ark., 2009; Russo ve Taly 2012) (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Nikotinik reseptörlerin genel yapısı (tipik ligand kapılı iyon kanalı), asetilkolinin bağlanma bölgesi.

Nikotinik asetilkolin reseptörünün yandan ve üstten görünüşüdür. Beş reseptör alt birimi ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) merkezi bir transmembran boşluğu çevreleyen bir küme oluşturur; bunların her biri alt birimin M_2 helikal segmenti tarafından oluşturulur. Bunlar, katyona seçici olan poru yapan bölgede negatif yüklü aminoasitlerin bir üstünlüğü vardır. Reseptörün hücre dışı kısmında İki asetilkolin bağlanma bölgeleri, alfa ve bitişik alt birimler arasındaki ara yüzeyde yer alır. Asetilkolin bağlandığında, bükülmüş alfa heliksleri ya düzleşir ya da yön değiştirir, böylece kanal açılır (Based on Unwin, 1993, 1995) .

nAChR'ler, hızlı iyonotropik katyonik nikotinik AChR'lerdir. Bu iyon kanalları, asetilkolin ve nikotin tarafından aktivasyona duyarlıdır ve aktivasyonları oldukça hızlıdır (Albuquerque ve ark., 2009). Reseptörler homo veya hetero pentamerler oluşturabilir ve bir merkezi iyon kanalı oluşturur. nAChR alt birimlerin bileşimi, nAChR'lerin (Albuquerque ve ark., 2009; Niu ve Lu 2014; Schuller 2009) fonksiyonunun düzenlenmesinde de bir role sahiptir (Dang ve ark., 2016). nAChR yapısı homopentamerik ve heteropentamerik olarak Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.

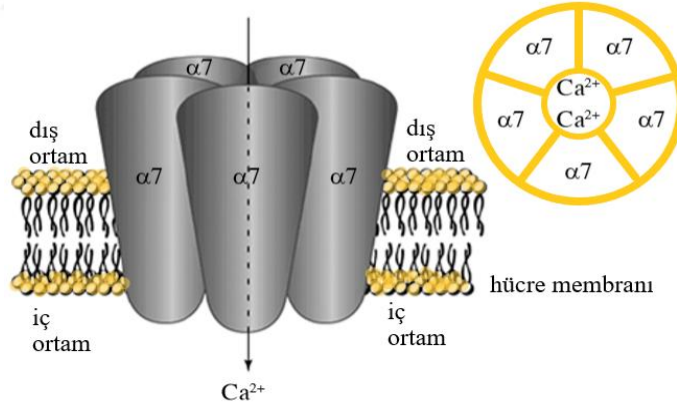


Şekil 4.3. nAChR yapısının homopentamerik ve heteropentamerik olarak gösterimi.

(motifolio.com)

Alfa 7 nikotinik reseptörü, 5 $\alpha 7$ alt biriminden ibarettir ve $\alpha 7$ homo oligomerik nAChR olarak adlandırılır. $\alpha 7$ nikotinik asetil kolin reseptörü şematik olarak Şekil 4.4.'te gösterilmiştir (Davis ve de Fiebre, 2006).

Beş $\alpha 7$ alt birimi bir $\alpha 7$ homo-oligomerik nAChR oluşturur



Şekil 4.4. Alfa 7 nikotinik asetil kolin reseptörünün şematik gösterimi.

(Davis ve de Fiebre, 2006)

4.3. Nikotinik Reseptörlerin Fizyolojik Fonksiyonları ve Dokularda Dağılımı

nAChR ilk olarak merkezi sinir sistemi nöronlarında önemli düzenleyiciler olarak tanımlanmıştır. nAChR'lerin beyindeki işlevlerine ek olarak elde edilen kanıtlar, bazı nöronal olmayan memeli hücrelerinde bir dizi farklı işlev

gerçekleştirdiğini gösterir. (Sharma ve Vijayaraghavan, 2002). Nöronal hücrelerde ise serebral korteks, hipotalamus, talamus, amigdala, hipokampal formasyon gibi bazı beyin dokularında bulunurlar.

nAChR alt birim bileşimi, nAChR'lerin (Albuquerque ve ark., 2009; Niu ve Lu 2014, Schuller, 2009) fonksiyonunun düzenlenmesinde de bir role sahiptir. Tüm nAChR'ler, Na^+ , Ca^{+2} ve K^+ gibi çeşitli katyonlara geçirgenlik gösterir; $\alpha 7$ nAChR, Ca^{+2} için en yüksek geçirgenliği gösterir. Kanal aktivitesinin yanı sıra, Ca^{+2} / calmodulin, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), protein kinaz C ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi bir dizi başka hücre içi olay ve çeşitli sinyal ileti yolu da nAChR'ler tarafından düzenlenebilir. (Trombino ve ark., 2004; Arredondo ve ark., 2006; Nakayama ve ark., 2002). Farklı nAChR alt tipleri ayrıca bakım, metabolik ton ve karsinogenez kontrolü gibi farklı fizyolojik işlemlerin kontrolünde rol oynar. nAChR genleri sadece nöronal sistemlerde değil, aynı zamanda cilt, pankreas ve akciğer gibi birçok nöronal olmayan doku hücrelerinde de eksprese edilir, bu da nAChR'lerin sinaptik iletime ek olarak diğer biyolojik işlemlerde rolleri olabileceğini düşündürür (Bierut, 2009).

Aslında, nAChR'lerin sadece nöromusküler kavşaklarda klasik işlevlerini yerine getirmediği, aynı zamanda hücre çoğalması (Bierut, 2009) ve hücre ölümü (Albuquerque ve ark., 2009; Schuller, 2009; Catassi ve ark., 2008) gibi hücrel işlemlerin düzenlenmesinde de işlev gördüğü bulunmuştur. Kanserdeki düşük sağkalım oranlarının, tümör hücresi proliferasyonunu, apoptozu (Alkondon ve ark., 2009; Schuller, 2009; Catassi ve ark., 2008), proinvazif ve anjiyogenik fenotipleri (Ng ve ark., 2007) ve epitel-mezenkimal geçişi (EMT) etkileyen nAChR yolu aktivasyonundan etkilendiğine inanılmaktadır. Bu durum nAChR'lerin insan kanseri türlerindeki rolüne dair mevcut kanıtları özetlemektedir (Dang ve ark., 2016).

4.4. Nikotinik Reseptörlerin Hücre Çoğalmasındaki Roller

nAChR agonisti nikotin, sigaranın temel aktif bileşenidir. Nikotin, çeşitli normal ve kanserli hücrelerin proliferasyonunu uyarabilir (Gotti ve Clementi, 2004; Schuller, 2007). Sigara dumanında bulunan bağımlılık yapıcı alkaloid olan nikotin, ACh'yi taklit ederek nAChR'nin α altbirimlerine bağlanır (Taly ve ark., 2009; Russo ve ark., 2012; Barik ve Wonnacott 2009). Nikotin bağlandıktan sonra, reseptör

konformasyonu değişir, iyon kanalının hücre içi kapısı açılır ve Ca^{+2} 'un hücre dışından (çevre), hücre sitoplazmasına akar (Taly ve ark., 2009; Cardinale ve ark., 2012; Barik ve Wonnacott 2009). İyon akışı, zar depolarizasyonunu, plazma zarının hücre içi tarafının negatif yükünü azaltarak indükler. Ardından gerilimle aktive olan Ca^{+2} kanallarının plazma zarının hücre içi kapısı açılır, böylece hücre ölümünü veya proliferasyonunu, epitelial mezenkimal geçiş (EMT), farklılaşmayı ve migrasyonu / istilayı etkileyen yolların doğrudan stimölasyonu da dahil olmak üzere farklı konağa bağlı tepkileri tetikleyen ek bir Ca^{+2} miktarı hücreye akar (Russo ve Taly 2012; Le Novère ve ark., 2002; Cardinale ve ark., 2012; Barik ve Wonnacott, 2009; Pillai ve Chellappan, 2012).

Birkaç küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC), küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC), pankreas kanseri ve kolon kanseri hücre hatlarının nikotin ile tedavisi, reseptöre bağlı bir şekilde proliferasyona neden olur (Gotti ve Clementi, 2004; Shin, 2004; Ye, 2004). Ek olarak, yapılan çalışmalar, bir nikotin ve hiperoksinin kombinasyonunun hamsterlerde akciğer tümörlerini indükleyebileceğini göstermiştir (Schuller, 1995). Bu bulgu, nAChR'lerin kronik stimölasyonunun, (genellikle sigara içenlerde bulunan) bozulmuş pulmoner oksijenasyonla birlikte, akciğer tümörlerini başlatabildiğini göstermektedir (Schuller, 1995). nAChR'lerin hücre çoğalmasındaki rolü, genelleştirilmiş nAChR antagonistlerinin (örneğin, heksamethonium ve mekamilamin) nikotinin proliferatif etkilerini tersine çevirme kabiliyeti ile pekiştirilir. Özellikle, $\alpha 7$ nAChR, nikotinin proliferatif etkilerine aracılık etmede rol oynamaktadır (şekil.4.4.1). NHBE, SCLC ve NSCLC hücrelerini içeren önceki çalışmalar, $\alpha 7$ nAChR antagonistlerinin bir bungarotoksin veya metilkakonitinin nikotinin proliferatif etkilerini azaltabildiğini göstermiştir (Dasgupta, 2006; Trombino, 2004; Heeschen, 2002). Bu bulgular, akciğer hücrelerinde $\alpha 7$ nAChR'ni hedef alan siRNA transfeksiyonu ile de doğrulanmıştır (Dasgupta, 2006).

Düşük nikotin konsantrasyonları, sinyal yollarını, hücre proliferasyonunu uyarırken, yüksek konsantrasyonlar sitotoksiktir (Villablanca, 1998). Hücre proliferasyonunu uyaran nikotin konsantrasyonları, sigara içenlerin ve oral tütün kullanıcılarının kan akışlarında bulunan konsantrasyonlara karşılık gelir. Bu bağlamda, nöronal olmayan epitelial ve endotelial hücrelerde de nAChR'lerin ifade

edilmesi ve hücre proliferasyonunun nikotin uyarımını antagonize eden nAChR antagonistleri tarafından inhibe edilmelidir (Cattaneo ve ark., 1993). Nikotin ve diğer nikotin metabolitlerinin nAChR'lere bağlanması, hücre çoğalmasını, hücre yaşamını artıran sinyal yollarını ve reaksiyonları uyarır. nAChR'ler yoluyla nikotin aracılı epidermal büyüme faktörünün (EGF) salgılanması, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) transaktivasyonuna, mitojenik ve antiapoptotik yolların aktivasyonuna neden olur (Schuller, 2007; Singh ve ark., 2011). Bu, proliferatif yolları aktive eden EGF ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) araşidonik asidin salınımını aktive eden çoklu onkojenik ve mitojenik sinyal kaskadlarının uyarılmasıyla sonuçlanır.

Ek olarak, nikotinin β -AR' lere bağlandığı bulunmuştur (Wong ve ark., 2007). Nikotin, malign fenotip edinimi için hayati adımlardan biri olan epitel mezenkimal geçişi (EMT) uyarır. Bu geçiş hücrenin kanser metastazlarını kolaylaştırabilen göç özellikleri kazanmasını sağlar (Dasgupta ve ark., 2009).

Homomerik $\alpha 7$ nAChR, nikotin aracılı hücre çoğalmasını kolaylaştıran birincil reseptör olarak belirtilmektedir, ancak diğer reseptör altbirimleri de katılabilmektedir (Schaal ve Chellappan, 2014). Nikotin, asetilkolinden daha yüksek afinite ile nAChR' lere bağlanır. (Schaal ve Chellappan, 2014; Sergei ve Grando, 2014; O'Leary ve ark., 2008). Çeşitli kanıtlar, nikotinin kanser gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Hücre kültürleri üzerine yapılan deneysel *in vitro* çalışmalar, kemirgenler üzerindeki *in vivo* çalışmalar ve epidemiyolojik çalışmalar da dahil olmak üzere insanlar üzerinde yapılan çalışmaların kanıtı, nikotinin kendisinin diğer tütün bileşenlerinden bağımsız olarak kanser gelişiminde birtakım etkileri uyardığını ortaya koymaktadır (Schaal ve Chellappan, 2014, Sergei ve Grando 2014). Nikotin kaynaklı hücre proliferasyonunun altında yatan sinyal yolları nikotinin, hem büyüme faktörlerinin (örneğin BDNF, VEGF, HGF, VEGF-C, TGF-b, PDGF ve TGF-a) hem de büyüme faktörü reseptörlerinin seviyelerini arttırarak hücre proliferasyonunu hızlandırdığı gösterilmiştir. (ör. VEGFR-2, PDGFR, HGFR ve EGFR) (Conti-Fine, 2000; Zeidler 2007). Nikotin, hücre içi Ca^{+2} ve L tip voltaj duyarlı Ca^{+2} kanallarında bir artış yoluyla EGFR'nün transaktivasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Hücre içi Ca^{+2} nın, EGFR' nin transaktivasyonuna neden olduğu mekanizmalar açıklığa

kavuşturulmaya devam etmektedir. Ca^{+2} da ki yükselmenin, daha sonra EGFR' yi fosforile eden sitoplazmik kinazların aktivasyonuna neden olması olasıdır. (Richard ve ark., 2008).

$\alpha 7$ nAChR, Ca^{+2} için oldukça seçicidir (Russo ve Taly 2012; Le Novère ve ark., 2002; Cardinale, 2012; Barik ve Wonnacott, 2009). Nikotin'e kronik maruz kalma nAChR ekspresyonunu artırır (Russo ve Taly, 2012; Le Novère ve ark., 2002; Cardinale ve ark., 2012; Barik ve Wonnacott, 2009; Govind ve ark., 2009). Homomerik ($\alpha 7$ veya $\alpha 9$) veya heteromerik ($\alpha 4\beta 2$) nAChR'ne bağlanan ACh veya nikotin, sitoplazmada iyon akışını (diğer bir deyişle Ca^{+2} akışı) sağlayan reseptör kapılarının açılmasına neden olur. Membran depolarizasyonunu indükleyen bu akış, voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarının kapılarının açılmasını ve böylece hücre içi Ca^{+2} seviyelerinde ilave bir artış olur. Hücre içine Ca^{+2} akışı sinyal iletim yollarını tetikler. Tipik olarak, sigara içen kişilerde $\alpha 7$ nAChR' nin fizyolojik fonksiyonları artar ve $\alpha 4\beta 2$ nAChR'nin fizyolojik fonksiyonları bozulmuştur (Cardinale ve ark., 2012; Schuller, 2012), çünkü nikotinik $\alpha 7$ reseptörünün, nikotin upregülasyonu $\alpha 4\beta 2$ miktarını azaltır. Kanseri hücrelerinde $\alpha 7$ nAChR, stimülasyon yanıtlarını düzenlerken, $\alpha 4\beta 2$ inhibe edici cevaplarla ilgilidir. Farklı çalışmalar, nAChR'nin kanser tetiklenmesindeki ve ilerlemesindeki rolünü bildirmektedir. (Russo ve ark., 2012; Paleari ve ark., 2009; Cardinale ve ark., 2012; Pillai ve Chellappan, 2012; Schuller, 2012; Schuller ve Orloff, 1998; Schuller, 2009; Eggleton ve ark., 2008; Song ve Spindel, 2008; Russo, 2012). Nöronal olmayan hücrelerde nAChR'lerinin dağılımları ve fonksiyonları Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Reseptör Tipi	Kanser Tipi	Fonksiyon	İlgili Sinyal Yolu
$\alpha 7$	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	Hücre Çoğalması	MAPK aktivasyonu PPI3-kinaz / AKT yolu ve Janus-aktifleştirilmiş kinaz / STAT sinyali.
$\alpha 7$	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	Hücre Çoğalması	β -arrestin-SRC ve / veya EGFR-Ras aktivasyonu, Rb'nin etkisizleşmesine ve E2F1 ile regüle edilmiş proliferatif genlerin ortaya çıkmasına neden olur
$\alpha 7$	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	Hücre Çoğalması	Serotonin & Bombesin-PKC ERK-COX2-CREB
$\alpha 7$	Mide kanseri Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	Hücre Çoğalması	β -COX-2 / PGE (2) adrenoreseptörleri aktivasyonu
$\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7$	Pankreas Duktal Adenokarsinomu	Hücre Çoğalması	Adrenalin / Noradrenalin CREB, ERK, Src ve AKT fosforilasyonu
$\alpha 7$	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Kolon Kanseri	Hücre Çoğalması	İndirgeme-SLURP-1
$\alpha 7$	Mide Kanseri	Hücre Çoğalması	E-cadherin aşağı regülasyonu ve ZEB-1 ve salyangoz yukarı regülasyonu
$\alpha 7$	Akciğer Zarı Kanseri	Hücre Çoğalması	MAPK aktivasyonu
$\alpha 7$	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Meme Kanseri	İnhibisyon ilaca bağlı apoptoz	Yukarı düzenleme Survivin, XIAP, BclxL, Bax ve Bcl-2 fosforilasyonu ve NFkB
$\alpha 7$	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Meme Kanseri	Epitelyal Mezenşimal geçiş	μ ve m-kalpain fosforilasyonu, β katenin ve E-cadherin aşağı regülasyonu, fibronektin ve vimentin regülasyonu
$\alpha 9$	Meme Kanseri	Hücre Çoğalması	Düzenleme Cyclin-D3 gen ifadesi. Endojen E2 / eksojen nikotine ER ile indüklenen $\alpha 9$ yukarı regülasyon cevabı

Tablo 4.2. Farklı kanser tiplerinde nikotinik reseptörler ve etki mekanizmaları.

Farklı kanser hücrelerinde nAChR' ın neden olduğu fonksiyonlar ve ilgili yolağı özetlemektedir. (Russo ve ark., 2014)

4.5. Nikotinik Reseptörler ve Kanser

Nikotin ve metabolitleri merkezi ve periferik sinir sistemlerinde yaygın olarak eksprese edilen nikotinik ACh reseptörlerine (nAChR' ler) bağlanan ve ligand kapılı katyon kanallarının bir ailesi olan yüksek derecede lipofilik bileşiklerdir (Zoli, 2015). Başlangıçta nAChR' lerin sadece sinir sisteminde mevcut olduğuna inanılıyordu, ancak birçok hücre tipinde eksprese oldukları gösterilmiştir. Özellikle, ACh'yi sentezleyen, depolayan, işleyen ve salgılayan hava yolu epitel hücreleri bulunmaktadır (Wessler ve Kirkpatrick, 2008; Spindel, 2016). Birçok akciğer kanseri, otokrin büyüme faktörü olarak akciğer kanseri hücrelerinde nAChR ve mACh reseptörleriyle etkileşime giren ACh' ni sentezlemektedir (Song ve ark., 2003; 2008). Kanser

büyümesi ve gelişimi bu nedenle hem endojen ACh hem de nAChR' lerin eksojen (nikotin) ligandları tarafından uyarılabilir. (Mucchietto ve ark., 2017)

Nikotinin, opioidler, UV radyasyonu, Ca^{+2} iyonoforlar, nörotoksinler, oksidatif stres ve antikanser ilaçları gibi hücre dışı stres uyaranlarından kaynaklanan apoptozise karşı direnç gösterdiği gösterilmiştir. Nikotinin, küçük hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, meme kanseri, ağız kanseri ve baş-boyun kanseri hücrelerini antikanser ilaçlar tarafından indüklenen apoptozise karşı koruduğu gösterilmiştir (Dasgupta, 2006; Xu, 2007; Zeidler, 2007)

Nikotin, nAChR' lerin α alt birimine bağlanarak bir agonist olarak asetilkolini taklit eder (Lindstrom, 1996). Nikotin, heteromerik $\alpha 4\beta 2$ nAChR' lere $\alpha 7$ -nAChR' lere göre daha yüksek afinite ile bağlanır (Gotti ve ark., 1997). $\alpha 4\beta 2$ nAChR' lere daha yüksek bağlanma, reseptörün duyarsızlaştırılmasıyla sonuçlanır; bu, $\alpha 7$ nAChR' nin *in vivo* olarak kanser gelişimi ve ilerlemesinin ana uyarıcısı olmasının nedeni olabilir. Nikotine ek olarak, 4- (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-bütanon (NNK) gibi tütün-spesifik nitrozaminler de $\alpha 7$ -nAChR' ye bağlanabilir ve N nitrosonornikotin (NNN) heteromerik α nAChR' lere bağlanır. (Schuller ve Orloff, 1998). NNK' nin $\alpha 7$ nAChR' ye olan afinitesi nikotinden 1,300 kat daha fazla iken, NNN' nin heteromerik $\alpha\beta$ -nAChR' ler için afinitesi nikotinkinden 5.000 kat daha yüksektir (Schuller ve Orloff, 1998; Arredondo ve ark., 2006). Memeli hücrelerinde nAChR' lerin her yerde bulunması keşfinden beri, laboratuvar çalışmaları nAChR' leri tümör büyümesi ve anjiyogenez dahil çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirmiştir (Maneckjee ve Minna, 1990; Heesch ve ark., 2001). Nikotin kanserojen metabolitlerinin, akciğer kanseri hücrelerinde Raf-1 / MAPK / c-myc yolağının serotonin ile uyarılmış sinyal yoluyla hücre çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir (Schuller ve Orloff, 1998). İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) dokuları ve kanser hücrelerinin $\alpha 7$ nAChR (Paleari ve ark., 2008) ifade ettiği gösterilmiştir. Nikotin, $\alpha 7$ nAChR' ye bağlanarak Ca^{+2} ' nin akciğer kanseri hücrelerine akmasına neden olabilir ve akabinde voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarını aktive ederek B-hücreli lenfoma-2 proteininin ekspresyonunun artmasına neden olarak apoptozun regülasyonu ile sonuçlanabilecek MAPK yolunu aktive eden membran depolarizasyonunu tetikler (Heusch ve Maneckjee, 1998). Daha sonra MAPK yolu, transkripsiyon faktörü nükleer faktör- κB 'yi (NF- κB) aktive eder ve kanser hücresi

çoğalmasını teşvik eder. $\alpha 7$ nAChR' nin ifadesi ayrıca Rb-Raf-1 / fosfo hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz (ERK) / fosfo-p90RSK yolunun aktivasyonu ile de ilişkilidir (Dang ve ark., 2016).

Nikotin, Ca^{+2} akışına neden olan ve protein kinaz C, Raf-1, ERK 1/2 ve c- Myc gibi sinyal yollarını aktive eden $\alpha 7$ nAChR' lerin ekspresyonunun artışı indüklemektedir. $\alpha 7$ nAChR' lerin ekspresyonunun artışı hücre çoğalması, kanser hücresi göçü, metastaz veya apoptozun inhibisyonunu artırır (Lee ve ark., 2011). $\alpha 7$ nAChR' nin aktivasyonu, voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarını aktive ederek Ca^{+2} hücre içine akışına ve ardından MAPK yolunu aktivasyonuna neden olabilir. Daha sonra, MAPK, transkripsiyon faktörü NF- κ B' yi aktive ederek kanser hücresi çoğalmasını tetiklemektedir (Trombino ve ark., 2004).

Nikotinin tüm etkileri $\alpha 7$ nAChR' nin aktivasyonu, ardından AKT ve MAPK sinyal yollarının aktivasyonu ile oluşur (Schaal ve ark., 2015). Sinir sisteminde olduğu gibi, nAChR' lerin normal pankreas duktal hücrelerinde ve pankreas kanseri hücrelerinde katekolaminlerin sentezini ve salımını düzenlemede rolleri vardır. Nikotinin, $\alpha 3$, $\alpha 5$ ve $\alpha 7$ nAChR alt birimlerine (Al-Wadei ve ark., 2012; 2012; 2009) bağlı olan katekolamin sekresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Ek çalışmalar ayrıca, pankreas kanseri hücrelerinde nikotinin, iyi bilinen bir proliferasyon ve hayatta kalma ile ilgili sinyalleşme yolu olan ERK1 / 2'yi aktive ettiği bulunmuştur (Hermann ve ark., 2014; Bose, 2005; Chowdhury ve Walker, 2008). Nikotin ayrıca normal pankreas hücrelerinde ve kanser hücrelerinde γ -aminobütirik asit (GABA) sentezini ve sekresyonunu zamana bağlı bir şekilde inhibe eder. GABA, $\alpha 4$ nAChR alt birimi (Al-Wadei ve ark., 2012; Al-Wadei ve ark., 2009; Schuller ve ark., 2008) ile *in vivo* ve *in vitro* pankreas tümör büyümesini inhibe edebilir. Proliferatif etkilerine ek olarak, nikotin, CD18 / HPAF pankreas kanseri hücre hattında musin MUC4'ü yeniden düzenleyerek pankreas kanseri hücrelerinin göçünü ve yayılmasını teşvik eder (Momi ve ark., 2013). Osteopontin (OPN) sentezi ve salgılanmasının uyarılması yoluyla nikotin, pankreas kanseri hücre hatlarında hücre çoğalmasını ve metastazı da destekleyebilir. Ayrıca, pankreas kanseri hücrelerinin nikotin kaynaklı göç, istila ve metastazının, matris metaloproteinaz-9 ve VEGF'nin indüklenmesi yoluyla OPN'ye bağlı olduğu da bulunmuştur (Lazar ve ark., 2010).

Gastrik kanserde, nikotin ve nikotin türevli nitrosamin ketonun (NNK), $\alpha 7$ nAChR ve beta adrenerjik reseptörler aracılığıyla AGS mide kanseri hücre çoğalmasını önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur. Nikotin, Erk 1 / 2 aktivasyonuna bağlı olan hücre çoğalmasını teşvik ederken, NNK kaynaklı hücre büyümesi, p38 MAPK'ya bağlıdır. Ek olarak, nikotin ve NNK, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerini modüle etmek için siklooksijenaz-2 indüksiyonuna aracılık eder ve kanser gelişimine katkıda bulunur. Seçici bir siklooksijenaz-2 inhibitörü olan SC-236'nın nikotin / NNK ile indüklenen hücre proliferasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir (Shin ve ark., 2008; Zdanowski ve ark., 2015). AGS mide kanseri hücre hattı üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışma, $\alpha 7$ nAChR siRNA tarafından kapatıldığında, hücrelerin 5 - fluoürasil tedavisine daha dirençli olduğunu bildirmiştir (Chen ve ark., 2015).

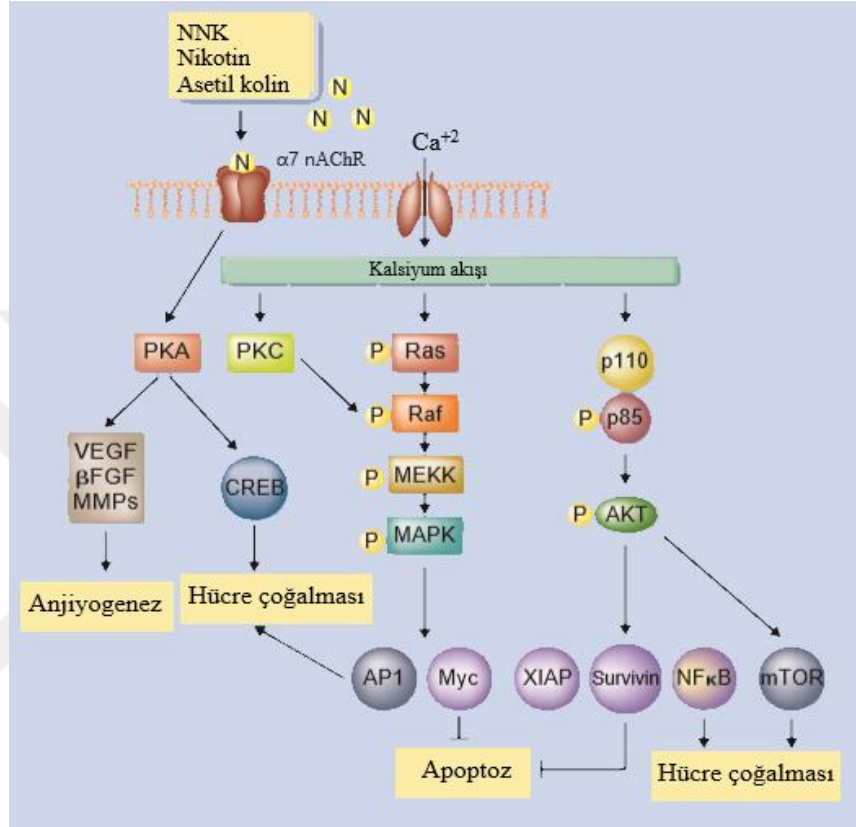
ACh reseptörleri ayrıca insan mezotelyoma ve normal mezotel hücrelerinde eksprese edilir. Nikotin uyarımı, nikotinik kolinerjik reseptörlerin aktivasyonu ile hücre büyümesini sağlar. İnsan meme epitel hücrelerinde, malign olmayan MCF10A ve malign MCF7 meme hücrelerinin, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 1$, $\beta 2$, γ , δ ve ϵ nAChR alt birimlerini ve M₁, M₃, M₄ ve M₅'i eksprese ettiği gösterilmiştir. Bazal epitel hücrelerinin kötü huylu transformasyonu, $\alpha 7$ ve $\alpha 9$ yapımı nAChR'lerin aşırı ekspresyonu ile de ilişkilendirildi. NNK, ERK 1/2 fosforilasyonunu, tümör promotörü hepatosit büyüme faktörünü kodlayan genin ekspresyonunu uyarmıştır, tümör baskılayıcı gen CDKN2A geninin ekspresyonunda azalmaya ve MCF10A hücrelerini tümörijenik transformasyona indüklenmiştir (Kalantari-Dehaghi, 2015). nAChR alt birimlerini ifade eden kanser hücresi tipleri Tablo 4.3.' de gösterilmiştir.

nAChR alt birimlerini ifade eden kanser hücresi tipleri.		
Kanser tipi	nACh altbirimleri	Referanslar
Rahim ağzı kanseri	$\alpha 5, \alpha 7, \alpha 9$	Calleja-Macias et al., 2009
Kolon kanseri	$\alpha 7$	Ye et al., 2004
Lösemi	$\alpha 2, \alpha 3, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha 9, \beta 2, \beta 4$	Sato et al., 1999; Chernyavsky et al., 2009
Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	$\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha 9, \beta 2, \beta 4$	West et al., 2003; Tsurutani et al., 2005; Lam et al., 2007; Improgo et al., 2010
Küçük hücreli akciğer kanseri	$\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 9, \beta 2, \beta 4$	Codignola et al., 1994; Song et al., 2003; Improgo et al., 2010
Mezotelyoma	$\alpha 7$	Trombino et al., 2004
Medulloblastomu	$\alpha 7$	Siegel and Lukas, 1988
Neuroblastoma	$\alpha 3, \beta 4$	Lukas, 1993

Tablo 4.3. nAChR alt birimlerini ifade eden kanser hücresi tipleri
(Improgo ve ark., 2013).

Genel olarak, nikotin, MAP Kinaz, PI3kinase / Akt, NF- κ B yolları gibi nAChR ile bağlantılı sinyal iletimi yoluyla hücre çoğalmasını, anjiyogenez, hücre göçü ve apoptozu indüklemiştir (Heeschen ve ark., 2001; 2002; 2003; Cooke ve Bitterman 2004; Avogaro ve Fadini 2006; Cooke, 2007; Adamopoulos ve ark., 2008; Chu ve ark., 2005). Yukarıdaki sinyal iletimi sayesinde, nöronal olmayan dokularda nikotinin, β FGF, TGF α , VEGF, PDGF (Conklin ve ark., 2002) gibi büyüme faktörlerinin salgılanmasına ve proteinlerin (Xu ve Deng 2006), COX-2 ailesinin yükselişine neden olduğu bulunmuştur (Shin ve ark., 2005). En ilgi çekici şekilde, hem VEGF ve hem de FGF'nin neden olduğu insan mikrovasküler endotel hücresi (HMVEC) göçünü ve anjiyogenezini nAChR aktivasyonunu gerektirir (Ng, ve ark., 2007). Mekanik olarak, nikotinin, endotel hücrelerinin sağkalım, proliferasyon ve anjiyogenezini destekleyen MAP kinazı ve PI3K / AKT sinyal yollarının aktivasyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Diğer çalışmalar, nikotinin hücre siklusu

ilerlemesi, apoptoz ve farklılaşma üzerindeki etkisini göstermiştir (Cunningham ve ark., 1985) . Akciğer kanseri ve nöronal hücrelerde $\alpha 7$ nikotinik reseptörler aracılı sinyal iletimi Şekil.4.5.' de gösterilmiştir.



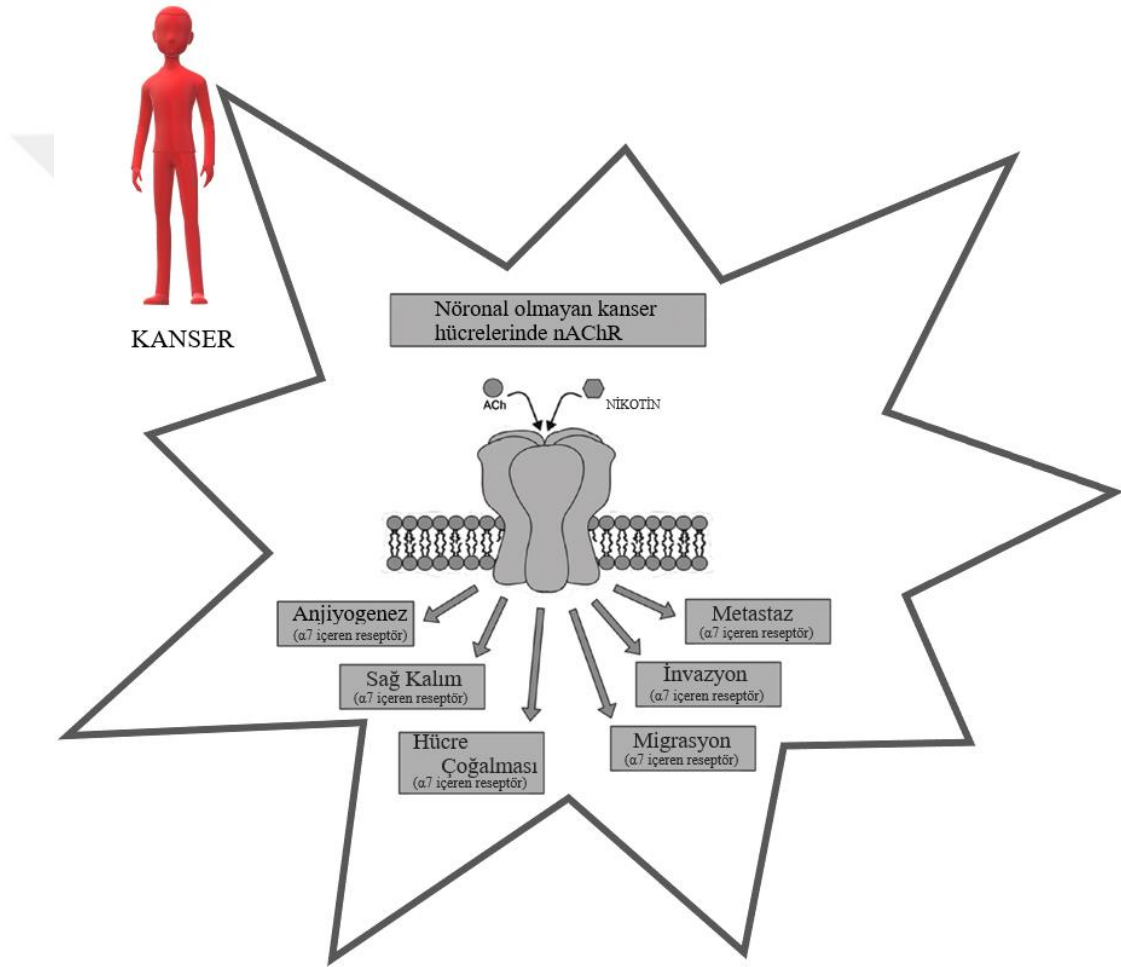
Şekil 4.5. Nikotinik Alfa 7 reseptör sinyal yolları

(CCR Molecular Pathways © 2011 American Association for Cancer Research).

Akciğer kanseri hücrelerinde ve nöronal hücrelerde, $\alpha 7$ ve hetero pentamerik nAChR'lerinin sinyal yolları , Ca^{+2} bağımlı PKA , PKC, PI3K / Akt ve MAPK' nın aktivasyonu aracılığıyla NF-kB, AP1, CREB ve mTOR transkripsiyon faktörlerinin indüklenmesi yoluyla proliferasyon ve anjiyogenezi teşvik eder (Wu ve ark., 2011).

Ek olarak, büyük hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom, küçük hava yolunun adenokarsinoması ve alveoler tip II hücrelerinin yanı sıra ölümsüzleştirilmiş büyük ve küçük hava yolu epitel hücrelerinin tümü, nikotin ve NNK'yi aktive ettiği sonucuna varmıştır. Proliferasyonun uyarılması ve kemoterapinin neden olduğu apoptozun inhibisyonu ile sonuçlanır (West ve ark., 2003; Tsurutani ve ark., 2005). Son zamanlarda yapılan bir çalışma, AKT sağkalım sinyallerinin, insan meme kanseri

hücrelerinde nikotin aracılı kanserojen süreçte önemli bir rol oynadığını da göstermiştir (Shih ve ark., 2010). Ek olarak, arrest-arrestin-1 ve Src kinaz, nikotinin mitojenik etkilerine aracılık etmede kilit oyuncular olarak görünmektedir. Src protein tirozin kinaz ailesinin, hücre proliferasyonu, hayatta kalma, metastaz ve anjiyogenezi düzenleyen çok sayıda reseptörlü sinyalleme yolunun kritik bir bileşeni olduğu bulunmuştur. Nöronal olmayan kanser hücrelerinde nAChR' nin etkileri Şekil 4.6' de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Nöronal olmayan kanser hücrelerinde nAChR' nin etkileri

(Zoli ve ark., 2018)

Ek olarak, nikotin aynı zamanda, COX-2 ve VEGFR düzenlemesi yoluyla plazminojen aktivatörlerinin (ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü ve reseptörü) ekspresyonunun yanı sıra matris metaloproteinazları 2 ve 9'u indükleyerek kanser hücre istilasını da teşvik eder (Shin ve ark., 2005).

4.6. Nikotinik Agonist ve Antagonistler

Nikotin ve NNK [4- (metilnitrosamino) -l- (3-piridil) -l-butanon] dahil, sigara dumanı bileşenleri, nAChR' lerinin agonistleridir. Nikotinin, hücreleri antikanser ilaçların neden olduğu apoptozdan koruduğu gösterilmiştir. İlaç direncinin kazanılması, kanser terapisinde önemli bir zorluktur ve nAChR antagonistleri, kemoterapiye verilen terapötik cevabı arttırmak için belirlenmiş kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon halinde potansiyel olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, nAChR antagonistlerinin biyoaktivitesi henüz hayvan modellerinde test edilmemiştir. nAChR antagonistlerinin yüksek düzeyde nikotinik reseptörler ifade eden beyin, merkezi sinir sistemi, bağışıklık hücreleri ve kas hücreleri üzerindeki potansiyel yan etkilerini araştırmak için dikkatlice tasarlanmış hayvan çalışmaları gereklidir. (Egletton ve ark., 2008)

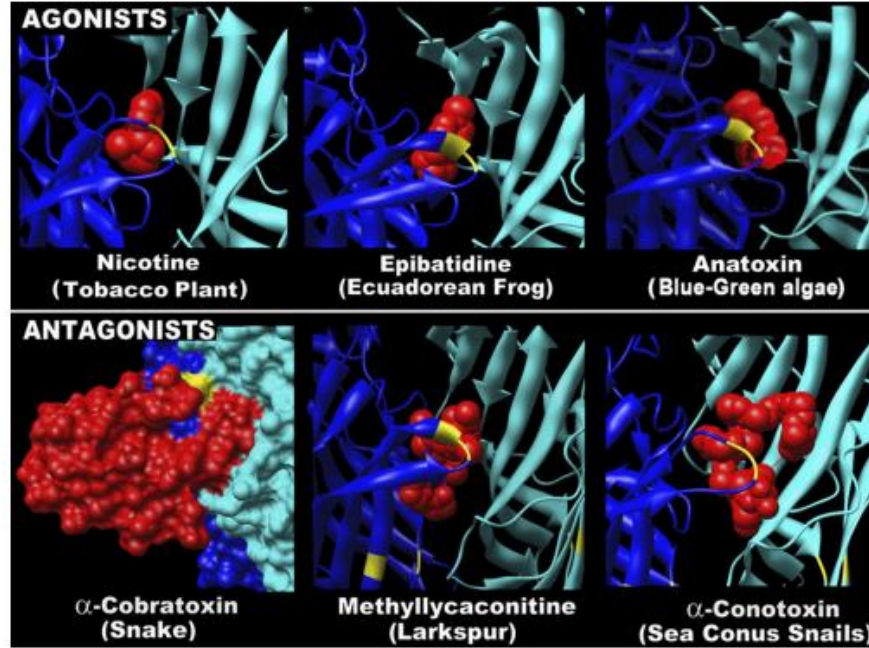
Nörotoksinler, nöronal nAChR reseptör alt ünite kombinasyonlarını ayırt etmek için yaygın olarak kullanılır (Luetje ve ark., 1990; Decker ve ark., 1995). Son çalışmalar, nAChR antagonistlerinin antikanser ilaçları için kullanılabileceğini ima etti. $\alpha 7$ nAChR'ler sigara içicilerdeki küçük hücreli akciğer karsinomlarında aşırı eksprese edilirken (Sciamanna ve ark., 1997), *in vitro* deneyler, malign büyümenin yılan nörotoksinleri (α -nörotoksinler) veya salyangoz konotoksinleri (α -konotoksinler) kullanılarak bırakılabileceğini göstermiştir ve bunlar nAChR'lerin izolasyonu ve biyokimyasal karakterizasyonu için kullanılır, çünkü bunlar nAChR'nin rekabetçi antagonistleridir (Sandall ve ark., 2003). Metilkakonitin (MLA) ve α -bungarotoksin gibi $\alpha 7$ nAChR inhibitörlerinin varlığının kanser gelişim sürecinde nikotinin proanjyogenik etkilerini tersine çevirdiği bulunmuştur (Heeschen ve ark., 2001; 2002; 2003; Dasgupta ve Chellappan, 2006). Russo ve arkadaşları, birkaç doğal bileşiğin, $\alpha 7$ nAChR ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla NSCLC hücre proliferasyonunu veya tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini gösterdi. Bu veriler, A549-lusiferaz hücreleri ile aşılınmış farelerde tümör büyümesinde önemli bir azalma olduğunu belirlenmiştir. Spesifik $\alpha 7$ nAChR antagonistleri, hem apoptoz proteininin

indüklenmesinden (kaspazlar 3, 9, 2, P53 ve Bad'ı aktive eder) hem de *in vitro* ve *in vivo* deneylerde PI3K, Akt, MAPK ve NF- κ B yollarını aktive eden hayatta kalma sinyalinin azalmasına neden olabilir. Bu veriler $\alpha 7$ nAChR hedefli kimyasalların antikanser ilaç gelişiminde ümit verici bir potansiyel oluşturduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, hem α -bungarotoksin hem de MLA'nın aynı zamanda $\alpha 9$ nAChR'ye yüksek oranda bağlandığı da bilinmektedir. Bu nedenle, proanjiyogenik olarak nikotinik etkilerine $\alpha 9$ nAChR'nin kısmi katılımı olabilir (McIntosh ve ark., 1999; Arias ve Blanton, 2000). Son zamanlarda, birkaç deneysel gözlem ile $\alpha 9$ nAChR'nin ağrıya katılımı öne sürülmüştür ve nAChR agonistlerinin uygulanması ağrı ile ilgili davranışları azaltmaktadır (Damaj ve ark., 1999; Wang, 2005). $\alpha 9$ nAChR alt tipinin virüs aracılı aşırı ekspresyonu spesifik olarak meme kanseri tümörlerinde bulundu (Lee ve ark., 2010). Rekabetçi nAChR inhibitörleri kullanmak yerine, doğal bileşiklerin kanser hücresi çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Örneğin, yenilebilir meyve olan *Garcinia indicada* bulunan garcinol'un $1\mu\text{M}$ çok düşük konsantrasyonu, $\alpha 9$ -nAChR ve siklin D3 ekspresyonunu azaltarak nikotinle indüklenen meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Q Chen ve ark., 2010). Luteolin ve Quersetin gibi diğer doğal bileşikler, insan meme kanseri hücrelerinde hücre yüzeyi $\alpha 9$ nAChR ekspresyonunun azalmasına neden oldu. Luteolin ve kuersetin ile hücrelerin bir arada verilmesi sinerjik olarak AKT aktivasyonunun inhibe edilmesi yoluyla insan meme kanseri hücre proliferasyonunu da inhibe ettiği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada, , sigara aracılı meme tümörü oluşumunu sağladığı bilinen östrojen veya nikotin ile indüklenen $\alpha 9$ nAChR protein ekspresyonunun epigallocatechin gallate (EGCG) ile bloke edildiği bulundu (Tu ve ark., 2011). Bu bulgular ile EGCG'nin olası kemopreventif bir yeteneğini ortaya koydu (Lee ve ark., 2011). Nikotinik reseptörlerin bazı antagonistleri Tablo 4.4'de, nikotinik reseptörlere agonist ve antagonist bağlanma bölgeleri Şekil.4.7.' de gösterilmiştir.

Antagonist	Reseptör
Dihydro- β -erythroidine (DH β E)	$\alpha 4\beta 2$
Erysodine	$\alpha 4\beta 2$
α -Conotoxin-MII	$\alpha 3\beta 2$
<i>n</i> -Bgtx	$\alpha 3\beta 2$
α -Bgtx	$\alpha 7\alpha 9$
Mecamylamine (TRIDMAC, Inversine)	$\alpha 3\beta 4$
MLA	$\alpha 7$
It14a α -RglA Vc1.1 (ACV1) Garcinol Quercetin	$\alpha 9$

Tablo 4.4. Nikotinik reseptörlerin bazı antagonistleri

(Wu ve ark., 2011).



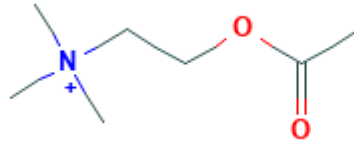
Şekil 4.7. Nikotinik reseptörlere agonist ve antagonist bağlanma bölgeleri.

(Albuquerque ve ark. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. Physiol Rev 89: 73-120)

4.6.1. Asetilkolin

Asetilkolin (ACh) ilk nörotransmitterlerdendir ve otonom sinir sistemindeki (OSS) organik bir moleküldür. İnsanlarda bu çok yönlü molekül ve sentezleyen enzim olan kolin asetiltransferaz, epitel, endotelyum, mezotelyum kas, kan hücreleri ve bağışıklık hücreleri gibi çeşitli nöral dokularda bulunmuştur. Son birkaç yılda saptanan nöronal olmayan asetilkolin sisteminin kanıtlarının artması, bu nörotransmitterin başlıca hücrel sinyalleme moleküllerinden (örneğin kinazlar ve transkripsiyon faktörleri aktivitesi ile ilişkili) biri olduğunu göstermiştir. Bu sistem, proliferasyon, farklılaşma, adhezyon, migrasyon, hücreler arası etkileşim ve apoptoz gibi hücrel fonksiyonların idame ve optimizasyonundan sorumludur. Ayrıca, bağışıklık hücrelerinin aktivitesini, farklılaşma, antijen sunumu veya sitokin üretimini (hem pro-hem de anti-enflamatuar) kontrol eder (Zdanowski ve ark., 2015).

Günümüzde, ACh'nin kanser hücreleri için bir “otokrin ve / veya parakrin büyüme faktörü” olarak davrandığı açıktır. Bu hücrelerde nAChR ve / veya mAChR'nin ekspresyonu, çoğu "normal" insan endotelial ve epitelial dokularında bulunan nöronal olmayan kolinerjik otokrin ve parakrin sinyalleme döngüsünün devam eden bir ifadesi olarak düşünülebilir. (Russo ve ark., 2014). ACh' nin kimyasal yapısı Şekil 4.8.' de gösterilmiştir.



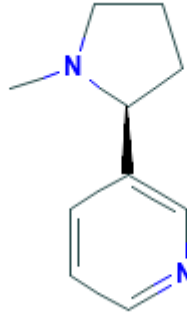
Şekil 4.8. Asetilkolinin Kimyasal Yapısı.

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetylcholine#section=Top>)

Bununla birlikte, daha yeni çalışmalar, çok sayıda nöronal olmayan hücre ve bunlardan türetilen kanserlerin kendi asetilkolinlerini (Wessler 2008) sentezleyip salgıladıklarını ve asetilkolinin kendiliğinden uyarılmasına veya eksojen nAChR' agonistlerine maruz kalmaya tepki olarak Norepinefrin ve Epinefrini sentezleyebildiklerini ve salıverdiklerini göstermiştir. (Shin ve ark., 2007; Wong ve ark., 2007; Al-Wadei ve ark., 2010; . Al-Wadei ve ark., 2012, Al-Wadei ve ark., 2012)

4.6.2. Nikotin

Nikotin ilk önce Alman doktorlar Wilhelm Heinrich Posselt ve Karl Ludwig Reimann tarafından tütünden elde edildi. Nikotin, güçlü bir alkaloid, saf haliyle, karakteristik kokusu olan berrak bir sıvıdır. Havaya maruz kaldığında kahverengiye döner. Suda çözünür ve tercihen organik çözücülerden ayrılır. Piridin ve pirolidin halkalarından oluşan bir amindir. Nikotin bir dibazik bileşiktir ve insan vücudundaki kullanılabilirliği ve emilimi çözeltinin pH'ına bağlıdır. (Schievelbein ve ark., 1973). Bir çözeltinin pH'ındaki artış, yüklenmemiş lipofilik nikotin konsantrasyonlarında bir artışa neden olur, bu formda aktif olarak tüm biyolojik zarlardan geçebilir (Schievelbein ve ark., 1973). Sulu kireç ve kateşinin tütün içine eklenmesi, ağız boşluğundan nikotin emilimini artırır. Nikotin bir kez alındığında, karaciğer tarafından emilir ve metabolize edilir. Metabolik süreç iki fazda sınıflandırılabilir. Faz I'de nikotinin çoklu yollar yoluyla mikrozomal oksidasyonu vardır (Armitage ve ark., 1970). Bu, kotinin ve nornikotin, demetil kotinin, trans-3-hidroksi-kotinin ve d-(3-piridil) -g-metilaminobütirik asit gibi çeşitli metabolitlerin oluşumuna yol açar (Sobkowiak ve Lesicki, 2013; Dempsey ve ark., 2004). Nikotinin in vivo nitrozasyonunun, N-nitrosonornikotin (NNN) ve 4 (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-bütanon (NNK) oluşumuna yol açabileceğine dair kanıtlar vardır (Stepanov ve ark., 2009). Tütün kullanımı, bilinen kanserojenlere maruz kalmaya ve kanserden ölüme neden olan en yaygın faktördür ve bu nedenle kanser indüksiyon mekanizmalarını anlamak için bir modeldir. Aktif sigara içimi ve kardiyovasküler hastalıklar, solunum hastalıkları, üreme bozuklukları ve akciğer kanserleri, mesane, serviks, yemek borusu, böbrek, gırtlak, ağız, pankreas, mide ve lösemi gibi çeşitli kanser türleri arasında nedensel bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Schuller, 2009). Şekil 4.9.' de nikotinin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Nikotin kimyasal yapısı.

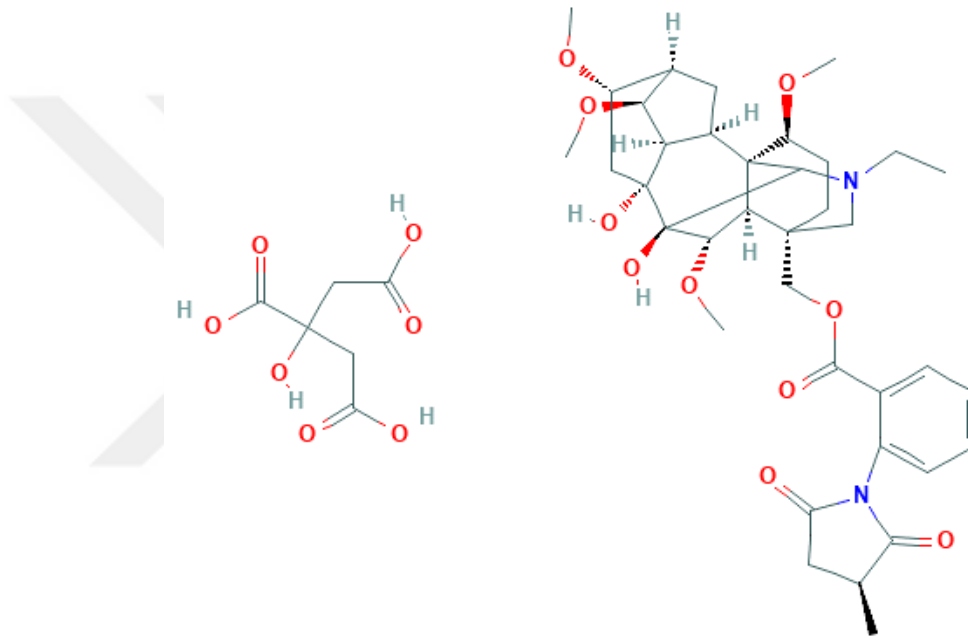
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89594#section=Top>)

4.6.3. MLA

Metililakonitin (MLA) olumsuz fizyolojik etkileri, nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR'ler) ile ilgili rekabetçi antagonizmine bağlanmıştır (Welch ve ark., 2013).

MLA ve α -bungarotoksin gibi $\alpha 7$ nAChR inhibitörlerinin varlığının, kanser geliştirme sürecinde nikotin proanjijojenik etkilerini tersine çevirdiği bulunmuştur (Heeschen ve ark., 2003; Heeschen ve ark., 2002; Dasgupta ve Chellappan, 2006). Russo ve arkadaşları, birkaç doğal bileşiğin, $\alpha 7$ -nAChR ekspresyonunun inhibisyonu ile NSCLC hücre proliferasyonu veya tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. T lenfositlerde, doğrudan nikotin kaynaklı kalsiyum geçici gösterimi bulunmamasına rağmen, nikotine uzun süre maruz kalmanın T hücreli reseptör aktivasyonu ile görülen kalsiyum artışlarını azalttığı görülmüştür (Singh ve ark. 2000). nikotin uygulamasına oligodendrosit öncü hücreleri (O2A / OPC'ler) $[Ca^{+2}]$ 'da artış ile yanıt verir. Bu hücrelerin bir alt grubunda, nikotin nispeten uzun ömürlü olan ve devam eden nikotin varlığında ortaya çıkan kalsiyum salınımlarını da başlatmıştır (Rogers ve ark., 2001). Hem AMPA hem de yüksek potasyum, bu hücrelerde yalnızca geçici kalsiyum artışı sağladığından, salınımların nAChR'ye özgü olduğu görülmektedir. $[Ca^{+2}]$ 'da ki nikotin aracılı artışlar, dihidrob eritroidin (DH bE) tarafından ortadan kaldırılarak, nAChR'lerin $\alpha 4\beta 2$ alt tipi aracılı olduğunu gösterir. nAChR aracılı kalsiyum salınımlarının altında yatan hücresel mekanizmaları ve bu hücrelerdeki fonksiyonel sonuçlarını belirlemek ilginç olacaktır. Benzer şekilde, sıçan

hipokampusünden birincil astrosit hücre kültürlerinde, hem nikotin hem de ACh hızla duyarsızlaştırıcı bir akımı indükler. Buna $[Ca^{+2}]$ 'daki artış eşlik eder (Sharma ve Vijayaraghavan, 2001). O2A / OPC'lerden farklı olarak, hem akımlar hem de astrositlerdeki kalsiyum sinyalleri MLA ve α Bgt tarafından inhibe edildi, bu sinyallerin nAChR içeren $\alpha 7$ aktivasyonundan kaynaklandığını öne sürmüştür (Sharma, Vijayaraghavan, 2001). Şekil 4.10.' da MLA' nın kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 4.10. MLA'nın Kimyasal Yapısı.

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16219626#section=Top>)

4.7. Kalsiyum

Kalsiyumun hücre dışı konsantrasyonları genellikle oldukça yüksek iken, 3-4 mM, genellikle hücrenin içi 100 nM' de veya altında tutulur. Kalsiyum, hücre dışı sıvılardan hücrelerin sitoplazmasına ya da kullanıma bağlı olarak hücre içi depolardan salınarak sitoplazmaya girebilir (Tang ve Goldman, 2002). Ligand kapıları ve G-protein kenetli kanallar en yaygın kalsiyum giriş yoludur. Bu kanallar, farmakolojik

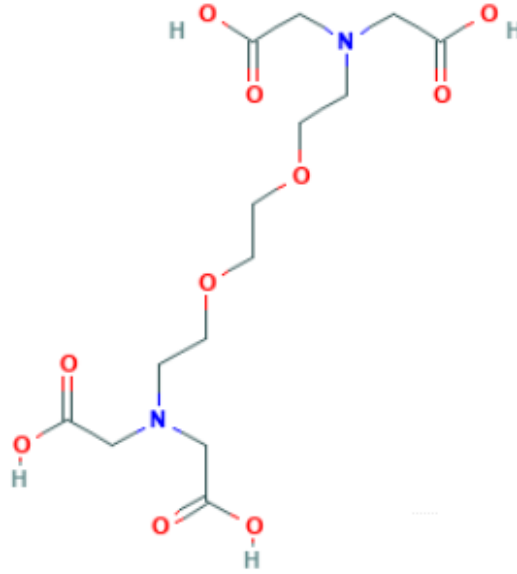
ve fizyolojik özelliklerine göre farklı sınıflara ayrılan heterojen bir protein grubudur. Kalsiyum girişi için diğer mekanizmalar arasında doğrudan reseptör aracılı kanallar ve plazma zarı boyunca doğrudan kalsiyum hareketine izin veren reseptörler bulunur. Genellikle hücrenin hormonlar veya nörotransmitterler ile etkileşimi sonrasında İnositol trifosfat (InsP3) oluşumu ile kalsiyumun intrasellüler salınımı uyarılır. Hücrenin içine girdiğinde, kalsiyum bir dizi protein kinazı, proteazları, fosfolipazları ve nükleazları aktive eder ve daha sonra gen ekspresyonu, mitojenez, metabolizma ve motilite gibi aktiviteleri düzenler. Kalsiyum aracılı etki artık gerekli değilse, hücreler orijinal veya istirahat durumuna kalsiyum seviyelerini geri yüklemek için çeşitli mekanizmalar kullanırlar (Mikoshiya, 2007; Clapham, 2007) Ca^{+2} sinyaller normal hücre davranış için gereklidir. Uyarılmayan dokularda, sekresyon, absorpsiyon, hücrelerarası taşıma gibi spesifik hücre fonksiyonların desteklenmesi, ayrıca dengeli hücre proliferasyonu, hücre ölümü, hücre motilitesi, oksijen ve besin kaynağı ile karakterize edilen stabil doku homeostazının korunması için gereklidir. Kanser gelişimi sırasında, bazı malign hücrelerin Ca^{+2} sinyalleri, normal fizyolojik fonksiyonları tehlikeye sokacak şekilde değişerek, kontrolsüz hücre çoğalması, programlanmış hücre ölümünden kaçışı, oksijene ve besin maddelerine adaptasyona karşı koşulsuz avantajlar sağlayarak normal hücrelere baskı yapmalarına neden olur. (Berridge ve Bootman, 1998; Prevarskaya ve ark., 2014).

Hücrede Ca^{+2} hücre dışı sıvı, sitoplazma, endoplazmik retikulum (ER, Golgi) ve mitokondria ana bölmeleri arasında dolaşır. Her bölgeye özgü sayısız Ca^{+2} 'a hassas proteinler vardır: (i) konsantrasyon gradyanına karşı bölmeler arasında aktif transportla Ca^{+2} taşıyıcı pompalar, (ii) konsantrasyon gradyanı yönünde pasif Ca^{+2} 'a geçirgen iyon kanalları, (iii) Ca^{+2} -bağlayan proteinler, (iv) Ca^{+2} 'a-bağımlı efektörler vardır. Ca^{+2} 'la ilişkili proteinlerin kontrollü kombine etkisi ve lokal Ca^{+2} aracılı sinyal komplekslerinin oluşumu aracılığıyla sinyal yolları aktive olur ve bu Ca^{+2} sinyalleri yaşam ve ölüm kadar çeşitli süreçlerde önemlidir (Berridge ve Bootman, 1998). Kanserde, mutasyonlar, anormal ekspresyon, Ca^{+2} işleme / taşıma proteinleri / proteinlerinin hücre içi hedeflenmesi ve / veya regüle edilmesi, Ca^{+2} sinyalleri bozulabilir. Bu, Ca^{+2} 'ya bağımlı bazı patofizyolojik kanser işaretlerini destekleyen efektörlerin düzensizleşmesine neden olur (Chen ve ark.; 2011). Nöronal olmayan hücrelerde nAChR aracılı kalsiyum girişinin rolü daha az anlaşılmıştır. Homomerik

reseptörlerin kalsiyum geçirgenliği, heteromerik nAChR'lerden önemli ölçüde daha yüksektir. Özellikle $\alpha 7$ nAChR alt tipi en yüksek kalsiyum permeabilitelerinden birine sahiptir. Bu reseptörün aktivasyonu sitoplazmik kalsiyum seviyelerini artırabilir ve bir dizi kalsiyum bağımlı hücre içi süreci tetikleyebilir (Dani, 2015).

4.7.1. EGTA

Kalsiyum iyon problemleri muhtemelen en yaygın kullanılan hücre içi göstergelerdir. Daha önce belirtildiği gibi, kalsiyum iyonu tespiti çoğu zaman, bir tanıma bölümünün yanı sıra flüoresan veren bir bölge içeren bir boya kullanılarak gerçekleştirilir (Practical Approach, 1991). Kalsiyum spesifik bağlanma için en yaygın kullanılan yapı 1,2-bis (2-aminofenoksi) etan N, N, N', N'-tetraasetik asit (BAPTA)'dır. Çoklu anyonik karboksil grupları, iki değerli kalsiyum iyonunu, kalsiyum spesifik şelatlayıcı, etilen glikol bis (β -aminoetileter) (EGTA) ile benzer bir şekilde bağlar. Membrana geçirgen Ca^{+2} şelatörü BAPTA-AM (1,2-bis (o-aminofenoksi) -etan-N, N, N', N'-tetraasetik asit, tetraasetoksimetil esteris), Ca^{+2} bağlama bölgelerine bağlı membran geçirgenliğini veren dört ester grubu içerir (Tsien, 1981). Hücrelere girildiğinde, esterler sitoplazmik esterazlar tarafından hidrolize edilir ve aktif bileşik BAPTA-AM'nin hücre içi bir Ca^{+2} tamponu olarak işlev gördüğü ortaya çıkar. BAPTA-AM, hücre fizyolojik ve biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde hücre içi Ca^{+2} sinyallerinde yapılan çalışmalarda dahil Ca^{+2} konsantrasyonunu kontrol etmek için hücre içi Ca^{+2} sünger olarak yaygın şekilde kullanılmıştır (Perrierve ark., 2004; Bodding ve Flockerzi, 2004; Furutave ark., 2009). Kalsiyum spesifik şelatör, Ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), bağlanma oranı çok hızlıdır. Şekil 4.11.' de EGTA' nın kimyasal yapısı gösterilmiştir.



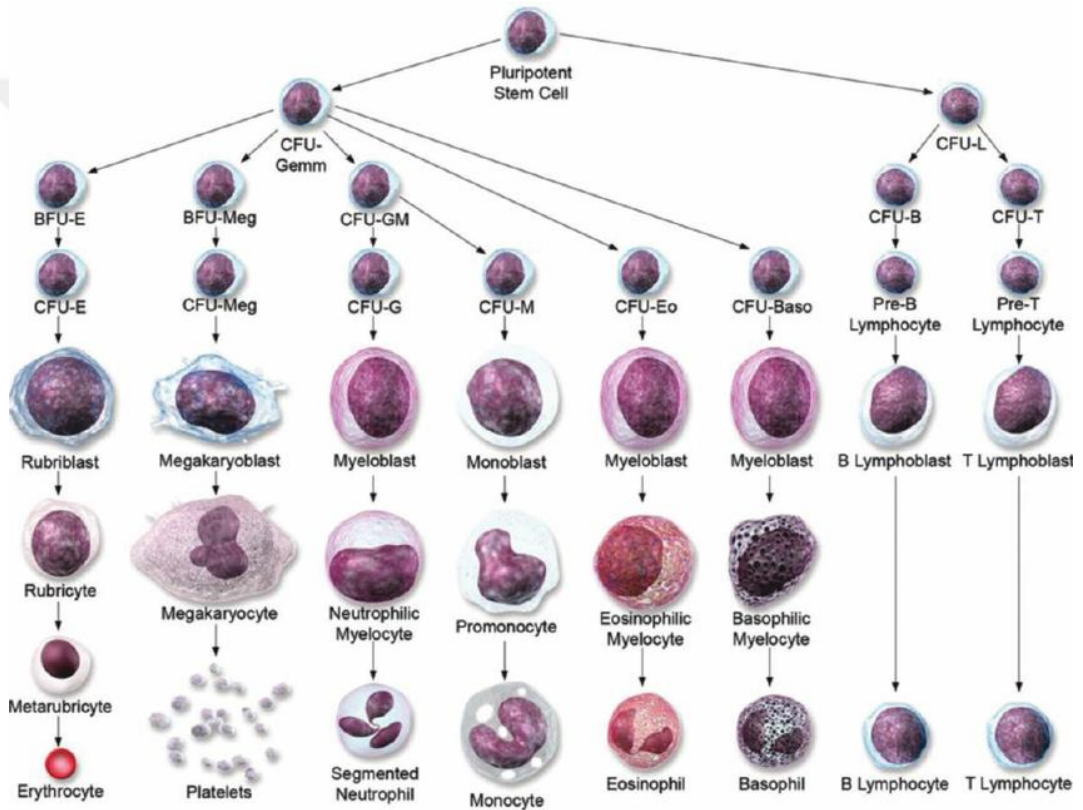
Şekil 4.11. EGTA' nın kimyasal yapısı.

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6207#section=Top>)

4.8. K562 Kronik Miyeloid Lösemi Hücreleri

Kronik miyeloid lösemi (KML) ilk olarak 1845' de Dr Rudolf Virchow ve Dr John Hughes Bennett tarafından iki patolog tarafından tanımlanmıştır. (Bennett, 1845; Virchow ve ark., 1845). KML'nin kronik veya stabil fazı, normal olarak farklılaşan ve işleyen fazla sayıdaki miyeloid hücre ile karakterizedir. Hastalığın bu döneminde % 90 ile % 95 arasında hasta teşhis edilir. Tarihsel olarak, ortalama 4 ila 6 yıl içerisinde, hastalık “hızlandırılmış bir faz” yoluyla, aynı zamanda patlama krizi olarak da bilinen, her zaman ölümcül bir akut lösemiye dönüşmüştür. Hastalığın ilerlemesi muhtemelen lösemik klonun terminal farklılaşması için kapasitenin kademeli olarak kaybedilmesine neden olan moleküler anormalliklerin birikmesinden kaynaklanmaktadır (Calabretta ve Perrotti, 2004). Allojenik kök hücre nakli tek kanıtlanmış küratif tedavidir, ancak önemli morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (Baccarani, 2006). 1975 yılında, Lozzio ve Lozzio, K562 hücre hattını, kronik miyeloid lösemili bir hastanın blastik kriz evresinde plevra sıvısından geliştirmiştir (Lozzio ve Lozzio, 1975). Kronik miyeloid lösemi (KML), kemik iliğinde kontrolsüz miyeloid hücre bölünmeleri ile işaretlenen hematoproliferatif bir neoplazmdir (Shahrabi ve ark., 2014). K562 hücresi, yaklaşık 20 µm çapında farklılaşmamış bir

hücredir. Hücre, granül içermeyen bir bazofilik sitoplazmaya sahiptir ve iki veya daha fazla belirgin nükleol vardır. K562 hücreleri normalde, granüositlerde ve monositlerde pozitif sitokimyasal reaktiflerle lekelenmez. Bantlama teknikleri kullanarak, K562 hücrelerinin normal kromozom sayısından yaklaşık 1.5 kat fazla kromozomu vardır. K562 hücreleri kültür ortamında yaklaşık 12 saatte büyür. K562 hücre hattının belirgin bir özelliği belirgin karyotipik anormalliklerdir (Lozzio ve Lozzio, 1975). Pluripotent kök hücreden olgun kan hücresine farklılaşma yolu Şekil 4.12.' de gösterilmiştir.

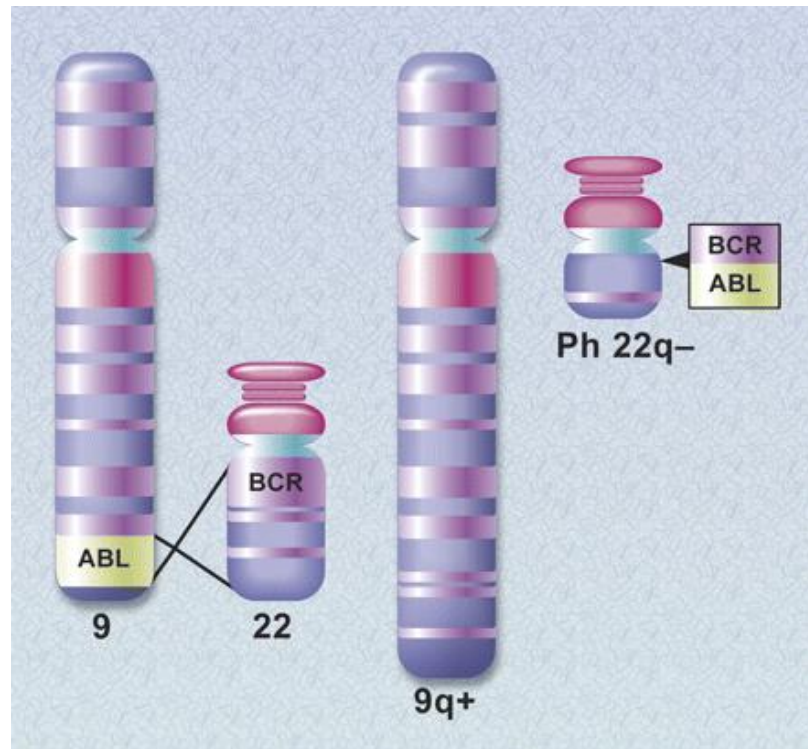


Şekil 4.12. Hücre farklılaşması.

Hüresel soyların pluripotent kök hücreden olgun kan hücresine farklılaşma yolu ilerlemesi (Travlos GS 2006).

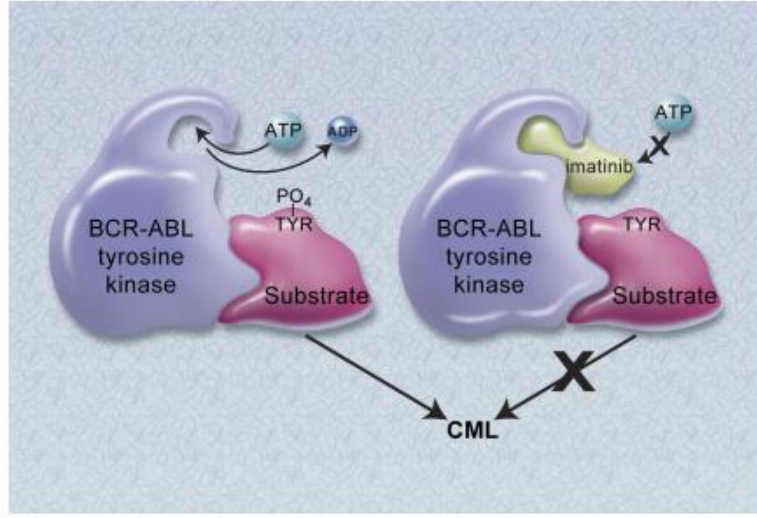
Philadelphia (Ph) kromozomu 5, kromozom 9 ve 22' nin uzun kolları arasındaki karşılıklı bir translokasyondan kaynaklanır (Rowley, 1973) (Şekil 4.13.). Bu translokasyonun moleküler sonucu, hemen hemen tüm KML' li hastalarda bulunan

yapısal olarak aktive edilmiş bir tirozin kinaz olan füzyon proteini BCR-ABL'nin üretilmesidir. *In vitro* çalışmalar ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, BCR-ABL'nin tek başına KML'ye neden olmak için yeterli olduğunu ve mutasyonel analizin, proteinin tirozin kinaz aktivitesinin onkojenik aktivitesi için gerekli olduğunu kanıtlamıştır (Şekil 4.14.). Akut lösemide varolan patolojik tablonun aksine, lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir (Daley ve ark., 1990; Kelliher ve ark., 1990; Heisterkamp ve ark., 1990).



Şekil 4.13. Philadelphia kromozomunu oluşturan translokasyonun şematik diyagramı.

ABL ve BCR genleri, sırasıyla 9 ve 22 kromozomlarının uzun kollarında bulunur. (9; 22) translokasyonunun bir sonucu olarak, türev kromozomu 22 (Philadelphia kromozomu) üzerinde bir BCR-ABL geni oluşturulur (Druker, 2008).



Şekil 4.14. Yapısal olarak aktif olan BCR-ABL tirozin kinaz.

KML'nin karakteristik miyeloid hücrelerinin aşırı çoğalmasına neden olmak için ATP'den çeşitli substratlar üzerindeki tirozin kalıntılarına transfer ederek işlev gösterir. Imatinib, ATP'nin BCR-ABL tirozin kinaza bağlanmasını bloke eder, böylece kinaz aktivitesini inhibe eder (Druker, 2008).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kimyasal maddeler

Akrilamit	Bio-Rad
Amonyum persülfat	Sigma
Asetik asit	Merck
Bisakrilamit	Sigma
Bromo kloroindol fosfat (BCIP)	Promega
Coomassieparlak mavisi R250	Sigma
Ditiyotiretiol(DTT)	Sigma
EDTA, Na	Sigma
EGTA	Sigma
Etanol	Merck
Etanol	Riedel
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma
Fenilmetilsülfonilflorür (PMSF)	Sigma
Glisin	Sigma
Gliserol	Sigma
HCl	Merck
Hepes	Sigma
Kalsiyumklorür	Sigma
β -Merkaptoetanol(50mM)	Sigma
Metanol	Merck
N,N,N',N',-tetrametiletildiamin (TEMED)	Sigma
Nitroblutetrazolyum(NBT)	Promega
NonidetP40	Amresco
Potasyumklorür	Merck
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma
Sodyumbikarbonat	Sigma
Sodyumdodesil sülfat (SDS)	Sigma

Sodyumhidroksit	Merck
Sodyumhidrojen fosfat	Merck
Sodyumklorür	Merck
Tris	Sigma
Triton-X100	Sigma
Tween20	Sigma
Propidiumiodide	Sigma
Magnezyumklorür	Sigma
Sodyumkarbonat	Merck
Potasyumklorür	Sigma
Potasyumbifosfat	Merck

Hücre kültür malzemeleri

HEPES	Sigma
Penisilin/Streptomisin	Sigma
RPMI-1640	Sigma
Sodyum bikarbonat	Sigma
Tripan mavisi	Sigma
L-Glutamin	Sigma
Fetal dana serumu	Biochrom, Biological Industries
25 cm ² kültür kabı	TPP
75cm ² kültür kabı	TPP
Mikroplate	TPP

Muskarinik agonist ve antagonistler

ACh	Sigma
Atropin	Sigma

Nikotinik agonist ve antagonistler

MLA	Abcam
ACh	Sigma
Atropin	Sigma

Western emdiriminde kullanılan antikorlar

Nikotinik alfa 7 antikor	ABclonal
Beta aktin antikor	ABclonal

Kullanılan Kitler

BrDU	Sigma
Lowry Kit	Thermo Fisher
Calcium Kit	Abcam

Western emdirimi gereçleri

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

5.1.2. Cihazlar

1-Agaroz Yatay Elektroz Tankı	Bio-Rad
2-Etöv	Memmert
3-Güç Kaynağı	Dan-Kar
4-Güç Kaynağı	Pharmacia LKB
5-Manyetik Karıştırıcı	Hanna
6-Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Kotterman
7-pH Metre	WTW
8-Santrifüj	Hettich 30 RF
9-Spektrofotometre	LKB
10-Su Banyosu	Kotterman
11-Karıştırıcı (Vorteks)	Janke & Kunkel
12-Terazi	Oertling NA-114
14-Etöv	Memmert
16- Karbondioksit Etüvü	Shel Lab

17-Derin Dondurucu (-20 °C)	Arçelik
18-Derin Dondurucu (-20 °C)	Siemens
19-Derin Dondurucu (-70 °C)	So-Low
20-Buzdolabı	Arçelik
21-Kırık Buz Makinesi	Scotsman AF-10
22-Çalkalama Cihazı	IKA-Vibraz-VXR
23-Otomatik Mikro Pipetler	Gilson
24-Otoklav	Nüve
25-Distile Su Cihazı	GFL
26-Fotograf Makinesi	Sony
27-Tarayıcı	Mustek
28-Laminar akım kabini (Steril kabin)	Kutay
30-ELISA Reader	ThermoMJ-Research-Mini Cyclor
31-Fotograf Makinesi	Sony
32-Santrifüj	Eppendorf
33-Işık Mikroskobu	Leica
34-Invert (ters ışık) Mikroskopu	Olympus
37-Transblot system	BioRad
38-Biotek	TGR Biosciences
39- TC20 hücre sayım cihazı	BioRad

5.1.3. Tampon ve çözeltilerin bileşimi

Hücre sayımında kullanılan çözeltiler

Tripan mavisi ile hücre sayımı

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

BrDU ile hücre sayımı

5-Bromo-2-deoksi-üridin etiketli hücre sayım kiti (Sigma) kiti ile hücre sayımı yapıldı.

Hücre içi kalsiyum düzeyi

Kalsiyum düzeyi Fluo-8 No Wash Kalsiyum Test Kiti (Abcam) ile belirlendi

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)

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

pH=7.4 olacak şekilde 1 litre distile su içerisinde çözüldü.

Ca²⁺ ölçüm deneylerinde kullanılan çözeltiler

HBSS (Hank's Dengeli Tuz Çözeltisi)

NaCl (mw: 58.4 g/mol)	8 g	0.14 M
KCl (mw: 74.551 g/mol)	400 mg	0.005 M
CaCl ₂ (mw: 110.98 g/mol)	140 mg	0.001 M
MgSO ₄ -7H ₂ O (mw: 246.475 g/mol)	100 mg	0.0004 M
MgCl ₂ -6H ₂ O (mw: 203.303 g/mol)	100 mg	0.0005 M
Na ₂ HPO ₄ (mw: 177.99 g/mol)	60 mg	0.0003 M
KH ₂ PO ₄ (mw: 136.086 g/mol)	60 mg	0.0004 M
Glucose (mw: 180.156 g/mol)	1 g	0.006 M
NaHCO ₃ (mw: 84.007 g/mol)	350 mg	0.004 M

5.1.3.1. Protein izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Hücre Lizatinın hazırlanması

Homojenleştirme tamponu (Lysis Tampon) (Taze hazırlanır)

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

Aprotinin 2 µg/ml

5.1.3.2. Lowry metodunda kullanılan çözeltiler

Lowry kit

Lysis Buffer

50 mM Hepes (pH: 7,4)

150 mM NaCl

20 mM EDTA

100 µM NaF

10 mM Na₃VO₄

1 mM PMSF

1mM Leupeptin

20 µg/ml Aprotinin

5.1.3.3. Elektforez ve Western emdirimi analizlerinde kullanılan çözeltiler

Akrilamit-Bisakrilamit çözeltisi

30 gr Akrilamit

0.8 gr N, N-metilen bis akrilamit

Tepkime hacmi: 100 ml

Örnek tamponu (4X)

125 mM Tris-HCl pH 6.8

%30 v/v Gliserol

6 M Üre

%10 w/v β merkaptotanol

%2 w/v Sodyum dodesilsülfat (SDS)

%0.01 w/v bromfenol mavisi

2x Ayırma jeli tamponu

0.75 M Tris-HCl, pH 8.8

%0.2 w/v SDS

2x Yükleme jeli tamponu

0.25 M Tris-HCl, pH 6.8

%0.2 w/v SDS

5x Elektroforez tamponu

7.5 gr Tris

36 gr Glisin

2.5 gr SDS

Tepkime hacmi: 500 ml

Aktarma tamponu, pH 8.5

25 mM Tris, pH:8.3

192 mM Glisin

%20 Metanol

Tris tuz tamponu (TBS), pH 8.0

136.75 mM NaCl

2.68 mM KCl

21.26 mM Tris-HCl

Blok tamponu

%1 BSA

%0.05 Tween-20

TBS-T tamponu (%0.1)

TBS

%0.1 Tween 20

Birincil antikör tamponu

Anti nikotinik Alfa 7 antikoru:
seyreltilmiş

Bloklama çözeltisi ile 1:500

Anti-beta aktin antikorunu:
seyreltilmiş

Bloklama çözeltisi ile 1:50

İkincil antikor tamponu

AP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L):
%0.05 Tween 20.

TBS ile 1:5000 seyreltilmiş

NBT/BCIP geliştirici tampon

100 mM Tris, pH:9.5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
66 µl NBT (50 mg/ml)
33 µl BCIP (50 mg/ml).

Geliştirici tampon

100 mM Tris-HCl, pH 9.5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂.

SDS-PAGE ayırma jeli (%12)

Damıtık su	0.94 ml
2X Ayırma Jeli Tamponu	5 ml
30:0.8 Akrlamit/Bisakrlamit	4 ml
%10 (w/v) Amonyum persülfat	50 µl
TEMED	10 µl

SDS-PAGE yükleme jeli (%5)

Damıtık su	1.05 ml
2X Yükleme Jeli Tamponu	2.5 ml
30:0.8 Akrlamit/Bisakrlamit	0.85 ml
%10 (w/v) Amonyum persülfat	50 µl
TEMED	10 µl

Jel boyama çözeltisi

%0.2 (w/v) Coomassie mavisi

%50 (v/v) Metanol

%10 Asetik asit.

Jel boya çıkarma çözeltisi

%10 (v/v) Metanol

%10 (v/v) Asetik asit

5.2. Yöntem

5.2.1. Çalışmada kullanılan hücrelerin hazırlanması

5.2.1.1. Hücrelerin çoğaltılması

K562 hücreleri (ATCC, Manassas, VA, ABD) CCL-243 katalog no'lu donmuş hücre hattı şeklinde ve ticari satın alınarak edinilmiştir. K562 hücreleri %10 FDS (fetal dana serumu), 10000 U/μl penisilin, 100 μg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 basiyerinde, 37°C' ta, %5 CO₂ içeren karbondioksit etüvünde inkübe edildi ve hücreler 5x10⁶ hücre/ml olacak şekilde çoğaltıldı.

5.2.1.2. Hücrelerin agonist, antagonist ve inhibitörlerle muamelesi

K562 hücreleri agonist ve antagonist eklenmeden 1 gün önce fetal dana serum (FDS) olmayan ortama alındı. K562 hücreleri serumsuz ortamda (% 0 fetal dana serumlu ortam) 24 h kültür edildikten sonra ACh'in nikotinik α7 reseptör ekspresyonuna ve hücre çoğalmasına etkisini belirlemek üzere; nikotinik reseptör agonisti ACh (1-100 uM), nikotinik α7 reseptör antagonisti MLA (500 nM), ve Atropin (ATR) (100 uM) ile muamele edilerek 24h inkübe edildi. K562 hücrelerinde α7 nikotinik alt biriminin rolünün belirlenmesi için nikotinik antagonist MLA ve ATR, ACh eklenmeden 30 dak. önce hücrelere muamele edildi. Hücre çoğalması BrDU kiti(Roche) ile belirlendi. Çalışmamızda eritrolösemi hücrelerinde nikotinik α7 reseptör ekspresyonuna etkisi western emdirimi yöntemi ile belirlendi. Bu sebeple hücre kültür

ortamında 50×10^6 olacak şekilde çoğaltılan hücreler PBS ile yıkandı ve -80°C 'ta donduruldu.

K562 hücrelerinde agonist ve antagonistlerin kalsiyum salınımına etkisi ve hücre sayısı ELİSA yöntemi ile belirlendi.

5.2.1.3. Hücrelerin sayılması

Tripan mavisi ile hücre sayımı

Hücreler %10 oranında Tripan mavisi kullanılarak boyandı, TC20 hücre sayım aleti ve toma lamında kullanılarak sayılmıştır

Canlılık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı. %95 canlılık oranı elde edildi. Hücreler, hücre sayımı yapıldıktan sonra Western emdirimi yapmak üzere -80°C ' de donduruldu.

10 μl örnek üzerine 90 μl Tripan mavisi eklendi. Ölü hücreler maviye boyandı. Canlılık oranı hesaplandı.

$$(\text{Canlı hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100 = \text{Canlılık oranı}$$

BrDU ile hücre sayımı

Hücre sayım kiti (Sigma) (5-Bromo-2-deoksi-üridin etiketli) protokolü doğrultusunda hücre sayımı yapıldı. Herbir kuyuda en fazla 100 μl kültür ortamı olacak şekilde 37°C 'da %5 CO_2 varlığında hücreler inkübe edildi. 100 μl kültür ortamına, son konsantrasyonu 10 μM olan 10 μl BrDU solüsyon I (işaretleme tamponu) eklendi. Hücreler 18 saat inkübe edildi. Ardından 300 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve işaretleme tamponu kültür ortamından uzaklaştırıldı. Hücreler 60°C 'da 1 saat Pasteur fırınında kurutuldu. 200 μl FixDenat (bottle 2) ile hücreler 25°C ' da 30 dakika boyunca inkübe edildi. Hücreler, 3 kere %10 FDS içeren 250 μl yıkama tamponu ile yıkandı (PBS, 1X). 100 μl Anti-BrdU-POD çalışma tamponu ile 90 dakika 25°C 'da inkübe edildi. Antikor konjugatı 250 μl yıkama tamponu ile 3 kere yıkandı (PBS, 1X). Ardından yıkama solüsyonu ortamdaki uzaklaştırıldı ve 100 μl substrat tamponu eklendi. Renk değişimi olana kadar inkübe edildi (5-30 dakika). Örnekler 370 nm dalga boyunda Biotek Synergy H1 cihazında okundu.

5.2.1.4. Ca⁺² ölçüm deneyleri

Fluo-8 No Wash Kalsiyum Test Kiti (Abcam) kullanılarak hücre içi kalsiyum mobilizasyonu tespit edildi. % 0 FBS' li (serumsuz) besiyerindeki K562 hücreleri 300 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılıp, üzerine HBSS eklendi. Hücreler siyah renkte 96 kuyucuklu plakaya ekildi ve Fluo-8 boya yükleme solüsyonu eklendi. 25 °C'de 1 saat inkübe edildi. Ardından deney kurgusu 6.1.3. ve 6.1.4. başlıkları altında anlatılacağı şekilde uygulanarak Biotek Synergy H1 cihazında kalsiyum ölçümü yapıldı.

5.2.1.5. Hücrelerin toplanması

Kültür ortamında büyütülen K562 hücreleri, 1x10⁶ hücre/ml yoğunluğuna ulaşınca protein örnekleri için toplam 30x10⁶ olacak şekilde hücre toplandı. Hücreler 700 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı ve 5 ml PBS çözeltisi eklenip 700 g'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi. Aynı işlem 3 kez tekrar edildi. Hücreler Western emdirimi yapmak için -80 °C'lık dondurucuda saklandı.

5.2.2. Hücre özütlerinin hazırlanması

Homojenizasyon için Lysis tamponu hazırlandı. Western emdirimi için -80° C'de saklanan hücreler ilk olarak 700 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Pelete homojenizasyon tamponundan 500 µl eklendi. Enjektör ile hücreler patlatıldı. Patlatılan hücreler 1 ml'lik ependorf tüpe alındı. Ependorf tüpler 4 °C'de 300 g'de 3 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı ve pelet 100 µl homojenizasyon tamponu ile tekrar muamele edildi. Ardından hücreler tekrar -80°C'de saklandı.

Protein Miktar Tayini

K562 hücrelerindeki protein miktarını tayin etmek için Lowry yöntemi kullanıldı (Lowry ve ark., 1946).

5.2.3. Elektroforez

-80° C'de saklanan protein örneklerine, 4X örnek yükleme tamponu eklendi. Ardından yükleme tamponu eklenmiş örnekler (50 µg) 100 °C'de 3 dakika denatüre edildi.

Örnekler, önceden hazırlanan %10'luk SDS-PAGE jeline yüklendi. Proteinler elektroforez sıvısı içinde, 150 Volt'da 100 dakika yürütüldü.

Islak elektroforetik transfer düzeneği ile elektroforetik transfer

Nitroselüloz membran, jel büyüklüğünde kesildi. Proteinlerin yürümesi tamamlandıktan sonra çıkarılan jelin üst jeli kesildi. Nitroselüloz membran, filtre kağıtları ve süngerler 15 dakika boyunca aktarma tamponu içinde bekletilerek ıslatıldı. Jel kasetindeki pozitif elektrodun (anot) üzerine kaset,

Sünger → 3MM filtre kağıdı → nitroselüloz membran → jel → 3MM filtre kağıdı → sünger

şeklinde dizildi. Kaset transfer düzeneğine yerleştirildi. Ardından kasedin üst kısmına kadar aktarma tamponu dolduruldu. Düzenek 150 miliamperi geçmeyecek şekilde 1,5 saat sürece aktarma yapıldı.

Western emdirimi analizi

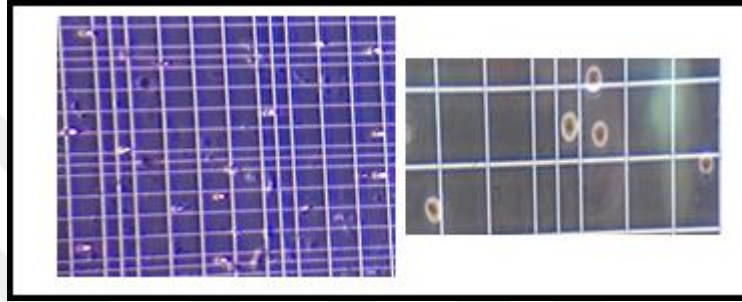
Aktarımın doğruluğunu kontrol etmek için membran Ponceau S solüsyonu ile boyandı ve ardından distile su ile yıkandı. Membran %3 BSA içeren TBS-T blok tamponunda 1 saat 4 °C'de inkübe edildi. Ardından α 7, β -actin proteini antikoruna ile 4 °C'de gece boyu etkileştirildi. Ardından TBS-T tamponuyla 3-5 kez 15'er dakikalık yıkamalar yapıldı. Membranlar alkalen fosfataz eşlenik tavşan anti-keçi IgG (2.cil antikor) ile 1 saat etkileştirildikten sonra tekrar TBS-T tamponuyla 3-5 kez de 15'er dakika yıkandı. 1.cil antikor ve 2.cil antikor ile etkileştirilen membranlar BCIP/NBT renk geliştirici tampon ile renklendirildi.

6. BULGULAR

6.1. K562 Hücre sayımı sonuçları

6.1.1. K562 hücre çoğalmasının hemositometrede tripan mavisi yöntemi ile belirlenmesi

Hücreler 24 saat serumsuz ortamda inkübe edildi. Ardından hücre sayımı Thoma lamında ve TC20 hücre sayım aleti ile tripan boyaması yöntemi kullanılarak yapıldı ve hücrelerde % 95 oranında canlılık saptandı.

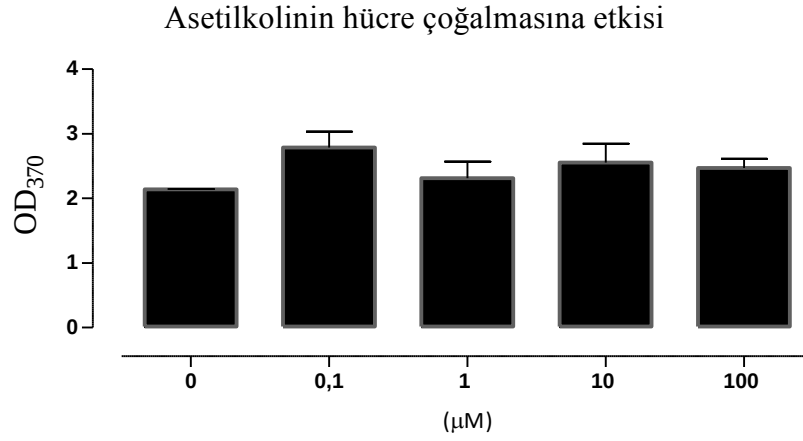


Resim 6.1 K562 hücre çoğalmasının hemositometrede tripan mavisi yöntemi ile belirlenmesi

6.1.2. K562 hücre çoğalmasının BrDU yöntemi ile belirlenmesi

6.1.2.1. K562 hücre çoğalmasına ACh konsantrasyonlarının etkisi

K562 hücreleri, kolinerjik agonist asetilkolinin farklı konsantrasyonlarının hücre çoğalmasına etkisini belirlemek için, %10 FBS' li besiyerinde çoğaltıldı. K562 hücreleri 1 gün serumsuz kültür ortamında inkübe edildi. Hücrelerin agonist varlığında hücre çoğalmasındaki rolünü belirleyebilmek için hücreler, 0, 0.1, 10, 100 μ M konsantrasyonlarında ACh ile muamele edilerek 24 saat inkübe edildi. Kontrol grubunda bulunan hücreler asetilkolin ile muamele edilmedi (Şekil 6.1.).



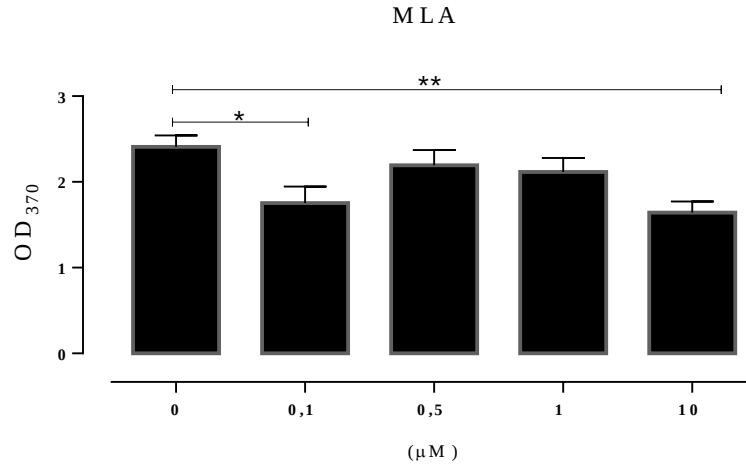
Şekil 6.1. K562 hücre çoğalmasına asetilkolinin etkisi.

Hücreler, 0 μM, 0.1 μM, 10 μM, 100 μM asetilkolin ile muamele edilip, 24 saat inkübe edildikten sonra BrDU yöntemi kullanılarak sayıldı. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde gösterildi.

K562 hücrelerinin BrDU yöntemi kullanılarak sayımının ardından, 0,1 μM ACh ile muamele edilen hücrelerin diğer konsantrasyonlara göre daha fazladır. 0,1 μM ACh kontrole göre %32 hücre çoğalmasında artışa sebep olduğu görüldü ($P>0.05$). Ardından sırasıyla 10, 100 μM ACh' nın hücre çoğalmasını arttırdığı görüldü ($P>0.05$).

6.1.2.2. K562 hücre çoğalmasına MLA konsantrasyonlarının etkisi

K562 hücreleri, nikotinik $\alpha 7$ antagonist MLA' nın farklı konsantrasyonlarının hücre çoğalmasına etkisini belirlemek için, %10 FBS' li besiyerinde çoğaltıldı. K562 hücreleri 1 gün serumsuz kültür ortamında inkübe edildi. Hücreler 0, 0.1, 0.5, 1, 10 μM konsantrasyonlarında MLA ile muamele edilerek 24 saat inkübe edildi. Kontrol grubunda bulunan hücreler MLA ile muamele edilmedi. Hücre sayımı BrDU yöntemi kullanılarak yapıldı ve elde edilen verilerle hücre çoğalmasını ifade eden grafik çizildi (Şekil: 6.2.).



Şekil 6.2. K562 hücre çoğalmasına MLA' nın etkisi.

Hücreler, 0 μM, 0,1 μM, 0,5 μM, 1 μM, 10 μM MLA ile muamele edilip, 24 saat inkübe edildikten sonra BrDU yöntemi kullanılarak sayıldı. Sonuçlar 6 deneyin ortalaması alınarak ± standart hata (SEM) şeklinde gösterildi.

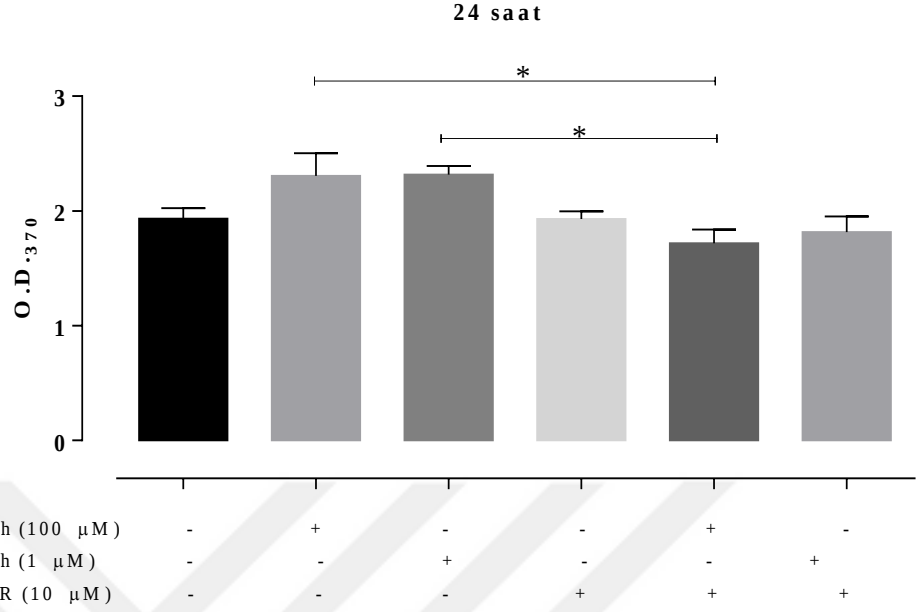
K562 hücrelerinin BrDU yöntemi kullanılarak sayımı sonrası 10 μM ile muamele edilen hücrelerin kontrole göre hücre çoğalmasında %32 inhibisyona sebep olduğu ($P < 0.05$), ardından sırasıyla (0,1 μM %25), (0,5 μM %9), (1 μM %12.09), MLA' nın da hücre çoğalmasını kontrole göre inhibe ettiği görüldü.

6.1.2.3. K562 hücre çoğalmasına agonist ve antagonistlerin etkisi

K562 hücreleri, agonist ve antagonistlerin hücre çoğalmasına etkisini belirlemek için, %10 FBS' li besiyerinde çoğaltıldı. K562 hücreleri 1 gün serumsuz kültür ortamında inkübe edildi. Hücreler 96'lık steril plakalara ekildi. Kontrol grubuna agonist ya da antagonist eklenmedi.

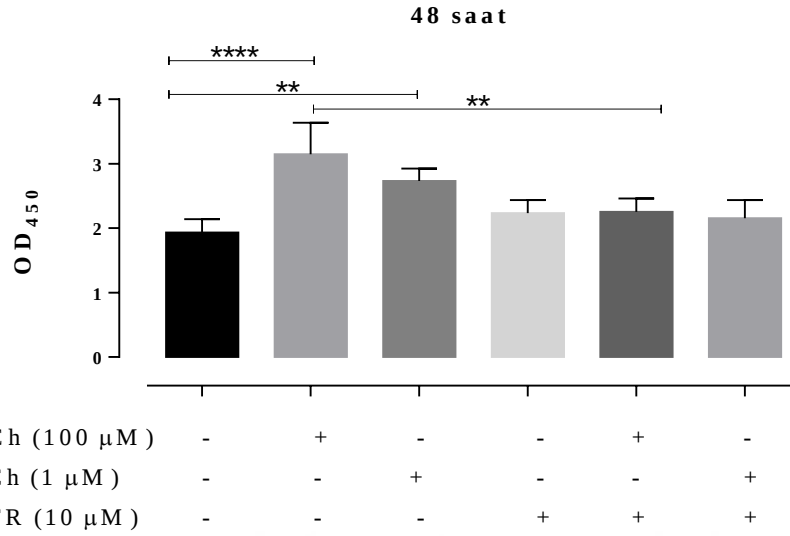
6.1.2.4. K562 hücre çoğalmasına ATR' nin etkisi

K562 hücreleri, ATR' nin hücre çoğalmasına etkisini belirlemek için, K562 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamına antagonistler 30 dakika önce eklendi ve ardından agonist eklendi. 10 μM ATR hücrelere eklendi 30 dakika beklendikten sonra 100 μM ve 1 μM ACh eklendi. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücreler ATR varlığında 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra BrDU yöntemi ile sayıldı ve grafik elde edildi. Grafikler, Şekil 6.3. ve 48. Saatdeki etkisi Şekil 6.4.' de gösterilmiştir.



Şekil 6.3. K562 hücre çoğalmasına ATR' nin etkisi. K562 hücre çoğalmasına ACh, ve/veya ATR' nin etkisi. Hücreler, agonist ve antagonist ile muamele edilip, 24 saat inkübe edildikten sonra BrDU yöntemi kullanılarak sayıldı. Sonuçlar 6 deneyin ortalaması alınarak $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde gösterildi. $P \geq 0,0711$, (* $P < 0,008$).

Kontrole göre 100 μ M ve 1 μ M ACh 24. saatte hücre çoğalmasında artışa sebep olurken, 100 μ M ve 1 μ M ACh'nin 24.saatdeki etkisini 10 μ M ATR, geri çevirmiştir ($P < 0,008$). Asetilkolin ve/veya Atropinin 48.saatde hücre çoğalmasına etkisi Şekil 6.4.'de gösterilmiştir.

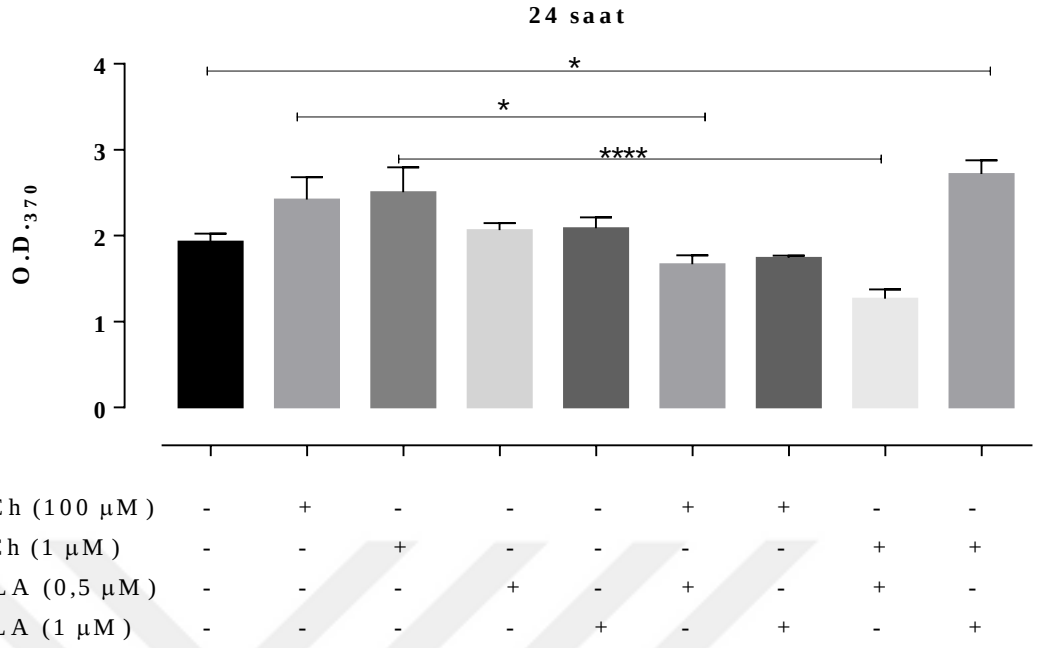


Şekil 6.4. K562 hücre çoğalmasına ATR' nin etkisi. Hücreler, ATR ile muamele edilip, 48 saat inkübe edildikten sonra BrDU yöntemi kullanılarak sayıldı. Sonuçlar 6 deneyin ortalaması alınarak $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde gösterildi. ****, $P < 0,0001$.

100 µM ve 1 µM ACh kontrole göre K562 hücre çoğalmasında artışa neden oldu (** $P < 0,001$). ACh' nin hücre çoğalmasındaki uyarıcı etkisi 10 µM ATR ile geri çevrildi (** $P < 0,001$).

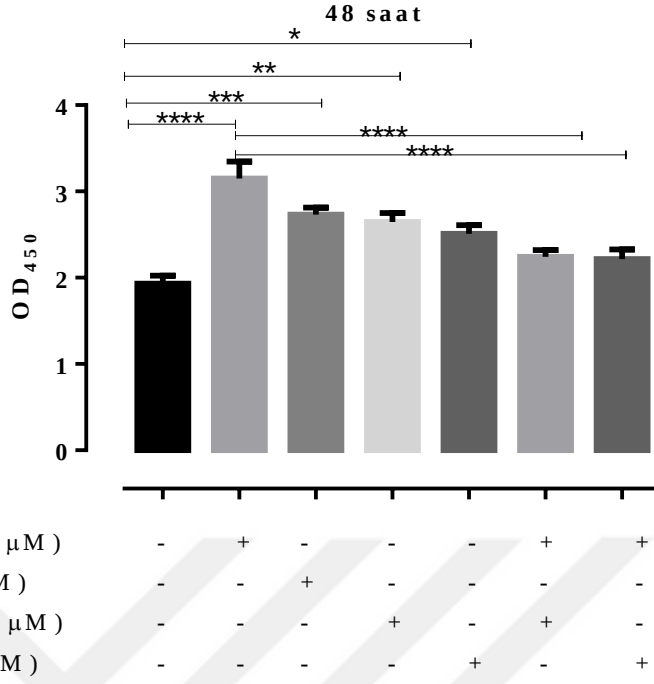
6.1.2.5. K562 hücre çoğalmasına MLA' nın etkisi

K562 hücreleri, MLA' nin hücre çoğalmasına etkisini belirlemek için, %10 FBS' li besiyerinde çoğaltıldı. K562 hücreleri 1 gün serumsuz kültür ortamında inkübe edildi. Hücreler 96'lık plakalara ekildi. Kontrol grubuna agonist ya da antagonist eklenmedi. K562 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamına antagonistler 30 dakika önce eklendi ve ardından agonist eklendi. 0.5 µM MLA ve 1 µM MLA hücrelere eklendi 30 dakika beklendikten sonra 100 µM ve 1 µM ACh eklendi. Hücreler 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra BrDU yöntemi ile sayıldı ve grafik elde edildi. Grafikler, Şekil 6.5. ve Şekil 6.6.' de gösterilmiştir.



Şekil 6.5. K562 hücre çoğalmasına MLA' nın etkisi. K562 hücre çoğalmasına MLA' nın 24.saatdeki etkisi. Hücreler, MLA ile muamele edilip, 24 saat inkübe edildikten sonra BrDU yöntemi kullanılarak sayıldı. Sonuçlar 6 deneyin ortalaması alınarak $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde gösterildi.

1 ve 100 μ M ACh' nın uyarıcı etkisi 1 μ M MLA ile muamele edilmesi sonucu K562 hücre çoğalmasını geri çevirmiştir * $P < 0,001$. 1 μ M ACh' nın uyarıcı etkisini 0.5 μ M MLA geri çevirdi **** $P < 0,0001$. Ancak 1 μ M ACh' nın uyarıcı etkisini 1 μ M MLA geri çevirmedi. Kontrol grubuna göre 1 μ M ACh ve 1 μ M MLA hücre sayısında anlamlı artışa neden oldu * $P < 0,001$.



Şekil 6.6. K562 hücre çoğalmasına MLA'nın 48.saatdeki etkisi. Hücreler, MLA ile muamele edilip, 48 saat inkübe edildikten sonra BrDU yöntemi kullanılarak sayıldı. Sonuçlar 6 deneyin ortalaması alınarak $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde gösterildi.

K562 hücre çoğalmasında 100 μ M ve 1 μ M ACh kontrole göre artışa neden oldu ve hem ATR hemde MLA ile muamelesi hücre çoğalmasını geri çevirdi. 100 μ M ACh'nın uyarıcı etkisi ayrıca 0,5 μ M ve 1 μ M MLA ile geri çevrildi****, $P < 0,0001$. 100 μ M ACh'in uyarıcı etkisi 0,5 μ M MLA ve 1 μ M MLA varlığında sırası ile % 29 ve %30 inhibisyona neden oldu****, $P < 0,0001$.

6.1.3. K562 hücrelerinde agonist ve antagonist konsantrasyonuna bağlı Ca^{+2} akışı

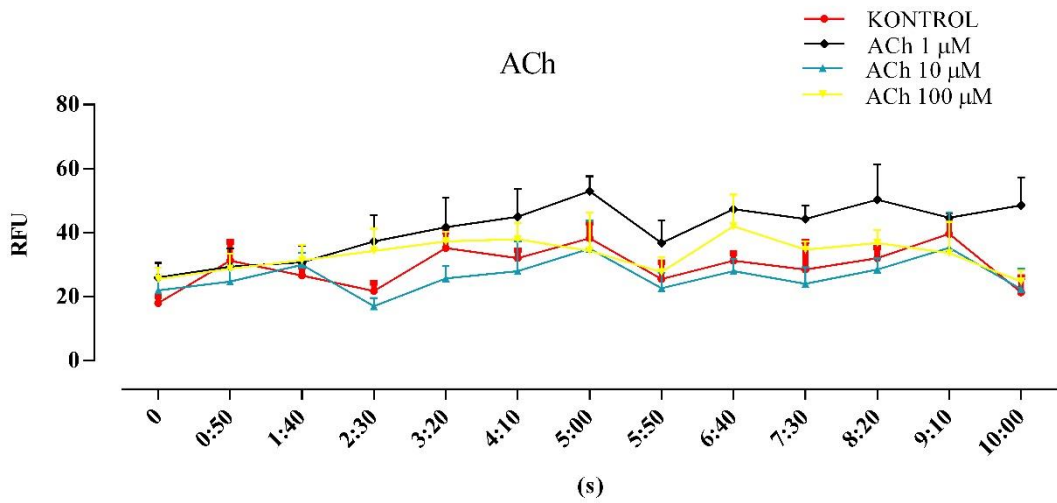
K562 hücreleri, Ca^{+2} akışını belirlemek için, kısım 5.2.1.4. (Ca^{+2} ölçüm deneyleri) de anlatıldığı gibi hazırlandı ve Biotek Synergy H1 cihazında ilk olarak boş kalsiyum ölçümü yapıldı. Ardından hücrelere farklı konsantrasyonlarda nikotinik antagonistler (MLA) ve agonist (ACh) eklendi. K562 hücreleri agonist ve antagonistlerle 5 dakika inkübe edildi ve inkübasyonun ardından kalsiyum ölçümü yapıldı. Elde edilen verilerle K562 hücrelerinde agonist ve antagonist konsantrasyonuna bağlı Ca^{+2} akışını ifade eden grafikler çizildi.

Agonist ve antagonistler için kullanılan konsantrasyonlar,

ACh → 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M.

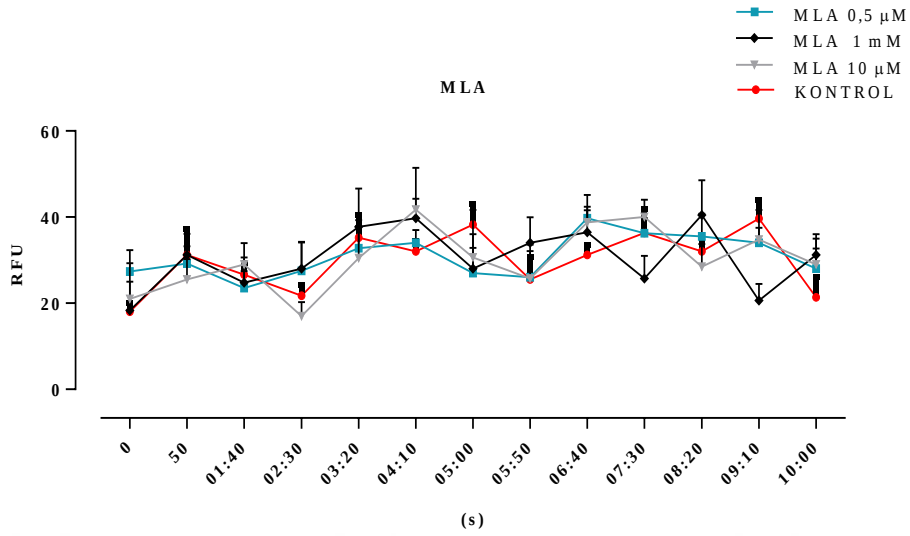
MLA → 0,5 μ M, 1 μ M, 10 μ M.

K562 hücrelerinde agonist ve antagonist konsantrasyonuna bağlı Ca^{+2} akışını ifade eden grafikler 0-10 saniye aralığındaki veriler kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 6.7., Şekil 6.8.).



Şekil 6.7. K562 hücrelerinde ACh konsantrasyonunun zamana bağlı Ca^{+2} akışına etkisi.

Hücre dışında Ca^{+2} yokluğunda 10 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarında ki ACh, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda değişikliğe neden olmadı. 1 μ M ACh 5.saniyede hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda %50 artışa sebep oldu. Ancak 10 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarında ki ACh ilavesi hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu üzerine hiçbir etkisinin olmaması hücre içine Ca^{+2} girişinin bu dozlarda kolinerjik reseptörler üzerinden gerçekleştiğini gösterir.



Şekil 6.8. K562 hücrelerinde MLA konsantrasyonunun zamana bağlı Ca^{+2} akışına etkisi.

Hücreler 96 kuyucuklu siyah hücre kabına ekildi. 0.5, 1 ve 10 μM MLA ile muamele edilip inkübe edildikten sonra Ca^{+2} ölçümü yapıldı. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde gösterildi.

Hücre dışında Ca^{+2} yokluğunda MLA' nın bütün dozları 5. saniyede kontrole göre hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda inhibisyona sebep oldu. Kontrola göre 0.5 μM MLA %29, 1 μM %26, 10 μM MLA %20 inhibisyona sebep olmuştur.

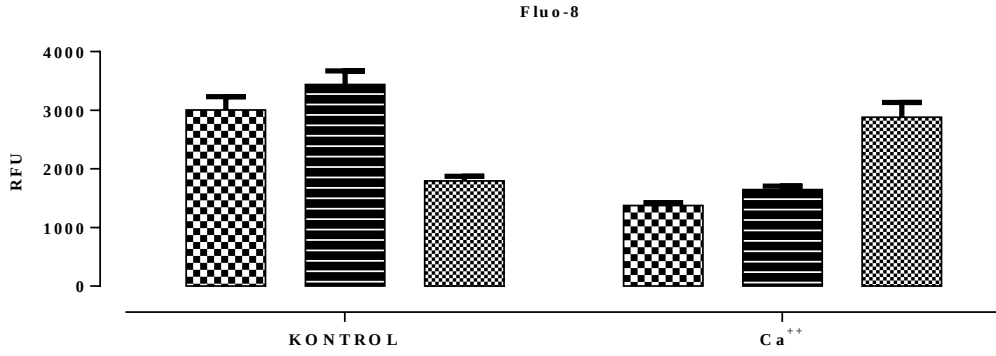
6.1.4. K562 hücrelerinde agonist ve antagonist varlığında Ca^{+2} akışı

K562 hücreleri, Ca^{+2} akışını belirlemek için, kısım 5.2.1.4. (Ca^{+2} ölçüm deneyleri) de anlatıldığı gibi hazırlandı ve ilk olarak Biotek Synergy H1 cihazında boş Ca^{+2} ölçümü yapıldı. Ardından hücrelerin bulunduğu 96 kuyucuklu siyah hücre kabına EGTA, Ca^{+2} ve antagonistler eklenerek ikinci Ca^{+2} okuması yapıldı. Hücreler antagonistler varlığında 30 dakika inkübe edildi ve agonist eklenerek Ca^{+2} okuması yapıldı. Elde edilen verilerle K562 hücrelerinde agonist ve antagonist varlığında Ca^{+2} akışını ifade eden grafikler çizildi (Şekil 6.9. ve Şekil 6.10.).

Kullanılan agonist ve antagonistler,

Agonistler: ACh 1 μM

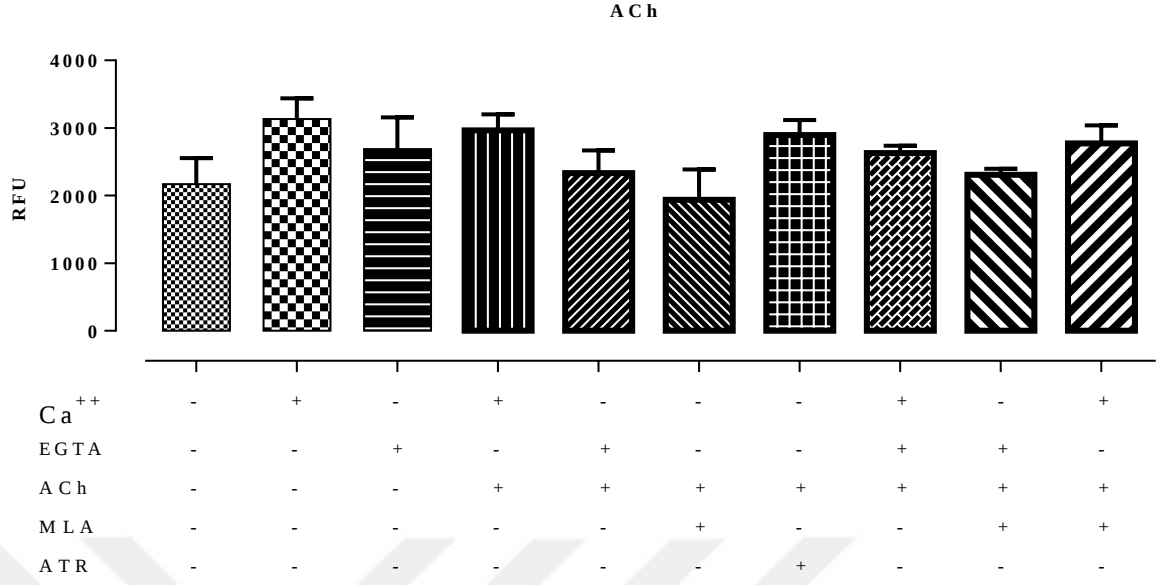
Antagonistler: MLA 10 μM , ATR10 μM ,



Şekil 6.9. K562 hücrelerinde agonist ve antagonist varlığında Ca^{+2} akışı (1.2. ve 3. okumalar).

Ca^{+2} akışını belirlemek üzere deneyin optimizasyonunu için Ca^{+2} yokluğunda (kontrol) ve hücre dışı Ca^{+2} varlığında Ca^{+2} ölçümleri yapıldı. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde gösterildi.

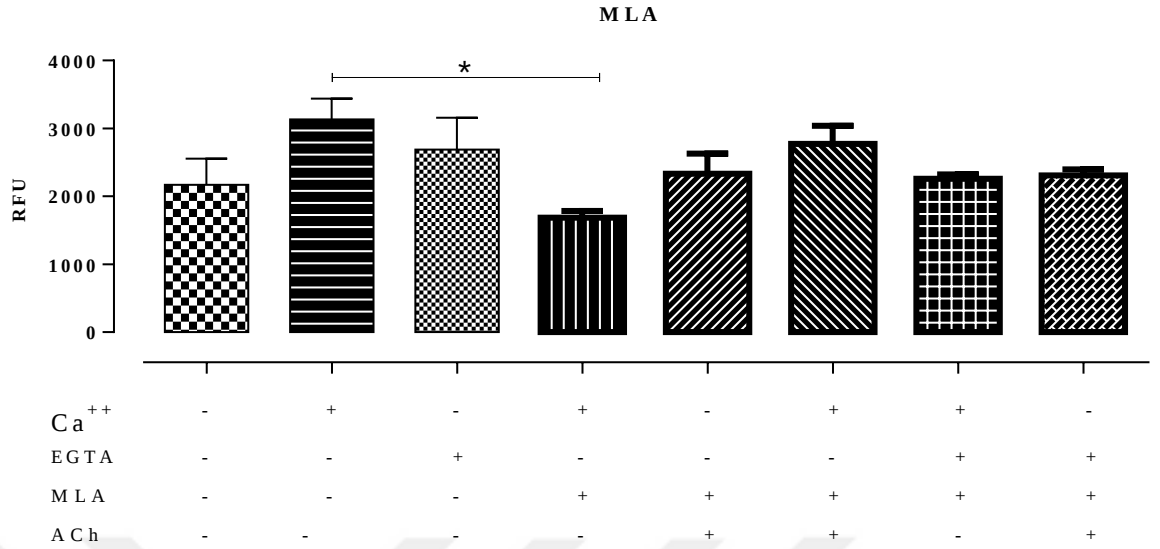
Hücre dışında 2 Nm/L Ca^{+2} varlığında yapılan yapılan deneyde kontrole göre Ca^{+2} akışında artış belirlendi. Ca^{+2} varlığında ACh çok az artışa sebep oldu. Ca^{+2} varlığında ACh ve MLA eklenen grupta hücre içi Ca^{+2} , anlamlı düzeyde inhibe oldu ($P<0081$).



Şekil 6.10. K562 hücrelerinde ACh varlığında Ca⁺⁺ akışı.

İlaçlar eklendikten sonra Ca⁺⁺ akışı ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar 4 deneyin ortalaması alınarak $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde gösterildi.

Ca⁺⁺+ACh'e göre Ca⁺⁺ ve MLA varlığında ACh eklenmesi hücre içi kalsiyumu azalttı. Ca⁺⁺ varlığında ACh ve EGTA eklenen grupta sadece Ca⁺⁺ olan gruba göre inhibisyon gözlemlendi.



Şekil 6.11. K562 hücrelerinde MLA varlığında Ca⁺⁺ akışı.

Ca⁺⁺ ve MLA varlığında ACh eklenmesi ACh+Ca⁺⁺ a göre hücre içi kalsiyumu azalttı. Ca⁺⁺ varlığında ACh ve EGTA eklenen grupta sadece Ca⁺⁺ olan gruba göre inhibisyon gözlemlendi.

Hücre dışı Ca⁺⁺ varlığında MLA eklenmesi hücre içi Ca⁺⁺ düzeyinin azalmasına neden oldu (P<0.001).

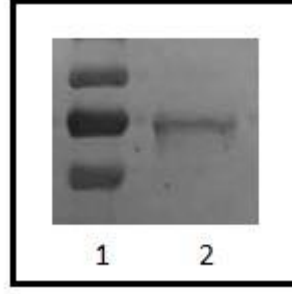
6.2. Western Blot Deneyi

K562 hücrelerinin nikotinik asetil kolin reseptörlerine özgü agonist ve antagonistlerinin $\alpha 7$ ekspresyonuna etkisini belirleyebilmek için western blot yöntemi kullanıldı. K562 hücreleri, %10 serum bulunan besiyerinde nikotinik asetil kolin reseptörlere özgü agonist, antagonistlerle 24 ve 48 saat muamele edildi. Hücreler büyütülerek deney için optimum şartları sağlayınca 15 dakika 1500g' de santrifüj edilerek ardından PBS ile yıkandı. Pelet deney için kullanılıncaya kadar -80 °C' da muhafaza edildi. Agonist ve antagonistlerle muamele edildikten sonra santrifüj edilerek muhafaza edilen hücrelerden protein lizatu hazırlandı ve elektroforez yapıldıktan sonra örneklerin nitroselüloz membranlara transferi yapıldı. Proteinlerin transfer edildiği bu membranlar 1:500 konsantrasyonunda nikotinik $\alpha 7$ reseptör antikoru ve 1:100 konsantrasyonunda β -aktin antikoru ile muamele edildi.

$\alpha 7$ reseptörlerinin western blot yöntemi ile analizi

6.2.1. K562 hücrelerinde nikotinik $\alpha 7$ reseptör ekspresyonu

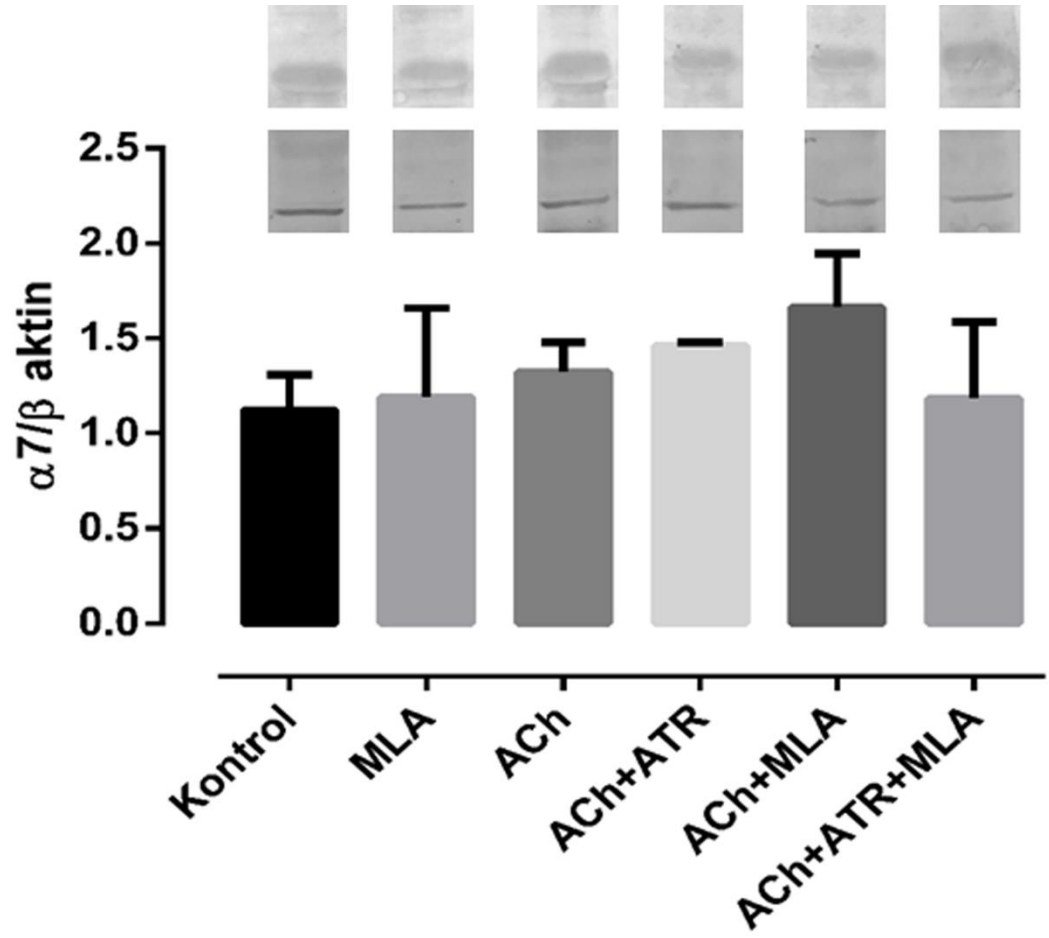
Western blot yöntemi uygulamasının ardından 1:500 oranında nikotinik $\alpha 7$ reseptör antikoru ile etkileştirilen membranlarda nikotinik $\alpha 7$ reseptör ekspresyonu (Resim 6.2.1.) de gösterildi.



Resim 6.2.1. K562 hücrelerinde nikotinik $\alpha 7$ reseptör ekspresyonu. 1- Markır, 2-K562 hücre

6.2.2. K562 hücrelerinde agonist ve antagonistlerin $\alpha 7$ nikotinik reseptör ekspresyonuna etkisi

Western blot yöntemi uygulamasının ardından 1:500 oranında nikotinik $\alpha 7$ reseptör antikoru ile 1:50 oranında seyreltilmiş β -aktin ile etkileştirilen membranlarda agonist ve antagonistlerin nikotinik $\alpha 7$ reseptör ekspresyonuna etkisi gösterildi. Membranlardan densitometrik analiz yapıldı. Sonuçlar β aktine göre düzenlendi (Şekil 6.12).



Şekil 6.12. K562 hücrelerinde bulunan nikotinik $\alpha 7$ asetil kolin reseptör ekspresyonu, Western emdirimi ve densitometrik analize göre çizilen grafik. Sonuçlar 3 deneyin ortalaması alınarak $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde gösterildi ($P > 0.05$).

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

1978 yılına kadar farklı araştırmacılar tarafından asetilkolin insanda farklı tipte hücrelerde bulunmuştur (Sastry ve Sadavongvivad, 1978). Asetil kolin öncelikle nörobilim çalışmalarında kullanılıyorken farklı hücrelerde belirlenmesi bu zinciri kırmıştır (Wessler ve Kirkpatrick, 2008). Farklı kanser hücrelerinde ACh'nın varlığı ve hücre çoğalmasındaki etkisi belirlenmesine rağmen mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Asetilkolin (ACh), merkezi ve periferik sinir sisteminde etkili olan hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan klasik bir nörotransmitter olarak kabul edilir (Grando, 1997; Wessler ve ark., 1999; Kawashima ve Fujii, 2000). Nikotin, bir agonist olarak nAChR'lerin α alt ünitesine bağlanarak asetilkolini taklit eder (Lindstrom J., 1996.).

nAChR'ler, bronşiyal epitel hücreleri, endotel hücreleri (EC'ler), keratinositler, immün hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve diğer doku tiplerinden hücreler dahil olmak üzere çeşitli nöronal olmayan hücrelerde gözlenmiştir. nAChR genleri cilt, pankreas ve akciğer gibi pek çok nöronal olmayan doku hücrelerinde de eksprese edilir, bu da nAChR'lerin sinaptik iletme ek olarak diğer biyolojik işlemlerde rolleri olabileceğini düşündürmektedir (Bierut, 2009). Nöronal olmayan hücrelerde bu reseptörlerin varlığı, nörotransmisyonun ötesinde farklı fonksiyonlara sahip olduklarını düşündürmektedir (Minna, 2003). ACh'nin nöronal olmayan hücrelerde bulunan nAChR'lerde muhtemel rolleri netleştirilmemiştir; proliferasyon, farklılaşma, göç, hücre iskeleti organizasyonu, hücre-hücre teması ve bağışıklık fonksiyonları gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rolleri olabileceği önerilmektedir (Wessler, 1998; Trombino, 2004; Wessler ve Kirkpatrick, 2008).

Normal sağlıklı hücrelerde nAChR'lerin ifadesi, hem nöronal hem de nöronal olmayan kanser hücrelerinde farklı nAChR alt tipleri ifade edilir. nAChR ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar kanser gelişimini ve çoğalmasını kolaylaştırır. nAChR'lerin, akciğer kanseri ($\alpha 7$ nAChR) ve meme kanseri ($\alpha 9$ nAChR) gibi çeşitli kanserlerde selektif olarak aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. nAChR'lerin, reseptör ekspresyonunda ve hücre büyümesinin homeostatik düzenlemesinin kaybına katkıda bulunan çeşitli reseptör alt tiplerinin sinyal yollarındaki değişiklikler yoluyla kanser hücrelerinin çoğalmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir. ACh sinyal iletilisinin tüm

işlevsel döngüsü, kanser hücrelerinin, nAChR'lerin otokrin aktivasyonu yoluyla proliferasyonu teşvik etmesini sağlar (Lau ve ark., 2013; Song ve ark., 2008).

Kanserdeki düşük sağkalım oranlarının, tümör hücresi proliferasyonunu, apoptozu (Schuller, 2009; Catassi ve ark., 2008), proinvazif ve anjiyogenik fenotipleri (Ng ve ark., 2007) ve epitel mezenkimal geçişini (EMT) etkileyen nAChR yolu aktivasyonundan etkilendiğine inanılmaktadır. (Dang ve ark., 2016)

ACh ve nikotinik reseptörlerin lösemi hücrelerindeki ilişkisini araştırmak üzere K562 hücre soyunda $\alpha 7$ nAChR ekspresyonu belirlendi. Ayrıca kolinerjik agonist ACh ve/veya kolinerjik antagonist ATR, nikotinik antagonist MLA'nın hücre çoğalması, hücre içi Ca^{+2} düzeyine ve $\alpha 7$ nAChR ekspresyonuna etkisi belirlendi. K562 hücrelerinde M_2 - M_4 muskarinik reseptör ekspresyonu ve ilgili sinyal yolları çalışılmıştır (Cabadak ve ark., 2013). Bu çalışmada ACh (10^{-7} - 10^{-4} M), MLA (10^{-7} - 10^{-5} M) ile hücre sayımları yapıldı. Kontrol ve ilaç uygulanan gruplar arasında farklılıklar belirlendi. Bu sonuçlar farklı kanser tiplerinde yapılan önceki çalışmalarla kısmen uyumludur (Song, 2008; Cheng K, 2008; Zhao 2011).

Bir araştırma grubu çalışmasında, önceki literatür bulgularına dayanarak, nAChR ekspresyonu üzerinde etkiye sahip bileşiklerin veya hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki (Ca^{+2}) değişiklik olasılığı nedeniyle 10 μ M ACh ve nikotin konsantrasyonu ile çalışmıştır. ACh veya nikotin muamelesinden sonraki sonuçlar, test edilen hücre tiplerinde nikotinik $\alpha 7$ reseptör ekspresyonunda çok az değişiklik olduğunu göstermektedir. Nikotinik $\alpha 7$ reseptör ekspresyonunda tutarlı bir değişiklik olmaması, 72 saatlik tedavi süresine atfedilebileceğini, ekspresyondaki değişiklikler, literatürde de önerildiği gibi tedavi döneminden daha önce gerçekleşmiş olabileceğini önermişlerdir. nAChR antagonistlerinin $\alpha 7$ nAChR ekspresyonunda azalmaya neden olabileceği tahmin edilmiştir. Bir merkezi iyon kanalını çevreleyen beş hetero veya homo pentamer alt biriminin oluşturduğu nikotinik reseptörler hücre zarında bulunur. Farklı nikotinik reseptör alt tipleri insan tümörlerinde, normal hücrelerde ve dokularda bulunmaktadır (Schuller, 2009). Bununla birlikte, farklı klasik nikotinik reseptörlerin morfolojik yapısı ve işlevi tam olarak bilinmemekte ve mekanizması hala araştırılmaktadır. Rahim ağzı kanseri hücre soylarındaki nikotinik reseptörlerinin dağılımı PCR ile gösterilmiştir, bu reseptörler $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 1$ ve $\alpha 4$, $\beta 2$, $\beta 4$, γ ve δ alt

birim mRNA'larının pozitif ve zayıf sinyalleri olduğu gösterilmiştir (Calleja- Macias ve ark., 2009). Tümör hücresi proliferasyonunun hızlanmasına neden olan nikotinik reseptörünün aktivasyonu, önemli sayıda yayında bildirilmiştir, ancak asetilkolinin tümörlerde rolü, sadece sınırlı sayıda kanserde gösterilmiştir (Song ve ark., 2008; Cheng ve ark., 2008; Zhao ve ark., 2011). Nikotinik reseptörlerin ACh ile aktivasyonu ve nikotin etkileri arasındaki fark hala tam olarak açıklanamamıştır (Kuiran Liu. ve ark., 2016).

Agonistin nAChR'ye bağlanması, β -arrestin ve tirozin kinaz Src arasında kompleks oluşumunu kolaylaştırır. Src aktivasyonunun, kanserde olduğu kadar, endotel hücre proliferasyonu ve *in vitro* anjiyogenik tüp oluşumu için de önemli olduğu bulunmuştur. nAChR aktivasyonunun proliferatif etkisi, β -adrenerjik reseptör (β AR) sinyalinin dolaylı olarak uyarılması ile de desteklenmiştir (Singh ve ark., 2011)

Nguyen ve ark nın sonuçları, difüz tipte Gastrik kanser hücrelerinde asetilkolinin hem tümörlerin sayısını hem de boyutunu arttırdığını ve bu etkinin hem muskarinik hem de nikotinik asetilkolin reseptörleri agonistleri ile arttığı ve her iki reseptör antagonisti tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir (Nguyen ve ark., 2018).

Akciğer kanserleri için Spindel (Arredondo ve ark., 2007.) tarafından ileri sürüldüğü gibi, ACh, tümörün kendisi veya komşu hava yolu epitel hücreleri veya sinir uçları tarafından salgılanabilir. Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada, sinir sistemi ile tümör gelişimi ve prostat kanserinin yayılması arasındaki bağlantıyı da kanıtlamıştır (Johnston-Early ve ark., 1980; Singh ve ark., 2011)

ACh ve kolinerjik yollar mide hastalıklarının ve özellikle de GC'nin (Gastrik kanserin) gelişimine katkıda bulunabilir. Aslında, *in vitro* olarak ACh'nin GC hücre çoğalmasını, istilasını ve göçünü doğrudan uyarabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, Zhao ve arkadaşları, mide vagal denervasyonunun, GC gelişimini ve farelerde M₃ reseptörüyle bastırılan tümör oluşumunun genetik nakavtını inhibe ettiğini gösterdi. Muskarinik yolların yanı sıra nikotinik yolların da dahil olabileceğini ve ek olarak, gastrik kanser kök hücreleri (CSC) fenotipi üzerindeki ACh etkisinin, en azından kısmen NO-bağımlı yolun aracılık edebileceğini göstermiştir. Bulgularından biri, ACh'nin yaygın tipteki GC hücrelerinde bir CSC fenotipini indükleyebilmesidir. İntestinal GC tipinde gözlenenlere benzer şekilde ACh'nin, aynı zamanda, tümörlerin

sayısını ve boyutunu arttırma kapasitesinin gösterdiği gibi, diffüz tipte GC hücrelerinin CSC fenotipini de desteklediğini göstermektedir. Bu etki, kısmen muskarinik reseptörlerin aktivasyonu ile gösterilmiştir, çünkü bethanechol ACh etkisini arttırıp atropini bloke etmiştir. Bununla birlikte, nikotinik reseptör aracılı yolların bu etkideki katkısı da gösterilmiştir (Nguyen ve ark., 2018).

Alfa7 nAChR'lerin K562 hücre çoğalması ve sinyal ileti yollarındaki etkisinin incelendiği bu çalışmada nikotinik agonist asetilkolinin (ACh) ve nikotinik antagonistlerin hücre çoğalmasına, nikotinik $\alpha 7$ reseptör ekspresyonuna ve hücre içi Ca düzeyine etkileri belirlendi. K562 hücreleri 24 saat serumsuz kültür ortamında inkübe edildi. Nikotinik agonist ACh'nin farklı konsantrasyonları ile hücreler muamele edildi. Farklı konsantrasyonlarda ki ACh'lerin hücre çoğalmasını farklı etkilediği ancak her konsantrasyonda hücre çoğalmasını indüklediği belirlendi. 0,1 μ M ACh ile muamele edilen hücrelerde % 32'lik artış gözlemlendi. Bu sonuç hücre çoğalmasında diğer konsantrasyonlara göre en etkin doz olarak bulundu.

Son çalışmalar, nAChR antagonistlerinin antikanser ilaçlar olarak kullanılabileceğini ima etmektedir. MLA ve α bungarotoksin gibi $\alpha 7$ nAChR inhibitörlerinin kanser gelişim sürecinde nikotinin proanjiyogenik etkileri tersine çevirdiği bulunmuştur (Heeschen ve ark., 2001; Heeschen ve ark., 2003; Heeschen ve ark., 2002; Dasgupta ve Chellappan, 2006). Russo ve arkadaşları, birkaç doğal bileşiğin, $\alpha 7$ nAChR ekspresyonunun inhibisyonu ile NSCLC hücre proliferasyonunu veya tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini gösterdi. Bu veriler, A549 hücreleri ile ortotopik olarak aşılınmış farelerde tümör büyümesinde önemli bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (canlı hücrelerin % 4.6'sı tedavi edilmemiş farelerde % 31'i). *In vitro* ve *in vivo* deneyler, spesifik $\alpha 7$ nAChR antagonistlerinin, hem kaspazlar 3, 9, 2, P53 ve Bad'ı aktive eden apoptoz protelerinin indüklenmesinde hem de PI3K, Akt, MAPK ve NF-MB yollarını aktive eden hayatta kalma sinyallerinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu veriler $\alpha 7$ nAChR hedefli kimyasalların antikanser ilaç gelişiminde ümit verici bir potansiyel oluşturduğunu göstermiştir. (Lee ve ark., 2011).

A549 ve H1975 hücrelerinin sigara içenlerin serumunda tespit edilen (10^{-8} - 10^{-7} M) aralığındaki nikotin konsantrasyonları ile tedavi edilmesi, A549'un çoğalmasına

neden oldu, ancak H1975 hücrelerinin çoğalmasını indüklemediği, böylece A549 hücrelerinde hücreye spesifik olarak nAChR'lerin nikotin kaynaklı etkilere dahil olduğunu gösterdi. $\alpha 7$ ve $\alpha 9$ reseptörlerine etki eden α -Bgtx toksin, MLA ve alt tipe spesifik $\alpha 7$ (AR) ve $\alpha 9$ (RgIA4) toksinlerinin tümü, A549 hücrelerinin nikotin ile indüklenen proliferasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir (Mucchietto ve ark., 2017). Otokrin mekanizma ile trombositlerin aktivasyonunda $\alpha 7$ nAChR kanallarının uyarılmasının etkin olabileceği önerilmiştir (Schedel ve ark., 2011).

Bu çalışmada K562 hücreleri farklı konsantrasyonlarda spesifik $\alpha 7$ antagonisti MLA ile muamele edildi. K562 hücrelerinin BrDU yöntemi kullanılarak sayımı sonrası 10 μ M MLA ile muamele edilen hücrelerin çoğalmasında % 32 inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir. Spesifik $\alpha 7$ antagonisti MLA'nın en yüksek konsantrasyonu olan 10 μ M, diğer konsantrasyonlara göre hücre çoğalmasını anlamlı bir şekilde bloke etti.

Agonist ve/veya antagonist varlığında hücre çoğalmasını belirlemek için yapılan deneylerde 24. Saat de 100 μ M ve 1 μ M ACh ile 10 μ M ATR muamele edildiğinde uyarıcı etki geri çevrildi. 24. saat de en etkili geri çevirmenin 1 μ M ACh'nin 10 μ M ATR muamelesi olduğu belirlendi. 24. saatde ACh'nin uyarıcı etkisi 0,5 μ M ve 1 μ M MLA ile geri çevrildi. En yüksek etki 1 μ M ACh ile 0,5 μ M MLA muamelesi ile % 50.4 olarak belirlendi. Kontrol grubuna göre 1 μ M ACh ve 1 μ M MLA hücre sayısında anlamlı artışa neden oldu. Bu etki muskarinik reseptörler aracılı olabilir. 48. saatde ise hem ATR hemde MLA'nın tek başına muamelesi hücre çoğalmasını geri çevrildi. 48.saatde ACh'nin uyarıcı etkisi 0,5 μ M ve 1 μ M MLA ile geri çevrildi. İnhibisyon etkisi sırasıyla % 29, % 30 olarak belirlendi.

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR'ler), kanser hücreleri de dahil olmak üzere tüm memeli hücrelerinin hücre zarında ifade edilen iyon kanallarıdır. $\alpha 7$ nAChR alt tipi, en yüksek kalsiyum geçirgenliği olan bir reseptördür. Bu reseptörün aktivasyonu, sitoplazmik kalsiyum seviyelerini yükseltebilir ve bir dizi kalsiyum bağımlı hücre içi kaskadı tetikleyebilir (Fucile, 2004). Kalsiyum iyonları önemli ikincil habercidir. Farklı araştırmalarda belirtildiği gibi nikotinik reseptörlerin aktivasyonu tümör hücre çoğalmasını hızlandırmaktadır, ancak kısıtlı sayıda tümörde ACh'nin rolü gösterilmiştir (Song, 2008; Cheng, 2008; Zhao, 2011). nAChR'ler ligand

kapılı katyon kanallarıdır ve farklı alt tiplerin kalsiyum iyonlarına farklı şekilde geçirgen olduğu bilinmektedir (Fayuk ve Yakel, 2007).

ACh'nin otokrin ve parakrin salgılanması keratinosit $\alpha 7$ nAChR'leri aktive ederek Ca^{+2} iyonlarının hücreye girişine neden olmuştur. Ca^{+2} nin hücre içine akışının sinyal iletimine etkisi, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve migrasyona neden olan integrinlerinin ekspresyonu gibi hücrel farklılaşmanın düzenlenmesiyle sonuçlandığı bildirilmiştir (Arredondo ve ark., 2002).

Conti-Fine ve arkadaşları, fonksiyonel nAChR'lerinin insan ve kemirgen bronş epitel hücrelerinde eksprese olduğunu göstermiştir (Maus AD, 1998; Wang Y, 2001). Grando ve arkadaşları, insan epidermal keratinositlerinde $\alpha 7$ nAChR'leri aracılığıyla kalsiyum akışının ve hücre farklılaşmasının uyarılmasına aracılık eden ACh'ni sentezlediğini, salgıladığını ve yıkımına neden olduğunu göstermiştir (Grando, 1996; Arredondo, 2002).

nAChR'lerin uyarılması, kanalları açar, sodyum ve/veya kalsiyum iyonlarının akışını indükler. Membran depolarizasyonunun bir sonucu olarak, voltajla çalışan kalsiyum kanalları açılır ve bu da ilave bir kalsiyum iyonu akışına yol açar. Kalsiyumun akışı, mitojenik faktörlerin salgılanmasına neden olur ve hücre sinyal ileti kaskadlarını aktive eder (Albuquerque ve ark., 2009).

Schedel ve arkadaşları, $\alpha 7$ nAChR kanallarının Ca^{+2} 'ye nanomolar aralıkta (50 ila 100 nmol/L) trombositlere katkısını ölçmüştür. $\alpha 7$ nAChR seçici agonist konsantrasyonu ile indüklenen oldukça küçük Ca^{+2} girişi, çok hızlı duyarlılığı olan ATP kapılı P2X1 kanalı için bildirilen Ca^{+2} girişine çok benzer bulunmuştur. (MacKenzie AB. ve ark., 1996) P2X1 kanalları için tipik olarak gözlenen Ca^{+2} girişi kısa sürede zirveye ulaşırken, aksine $\alpha 7$ nAChR kanalları için hücre içi Ca^{+2} 'nin oldukça yavaş ve sürekli artışa neden olduğu bulunmuştur. Bu, nöronal $\alpha 7$ nAChR kanallarının tipik davranışını yansıtmasa da, nöronal olmayan nAChR için karakteristik görünmektedir. (Schedel ve ark., 2011)

Malign tümörlerde nikotinik reseptörlerin yapıdan fonksiyona anlaşılması önemlidir. Lösemilerde yapılan çalışmalar ise kısıtlı sayıdadır. Bu çalışmada, K562 hücrelerin de hücre dışı Ca^{+2} yokluğunda yapılan deneylerde, 1 μ M konsantrasyonda

agonist ACh'nın zamana bağılı olarak hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu indüklediği belirlendi. 10 μM ve 100 μM konsantrasyonlarında ki ACh muamelesi, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda değişikliğe neden olmadı. 10 μM ve 100 μM konsantrasyonlarında ACh ilavesi hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu üzerine hiçbir etkisinin olmaması hücre içine Ca^{+2} girişinin kolinerjik reseptörler üzerinden gerçekleştiğini işaret edebilir. K562 hücrelerinin hücre dışı Ca^{+2} yokluğunda yapılan deneylerde, 0,5 μM , 1 μM , 10 μM MLA ile muamele edilmiştir. Bütün dozların 5. saniyede kontrole göre hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda inhibisyona sebep olduğu belirlendi.

Schedel ve arkadaşlarının çalışmasında, 1 $\mu mol / L$ PNU ilavesiyle bazal Ca^{+2} girişinin belirgin şekilde artması sağlanmıştır. Bu etki, $\alpha 7$ nAChR seçici antagonisti αBGT (20 $nmol / L$) tarafından belirgin şekilde yok edilmiştir. αBGT inhibisyonu, bazal Ca^{+2} girişini etkileme eğilimindedir, ancak önemli miktarda değildir. Hücre dışı Ca^{+2} olmadan, PNU veya αBGT 'nin, trombositlerdeki hücre içi Ca^{+2} seviyeleri üzerinde bir etkisi olmamıştır. Schedel ve arkadaşlarının çalışmasında, stabil ACh analog CCh (1 ila 100 $umol / L$) ve $\alpha 7$ nAChR seçici agonisti PNU'nun (0.1 ila 10 $umol / L$) istirahat trombosit aktivasyonu ve trombosit degranülasyonu üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır (Anfossi ve Trovati 1996; Graham ve ark., 2004; Morrell ve ark., 2008; Schedel ve ark., 2008).

Benzer şekilde bu çalışmada, K562 hücrelerinin hücre dışı Ca^{+2} yokluğunda, 1 μM ACh konsantrasyonu hariç diğer ACh konsantrasyonları veya MLA'nın, hücre içi Ca^{+2} seviyeleri üzerinde bir etkisi olmadı. Ancak hücre dışında 2 Nm/L Ca^{+2} varlığında yapılan deneyde kontrole göre Ca^{+2} akışında artış belirlendi. Ca^{+2} varlığında ACh çok az artışa sebep oldu. Hücre dışı Ca^{+2} varlığında MLA eklenmesi hücre içi Ca^{+2} 'u inhibe etti. Ca^{+2} varlığında ACh ve EGTA'nın birlikte muamelesi EGTA'nın Ca^{+2} bağlama özelliği sebebiyle ACh'nın etkisini sadece Ca^{+2} olan gruba göre geri çevirmiştir. $Ca^{+2} + ACh$ 'a göre Ca^{+2} varlığında MLA ve ACh eklenmesi hücre içi kalsiyum miktarını azalttı.

İnsan kanseri türleri üzerindeki nAChR aracılı onkogenik etkilerin moleküler mekanizmaları hakkında yeni bilgiler sağlar. nAChR'lerin kanser patogenezinde önemli rollere sahip olduğu açıktır. (Dang ve ark., 2016)

Sonuç olarak nikotinik reseptör agonisti ACh'nın tüm konsantrasyonları K562 hücre çoğalmasını indükledi. Asetilkolin hem muskanik hemde nikotinik reseptörleri indükleyen bir agonisttir. Cabadak ve arkadaşları tarafından, K562 hücre çoğalmasına muskanik reseptörlerin etkisi gösterilmiştir (Cabadak, 2015; Aydın, 2019). Asetilkolinin K562 hücre çoğalmasındaki uyarıcı etkisi hem $\alpha 7$ nikotinik antagonisti MLA hem de kolinerjik antagonist, ATR ile geri çevirilmiştir. Hücre çoğalmasındaki bu etkinin hem muskarinik hem de nikotinik asetilkolin reseptörler antagonistleri tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin spesifik antagonisti MLA'nın, K562 hücre çoğalmasını inhibe etmesi nikotinik reseptörlerin sinyal iletimindeki rollerini kısmen açıklamaktadır. Bu çalışmada kullanılan agonist ve antagonistlerin hücre içi kalsiyum düzeyine etkisi incelendiğinde, ACh hücre içi Ca^{2+} da artışa neden olurken, MLA bu etkiyi geri çevirmiştir.

Keratinositler, fibroblastlar, T hücreleri, B hücreleri, akciğer hücreleri ve makrofajlar $\alpha 7$ nAChR'yi eksprese edebilir. Bu nedenle, hem otokrin hem de parakrin yöntemlerle, nöronal olmayan asetilkolin, lokalize bağışıklık tepkisini modüle ettiği hipotezi öne sürülmektedir. (Zoheir ve ark., 2012).

Oral prekanseröz hücre hattı DOK hücrelerinde nikotin, kontrol hücrelerine göre Prx1, $\alpha 3$ nAChR ve $\alpha 7$ nAChR'nin mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı belirtilmiştir. (Wang ve ark., 2017).

ACh'nin oral epitel hücrelerinin immün tepkisini düzenlemedeki rolünün doğrudan bir kanıtı yoktur. Bununla birlikte, ACh'nin ($\alpha 7$ nAChR yoluyla), diğer çeşitli hücrelerin immün tepkisini modüle etmede rol oynadığı gösterilmiştir. Kistik fibroz hastalarının hava yolu epitel hücrelerinde $\alpha 7$ nAChR'nin aktivasyonunun, Toll benzeri reseptör 2 (TLR-2) aracılı IL-8 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Greene CM. ve ark., 2010). Ek olarak, $\alpha 7$ nAChR'nin aktivasyonunun, insan kolon epitel hücrelerinde TNF- α ile indüklenmiş IL-8 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterildi (Summers AE. ve ark., 2003) ve nikotin, ayrıca NF κ B'yi etkileyen $\alpha 7$ nAChR yoluyla HBE16 hava yolu epitel hücrelerinde TNF α ekspresyonunu azalttığı da gösterildi (Li ve ark., 2011). Hem oral keratinositlerin hem de fibroblastların $\alpha 7$ nAChR'yi eksprese ettiği gösterilmiş olduğundan, bu hücre tiplerinde benzer bir

immünomodulator fenomenin meydana geldiği varsayılmaktadır (Zohei ve ark., 2012).

Bu çalışmada, K562 hücre hattı hücrelerinde ACh'nin, kontrol hücresi ile karşılaştırıldığında $\alpha 7$ nAChR'in ekspresyonunda değişikliğe neden olduğu gözlenmiştir.

Bu sonuçlar, farklı kanser tiplerinde yapılan önceki çalışmalarla kısmen uyumludur. Lösemi hücresi olan K562 hücre soyunda elde edilen sonuçların yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ve literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



8. KAYNAKLAR

Adamopoulos, P. Van De Borne, and J. F. Argacha. (2008). “New insights into the sympathetic, endothelial and coronary effects of nicotine,” *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 35, no. 4, pp. 458–463.

Albuquerque EX., Pereira EF, Alkondon M and Rogers SW. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* 89: 73-120.

Al-Wadei HA, Plummer HK III and Schuller HM. (2009). Nicotine stimulates pancreatic cancer xenografts by systemic increase in stress neurotransmitters and suppression of the inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid. *Carcinogenesis* 30: 506-511.

Al-Wadei MH., Al-Wadei HA and Schuller HM. (2012) Effects of chronic nicotine on the autocrine regulation of pancreatic cancer cells and pancreatic duct epithelial cells by stimulatory and inhibitory neurotransmitters. *Carcinogenesis* 33: 1745-1753.

Al-Wadei MH., Al-Wadei HA and Schuller HM. (2012). Pancreatic cancer cells and normal pancreatic duct epithelial cells express an autocrine catecholamine loop that is activated by nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 3$, $\alpha 5$, and $\alpha 7$. *Mol Cancer Res* 10: 239-249.

Al-Wadei HA., Al-Wadei MH, Masi T, Schuller HM. (2010). Chronic exposure to estrogen and the tobacco carcinogen NNK cooperatively modulates nicotinic receptors in small airway epithelial cells. *Lung Cancer* 2010;69:33-9.

Al-Wadei HA., Al-Wadei MH, Schuller HM. (2012). Cooperative regulation of non-small cell lung carcinoma by nicotinic and beta-adrenergic receptors: a novel target for intervention. *PLoS One* 2012;7:e29915.

Al-Wadei MH., Al-Wadei HA, Schuller HM. (2012). Pancreatic cancer cells and normal pancreatic duct epithelial cells express an autocrine catecholamine loop

that is activated by nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 3$, $\alpha 5$, and $\alpha 7$. *Mol Cancer Res* (2012);10:239-49.

Andersson LC., Jokinen M, Gahmberg CG. (1979). Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562. *Nature*, 278: 364-365.

Anfossi G., Trovati M. Role of catecholamines in platelet function: pathophysiological and clinical significance. *Eur J Clin Inv.* (1996);26:353–370.

Arias H. R. and Blanton M. P., “ α -Conotoxins,” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 32, no. 10, pp. 1017–1028, (2000).

Armitage AK., Turner DM. Absorption of nicotine in cigarette and cigar smoke through the oral mucosa. *Nature*. (1970);226:1231–2.

Arredondo J., Chernyavsky A. I., and Grando S. A. (2007) “SLURP1 and -2 in normal, immortalized and malignant oral keratinocytes,” *Life Sciences*, vol. 80, no. 24-25, pp. 2243– 2247.

Arredondo J., Chernyavsky A.I., and Grando S.A. (2006) “Nicotinic receptors mediate tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamines on immortalized oral epithelial cells,” *Cancer Biology and Therapy*, vol. 5, no. 5, pp. 511–517.

Arredondo J., Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE and Grando SA. (2006) : Receptor-mediated tobacco toxicity: Cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of $\alpha 7$ nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J* 20: 2093-2101.

Arredondo J., et al. Central role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. *J. Cell. Biol.* (2002);159:325–336.

Arredondo J., Nguyen VT., Chernyavsky AI., Bercovich D., Orr-Urtreger A., Kummer W., et al. (2002). Central role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. *J Cell Biol* 159(2): 325-336.

Avogaro and Fadini G. P. (2006) "The janus face of nicotinic angiogenesis," Journal of the American College of Cardiology, vol. 48, no. 12, pp. 2561–2563.

Aydın B., Cabadak H., Kan B. (2013). The role of intracellular pathways in the proliferation of human K562 cells mediated by muscarinic receptors. Leukemia Research. Cilt 37. sf 1144-1149.

Aydın B., Tulunay A., Ekşioğlu-Demiralp E., Kan B., Cabadak H. (2019). Effects of carbachol on apoptosis in human chronic myelogenous leukemic K562 cell line. Marmara Medical Journal, 32 (1), 38-43. DOI: 10.5472/marumj.518983

Baccarani M., Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. (2006);108:1809-1820.

Barik J., Wonnacott S. Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. Handb Exp Pharmacol (2009); 192: 173-207.

Bennett JH., Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. Edinb Med Surg J. (1845);64:413- 423.

Berridge MJ., Bootman MD, Lipp P. (1998). Calcium a life and death signal. Nature 395, 645–648. (10.1038/27094.

Bierut LJ. (2009) Nicotine dependence and genetic variation in the nicotinic receptors. Drug Alcohol Depend 104 (Suppl 1): S64-S69.

Bierut LJ., Nicotine dependence and genetic variation in the nicotinic receptors. Drug Alcohol Depend. (2009); 104 (Suppl1): S64–S69. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2009.06.003.

Bodding M., Flockerzi V., Ca²⁺ dependence of the Ca²⁺-selective TRPV6 channel, J Biol Chem, 279 (2004), pp. 36546-36552.

Bose C, Zhang H, Udupa KB and Chowdhury P (2005): Activation of p-ERK1/2 by nicotine in pancreatic tumor cell line AR42J: Effects on proliferation and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G926-G934.

Cabadak H., Aydın B, Kan B., (2015). K562 hücrelerinde muskarinik agonist, antagonist ve sinyal ileti yolağı inhibitörleri c-Fos ve siklin D1 ekspresyonlarını değiştirir. *Marmara Medical Journal*, 26 (2), 72-76. DOI: 10.5472/MMJ.2013.02807.1

Calabretta B., Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood*. (2004) ;103:4010-4022.

Calleja-Macias IE., Kalantari M and Bernard HU. Cholinergic signaling through nicotinic acetylcholine receptors stimulates the proliferation of cervical cancer cells: an explanation for the molecular role of tobacco smoking in cervical carcinogenesis? *Int J Cancer* (2009); 124: 1090-1096.

Cardinale A., Nastrucci C, Cesario A, Russo P. Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. *Crit Rev Toxicol* (2012); 42: 68-89.

Catassi A., Servent D, Paleari L, Cesario A and Russo P (2008): Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: Implications on lung carcinogenesis. *Mutat Res* 659: 221-231.

Catassi A., Servent D., Paleari L., Cesario A., Russo P., Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: Implications on lung carcinogenesis. *Mutat Res*. (2008);659:221–231. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.04.002.

Cattaneo MG., Codignola A, Vicentini LM, Clementi F, Sher E. Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. *Cancer Res* (1993) 53:5566–8.

Caulfield MP., Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* (1998); 50: 279-290.

Changeux J., Edelstein SJ. Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol* (2001);11:369–77.

Changeux JP., Kasai M, Lee CY. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* (1970);67:1241–7.

Chen C. S., Lee C. H., Hsieh C. D. (2010) et al., “Nicotine-induced human breast cancer cell proliferation attenuated by g Garcinol through down-regulation of the nicotinic receptor and cyclin D3 proteins,” *Breast Cancer Research and Treatment*, pp. 1– 15.

Chen WY., Huang CY, Cheng WL, Hung CS, Huang MT, Tai CJ, Liu YN, Chen CL and Chang YJ (2015): Alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor mediates the sensitivity of gastric cancer cells to 5-fluorouracil. *Tumour Biol* 36: 9537-9544.

Chen YF., Chiu WT, Chen YT, Lin PY, Huang HJ, Chou CY, Chang HC, Tang MJ, Shen MR. (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signalling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 15 225–15 230. (10.1073/pnas.1017998108)

Cheng K., Samimi R, Xie G, Shant J, Drachenberg C, Wade M, Davis RJ, Nomikos G and Raufman JP. Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2008); 295: G591-597.

Chowdhury P. and Walker A (2008): A cell-based approach to study changes in the pancreas following nicotine exposure in an animal model of injury. *Langenbecks Arch Surg* 393: 547-555.

Chu M., Guo J, Chen CY. Long-term exposure to nicotine, via Ras pathway, induces Cyclin D1 to stimulate G1 cell cycle transition. *J Biol Chem* (2005) 280:6369–79. doi:10.1074/jbc.M408947200.

Chu M., Guo J., and Chen C. Y., (2005) “Long-term exposure to nicotine, via Ras pathway, induces cyclin D1 to stimulate G cell cycle transition,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 8, pp. 6369–6379.

Clapham D.E., Calcium signaling. *Cell*. (2007); 131(6):1047-58; PMID: 18083096; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>

Conklin S., Zhao W., Zhong D. S., and Chen C. (2002) “Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells,” *American Journal of Pathology*, vol. 160, no. 2, pp. 413–418.

Conti-Fine B.M., et al. (2000) Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur. J. Pharmacol.* 393, 279–294.

Cooke J. P. and Bitterman H., “Nicotine and angiogenesis: a new paradigm for tobacco-related diseases,” *Annals of Medicine*, vol. 36, no. 1, pp. 33–40, 2004.

Cooke J.P., (2007): “Angiogenesis and the role of the endothelial nicotinic acetylcholine receptor,” *Life Sciences*, vol. 80, no. 24, pp. 2347–2351.

Cooke J.P., Ghebremariam Y.T., *J Pharmacol Exp Ther* 293: 973-981., (2008): Endothelial Nicotinic Acetylcholine Receptors and Angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 18: 247-253.

Cooper E., Couturier S., Ballivet M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature*. (1991); 350(6315):235–238. doi: 10.1038/350235a0.

Cunningham J. M., Lennon V. A., Lambert E. H., and Scheithauer B. (1985) “Acetylcholine receptors in small cell carcinomas,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 45, no. 1, pp. 159–167.

Daley G.Q., Van Etten R.A., Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* (1990) ;247:824-30.

Damaj M. I., Glassco W., Aceto M. D., and Martin B. R. (1999) "Antinociceptive and pharmacological effects of metanicotine, a selective nicotinic agonist," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 291, no. 1, pp. 390–398.

Dang N., Meng X., & Song H. (2016). Nicotinic acetylcholine receptors and cancer (Review) . *BIOMEDICAL REPORTS* 4, 515-518. DOI: 10.3892/br.2016.625.

Dani JA., (2015). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *International review of neurobiology*, 124, 3-19.

Dani JA., Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2007) ;47:699–729.

Dasgupta P. and Chellappan S. P. (2006) "Nicotine-mediated cell proliferation and angiogenesis: new twists to an old story," *Cell Cycle*, vol. 5, no. 20, pp. 2324–2328.

Dasgupta P., Chellappan SP. Nicotine-mediated cell proliferation and angiogenesis: new twists to an old story. *Cell Cycle* (2006); 5:2324–8.

Dasgupta P., et al. (2006) Nicotine induces cell proliferation by b-arrestin-mediated activation of Src and Rb–Raf-1 pathways. *J. Clin. Invest.* 116, 2208–2217.

Dasgupta P., Kinkade R, Joshi B, Decook C, Haura E, Chellappan S: Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating xiap and survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006);103:6332-6337.

Dasgupta P., Rizwani W, Pillai S, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, et al. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* (2009) 124:36–45. doi:10.1002/ijc.23894.

Davis TJ., de Fiebre CM (2006): Alcohol's actions on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Alcohol Res Health* 29: 179-185.

De Jonge WJ., Ulloa L (2007): The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* 151: 915-929.

De Jonge WJ., van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE: Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the JAK2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* (2005) ;6:844-851.

Decker M. W., Anderson D. J., Brioni J. D. (1995) et al., "Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors," *European Journal of Pharmacology*, vol.280, no. 1, pp. 79–89.

Dempsey D., Tutka P, Jacob P, 3rd, Allen F, Schoedel K, Tyndale RF, et al. Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clin Pharmacol Ther.* (2004);76:64–72.

Egleton R., Brown, K., & Dasgupta, P. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: Multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Cell Press*, 29, 3rd ser., 151-158. doi:10.1016/j.tips.2007.12.006.

Egleton RD., Brown KC, Dasgupta P. Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* (2008); 29: 151-158.

Egleton RD., Brown KC. and Dasgupta Piyali, 2008. Tsien R.Y., A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells, *Nature*, 290 (1981), pp. 527-528.

Fayuk D., Yakel JL., Dendritic Ca^{2+} signalling due to activation of $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. *J Physiol* (2007);582:597–611.

Fenster C.P., Rains M.F., Noerager B., Quick M.W., Lester R.A. Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J. Neurosci.* (1997);17(15):5747–5759.

Fucile S., Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* (2004);35:1–8.

Furuta A., Tanaka M., Omata W., Nagasawa M., Kojima I., Shibata H., Microtubule disruption with BAPTA and dimethyl BAPTA by a calcium chelation-independent mechanism in 3T 3-L1 adipocytes *Endocr J*, 56 (2009), pp. 235-243.

Gotti C. and Clementi, F. (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog. Neurobiol.* 74, 363–396.

Gotti C., Clementi F Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* (2004); 74:363-396.

Gotti C., Clementi F: Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* (2004), 74:363-396.

Gotti C., Fornasari D., and Clementi F. (1997) “Human neuronal nicotinic receptors,” *Progress in Neurobiology*, vol. 53, no. 2, pp. 199–237.

Govind AP., Vezina P, Green WN. Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochem Pharmacol* (2009); 78: 756-765.

Graham GJ., Stevens JM, Page NM, Grant AD, Brian SD, Lowry PJ, Gibbins JM. Tachykinins regulate the function of platelets. *Blood.* (2004); 104:1058–1065.

Grando S.A., Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 2 (1) (1997), pp. 41-48.

Grando SA., et al. Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J. Invest. Dermatol.* (1996);107:412–418.

Greene CM., Ramsay H., Wells RJ., O'Neill SJ, McElvaney NG. Inhibition of Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 production in Cystic Fibrosis airway epithelial cells via the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor. *Mediators Inflamm.* (2010);2010:423241.

Hassall CJ., Stanford SC, Burnstock G, Buckley NJ. Coexpression of four muscarinic receptor genes by the intrinsic neurons of the rat and guinea pig heart. *Neuroscience* (1993); 56: 1041-1048.

Heeschen C., et al. (2002) A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Clin. Invest.* 110, 527–536

Heeschen C., Jang J. J., Weis M. (2001) et al., “Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis,”*Nature Medicine*, vol. 7, no. 7, pp. 833–839, 2001.

Heeschen C., Jang J. J., Weis M. (2001) et al., “Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis,”*Nature Medicine*, vol. 7, no. 7, pp. 833–839.

Heeschen C., Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP. A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Clin Invest* (2002);110:527–36.

Heeschen C., Weis M, Cooke JP. Nicotine promotes arteriogenesis. *J Am Coll Cardiol* (2003);41:489–96.

Heeschen C., Weis M., Aicher A., Dimmeler S., and Cooke J. P. (2002) “A novel angiogenic pathway mediated by nonneuronal nicotinic acetylcholine receptors,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, no. 4, pp. 527–536.

Heeschen C., Weis M., Aicher A., Dimmeler S., and Cooke J. P. (2002) “A novel angiogenic pathway mediated by nonneuronal nicotinic acetylcholine receptors,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, no. 4, pp. 527–536.

Heeschen C., Weis M., and Cooke J. P. (2003) “Nicotine promotes arteriogenesis,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 41, no. 3, pp. 489–496.

Heisterkamp N., Jenster G., ten Hoeve J., Zovich D., Pattengale PK., Groffen J. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* (1990);344: 251-3.

Hermann PC., Sancho P., Cañamero M., Martinelli P., Madriles F., Michl P., Gress T., de Pascual R, Gandia L and Guerra C (2014): Nicotine promotes initiation and progression of KRAS-induced pancreatic cancer via Gata6-dependent dedifferentiation of acinar cells in mice. *Gastroenterology* 147: 1119-1133.e4.

Heusch WL. and Maneckjee R. (1998): Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis* 19: 551-556.

Improgo MR., Soll LG., Tapper AR., et al. (2013): Nicotinic acetylcholine receptors mediate lung cancer growth. *Front Physiol* 4: 251.

Ishii M., Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des* (2006);12:3573–81.

Ito K, Bernardi R, Morotti A, et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature*. (2008);453:1072-1078.

Johnston-Early A., Cohen M. H., and Minna J. D. (1980) “Smoking abstinence and small cell lung cancer survival. An association,” *Journal of the American Medical Association*, vol. 244, no. 19, pp. 2175–2179.

Kalantari-Dehaghi M., Parnell EA., Armand T., Bernard HU. and Grando SA. (2015). The nicotinic acetylcholine receptor-mediated reciprocal effects of the tobacco nitrosamine NNK and SLURP-1 on human mammary epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 29: 99-104.

Katz A., Wu D., Simon MI., Subunits is $\beta\gamma$ of heterotrimeric G protein activate b2 isoform of phospholipase C. *Nature* (1992); 360: 686-689.

Kawashima K., Fujii T., Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes *Pharmacol. Ther.*, 86 (1) (2000), pp. 29-48.

Kawashima K., Yoshikawa K., Fujii YX, et al. (2007): Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci* 80: 2314-2319.

Kelliher MA., McLaughlin J, Witte ON, Rosenberg N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990); 87:6649-53.

Koeffler HP., Golde DW. (1980). Human myeloid leukemia cell lines: A review. *Blood*, 56: 344-349.

Kruse AC., Hu J, Pan AC, et al. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* (2012); 482: 552-556.

Lau JK. Brown KC., Thornhill BA., Crabtree CM., Dom AM., Witte TR, et al. (2013). Inhibition of cholinergic signaling causes apoptosis in human bronchioalveolar carcinoma. *Cancer Res* 73(4): 1328-1339.

Lazar M., Sullivan J., Chipitsyna G., Gong Q, Ng CY, Salem AF, Aziz T, Witkiewicz A, Denhardt DT, Yeo CJ (2010) et al: Involvement of osteopontin in the matrix-degrading and proangiogenic changes mediated by nicotine in pancreatic cancer cells. *J Gastrointest Surg* 14: 1566-1577.

Le Novère N., Corringer PJ., Changeux JP., The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* (2002); 53: 447-456.

Lee C., Wu C., Ho Y., (2011). From Smoking to Cancers: Novel Targets to Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Oncology*, 2011. doi:10.1155/2011/693424.

Lee C.H., Huang C.S., Chenetal C.S. (2010) “Overexpressionand activation of the alpha9-nicotinic receptor during tumorigenesisin humanbreast epithelial cells,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 102, pp. 1322–1335.

Lee H., Chang Y. C., Chen C. S. (2011) et al., “Crosstalk between nicotine and estrogen-induced estrogen receptor activation induces alpha9-nicotinic acetylcholine receptor expression in human breast cancer cells,” *Breast Cancer Research and Treatment*. In press.

Li Q., Zhou XD, Kolosov VP, Perelman JM. Nicotine reduces TNF-alpha expression through a alpha7 nAChR/MyD88/NF-kB pathway in HBE16 airway epithelial cells. *Cell Physiol Biochem*. (2011);27:605–12.

Lindstrom J. (1996) “Neuronal nicotinic acetylcholine receptors,” *Ion Channels*, vol. 4, pp. 377–450.

Lindstrom J. (1996) “Neuronal nicotinic acetylcholine receptors,” *Ion Channels*, vol. 4, pp. 377–450.

Liu K., Liu Y., Yu Y., Feng T., Zhang S., Identification of acetylcholine-related enzymes and the role of acetylcholine and nicotine in human cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol* (2016); 9(4):4854-4861.

Lowry H., Bessey A., *J. Biol. Chem.*, 183, 633 (1946).

Lozzio CB., Lozzio BB. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3): 321-334.

Lozzio CB., Lozzio BB. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 45(3): 321-334.

Luetje CW., Wada K, Rogers S, Abramson SN, Tsuji K, Heinemann S, et al. Neurotoxins distinguish between different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations. *J Neurochem* (1990); 55: 632–40.

Luetje W., Wada K., Rogers S. (1990) et al., “Neurotoxins distinguish between different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 55, no. 2, pp. 632–640.

MacKenzie AB., Mahaut-Smith MP, Sage SO. Activation of receptoroperated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *J Biol Chem*. (1996); 271:2879–2881.

Maneckjee R., Minna J. D. (1990). “Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 9, pp. 3294–3298.

Maus AD., et al. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* (1998); 54:779–788.

McCormack J.G., and Cobbold P.H., *Cellular Calcium, A Practical Approach*, (1991) eds. IRL Press at Oxford Press, New York, New York

McIntosh J. M., Santos A. D., and Olivera B. M. (1999). “Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 68, pp. 59–88.

Mikoshiba K., IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J. Neurochem* (2007); 102: 1426-1446.

Minna JD., Nicotine exposure and bronchial epithelial cell nicotinic acetylcholine receptor expression in the pathogenesis of lung cancer. *J Clin Invest* (2003); 111:31–3.

Momi N., Ponnusamy MP., Kaur S., Rachagani S., Kunigal SS, Chellappan S, Ouellette MM and Batra SK (2013): Nicotine/cigarette smoke promotes metastasis of pancreatic cancer through $\alpha 7$ nAChR-mediated MUC4 upregulation. *Oncogene* 32: 1384-1395.

Morrell CN., Sun H, Ikeda M, Beique JC, Swaim AM, Mason E, Martin TV, Thompson LE, Gozen O, Ampagoomian D, Sprengel R, Rothstein J, Faraday N, Hugarir R, Lowenstein CJ. Glutamate mediates platelet activation through the AMPA receptor. *J Exp Med.* (2008); 205:575–584.

Mucchietto V., Fasoli F., Pucci S., Moretti M., Benfante R., Maroli A., Gotti C., (2017). *British Journal of Pharmacology*.doi:10.1111/bph.13954.

Mucchietto V., Fasoli F., Pucci S., Moretti M., Benfante R., Maroli A., Di Lascio S., Bolchi C, Pallavicini M, Dowell C, McIntosh M, Clementi F, Gotti C. *Br J Pharmacol.* (2018) Jun;175(11):1957-1972. doi: 10.1111/bph.13954. Epub 2017 Sep 8.

Nai Q., McIntosh J.M., Margiotta J.F. Relating neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes defined by subunit composition and channel function. *Mol. Pharmacol.* (2003); 63(2):311–324. doi: 10.1124/mol.63.2.311.

Nakayama H., Numakawa T. and Ikeuchi T (2002): Nicotine-induced phosphorylation of Akt through epidermal growth factor receptor and Src in PC12h cells. *J Neurochem* 83: 1372-1379.

Ng J., 2018, E. Chang (2007) et al. “A central role for nicotinic cholinergic regulation of growth factor-induced endothelial cell migration,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 27, no. 1, pp. 106–112.

Ng MK., Wu J, Chang E, Wang BY, Katzenberg-Clark R, Ishii-Watabe A and Cooke JP (2007): A central role for nicotinic cholinergic regulation of growth factor-induced endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 106-112.

Ng MK., Wu J., Chang E., Wang BY., Katzenberg-Clark R., Ishii-Watabe A., Cooke JP., A central role for nicotinic cholinergic regulation of growth factor-induced endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2007); 27:106–112. doi: 10.1161/01.ATV.0000251517.98396.4a.

Nguyen PH., Touchefeu Y., Durand T., Aubert P., Duchalais E., des Varannes SB., Varon C., Neunlist M. and Matysiak-Budnik T., Acetylcholine induces stem cell properties of gastric cancer cells of diffuse type. *Tumor Biology* September (2018): 1–9

Niu XM. and Lu S. (2014). Acetylcholine receptor pathway in lung cancer: New twists to an old story. *World J Clin Oncol* 5: 667-676.

O'Dwyer ME., La Rosee P., Nimmanapalli R., Bhalla KN., Druker BJ., Recent advances in Philadelphia chromosome-positive malignancies: the potential role of arsenic trioxide. *Semin Hematol.* (2002); 39:18-21.

O'Leary K., Parameswaran N., McIntosh JM., Quik M., Cotinine selectively activates a subpopulation of $\alpha 3/\alpha 6\beta 2^*$ nicotinic receptors in monkey striatum. *J Pharmacol Exp Ther* (2008) 325:646–54. doi:10.1124/jpet.108.136838.

Paleari L., Catassi A, Ciarlo M, Cavalieri Z, Bruzzo C, Servent D, Cesario A, Chessa L, Cilli M, Piccardi F (2008) et al: Role of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor in human non-small cell lung cancer proliferation. *Cell Prolif* 41: 936-959.

Paleari L., Cesario A, Fini M, Russo P. $\alpha 7$ -Nicotinic receptor antagonists at the beginning of a clinical era for NSCLC and Mesothelioma? *Drug Discov Today* (2009); 14: 822-836.

Paterson D., Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* (2000), 61(1):75-111 2.

Perrier E. , Perrier R. , Richard S. , Benitah J.P. Ca^{2+} controls functional expression of the cardiac K^+ transient outward current via the calcineurin pathway, *J Biol Chem*, 279 (2004), pp. 40634-40639).

Pillai S., Chellappan S. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit in angiogenesis and epithelial to mesenchymal transition. *Curr Drug Targets* (2012); 13: 671-679.

Prevarskaya N., Ouadid-Ahidouch H., Skryma R., Shuba Y. (2014) Remodelling of Ca^{2+} transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130097.

Rogers S. W., Gregori N. Z., Carlson N., Gahring L. C., Noble M., (2001). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression by O2A/Oligodendrocyte progenitor cells. *GLIA*, 33(4), 306-313.

Rowley JD., A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-3.

Russo P., Bufalo A., Milic M., Salinaro G., Fini M., Cesario, A. (2014). Cholinergic Receptors as Target for Cancer Therapy in a Systems Medicine Perspective. *Current Molecular Medicine*, 14(9), 1126-1138. doi: 10.2174/1566524014666141015152601.

Russo P., Cardinale A, Margaritora S, Cesario A. Nicotinic receptor and tobacco-related cancer. *Life Sci* (2012); 91: 1087-1092.

Russo P., Cardinale A, Schuller H. A new “era” for the $\alpha 7\text{nAChR}$. *Curr Drug Targets* (2012), 13: 721-725.

Russo P., Del Bufalo A, Milic M, Salinaro G, Fini G, Cesario A. Cholinergic Receptors as Target for Cancer Therapy in a Systems Medicine Perspective. *Current Molecular Medicine* (2014), 14, 1-13.

Russo P., Taly A. $\alpha 7$ -Nicotinic acetylcholine receptors: an old actor for new different roles. *Curr Drug Targets* (2012); 13: 574-578.

Sandall DW., Satkunanathan N., Keays DA., Polidano MA., Liping X., Pham V., et al. A novel alpha-conotoxin identified by gene sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves in vivo. *Biochemistry* (2003); 42:6904–11.

Sandall W., Satkunanathan N., Keays D. A. (2003) et al., “A novel α -conotoxin identified by gene sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves in vivo,” *Biochemistry*, vol. 42, no. 22, pp. 6904–6911.

Sastry BV. and Sadavongvivad C. Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* (1978); 30: 65-132.

Sastry BV., Sadavongvivad C. (1978): Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* 30: 65-132.

Schaal C., Chellappan SP. Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Mol Cancer Res* (2014) 12:14–23. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0541.

Schaal C., Padmanabhan J and Chellappan S (2015): The role of nAChR and calcium signaling in pancreatic cancer initiation and progression. *Cancers (Basel)* 7: 1447-1471.

Schedel A., Schloss P, Klüter H, Bugert P. The dopamine agonism on ADP-stimulated platelets is mediated through D2-like but not D1-like dopamine receptors. *N-S Arch Pharmacol.* (2008); 378:431–439.

Schedel A., Thornton S., Schloss P., Kluter H., and Bugert, P. (2011). Human platelets express functional $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 928-934

Schievelbein H., Eberhardt R., Löschenkohl K, Rahlfs V, Bedall FK. Absorption of nicotine through the oral mucosa I. Measurement of nicotine concentration in the

blood after application of nicotine and total particulate matter. *Inflamm Res.* (1973); 3:254–8.

Schuller H. M. (2009). “Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors?” *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 3, pp. 195–205.

Schuller H.M. and Orloff M. (1998). “Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines: ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 55, no. 9, pp. 1377–1384.

Schuller H.M., (2007) Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 39, 45–63.

Schuller H.M., et al. (1995) Simultaneous exposure to nicotine and hyperoxia causes tumors in hamsters. *Lab. Invest.* 73, 448–456.

Schuller HM. (2009) Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer* 9: 195-205.

Schuller HM., Al-Wadei HA and Majidi M (2008): GABA B receptor is a novel drug target for pancreatic cancer. *Cancer* 112: 767-778.

Schuller HM., Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer* (2009); 9: 195-205.

Schuller HM., Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer* (2009); 9: 195-205.

Schuller HM., Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer.* (2009); 9:195–205. doi: 10.1038/nrc2590.

Schuller HM., Nitrosamines as nicotinic receptor ligands. *Life Sci* (2007) 80:2274–80. doi:10.1016/j.lfs.2007.03.006 38.

Schuller HM., Orloff M. Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* (1998); 55: 1377-1384.

Schuller HM., Regulatory role of the $\alpha 7$ nAChR in cancer. *Curr Drug Targets* (2012); 13: 680-687.

Sciamanna M. A., Griesmann G. E., Williams C. L., and Lennon V. A. (1997) "Nicotinic acetylcholine receptors of muscle and neuronal (α) types coexpressed in a small cell lung carcinoma," *Journal of Neurochemistry*, vol. 69, no. 6, pp. 2302–2311.

Sciamanna MA., Griesmann GE, Williams CL, Lennon VA. Nicotinic acetylcholine receptors of muscle and neuronal ($\alpha 7$) types coexpressed in a small cell lung carcinoma. *J Neurochem* (1997); 69: 2302–11.

Séguéla P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J.A., Patrick J.W. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* (1993); 13(2):596–604.

Sergei A., Grando SA. Connections of nicotine to cancer. *Nat Rev Cancer* (2014) 14:419–29. doi:10.1038/nrc3725.

Shahrabi S., Azizidoost S, Shahjahani M, Rahim F, Ahmadzadeh A, Saki N. New insights in cellular and molecular aspects of BM niche in chronic myelogenous leukemia. *Tumour Biol.* (2014); 35(11):10627–33. doi:10.1007/s13277-014-2610-9. PubMed PMID: 25234716.

Sharma G., Vijayaraghavan S. (2002). Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *Journal of Neurobiology*, 53(4), 524-534. doi:10.1002/neu.10114.

Shih Y. L., Liu H. C., Chen C. S. (2010) et al., "Combination treatment with luteolin and quercetin enhances antiproliferative effects in nicotine-treated MDA-MB-231 cells by down-regulating nicotinic acetylcholine receptors," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 1, pp. 235–241.

Shih Y. L., Liu H. C., Chen C. S. (2010) et al., "Combination treatment with luteolin and quercetin enhances antiproliferative effects in nicotine-treated MDA-MB-231 cells by down-regulating nicotinic acetylcholine receptors," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 1, pp. 235–241.

Shin V.Y., et al. (2004) Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* 25, 2487–2495.

Shin VY., Jin HC., Ng EK., Yu J, Leung WK, Cho CH and Sung JJ (2008): Nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induce cyclooxygenase-2 activity in human gastric cancer cells: Involvement of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) and beta-adrenergic receptor signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 233: 254-261.

Shin Y., Wu W. K. K., Chu K. M. (2005) et al., "Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer," *Molecular Cancer Research*, vol. 3, no. 11, pp. 607–615.

Shin VY., Wu WK, Chu KM, Koo MW, Wong HP, Lam EK, Tai EK, Cho CH. Functional role of beta-adrenergic receptors in the mitogenic action of nicotine on gastric cancer cells. *Toxicol Sci* (2007); 96:21-9.

Singh S., Pillai S., Chellappan S., Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. *J Oncol* (2011): 456743. doi:10.1155/2011/456743.

Sobkowiak R., Lesicki A., Absorption, metabolism and excretion of nicotine in humans. *Postepy Biochem.* (2013); 59:33–44.

Song P., Sekhon HS, Fu XW, Maier M, Jia Y, Duan J, Proskosil BJ, Gravett C, Lindstrom J, Mark GP, Saha S and Spindel ER. Activated cholinergic signaling provides a target in squamous cell lung carcinoma. *Cancer Res* (2008); 68: 4693-4700.

Song P., Sekhon HS., Fu XW., Maier M., Jia Y., Duan J., et al. (2008). Activated cholinergic signaling provides a target in squamous cell lung carcinoma. *Cancer Res* 68(12): 4693-4700.

Song P., Sekhon HS., Jia Y., Keller JA., Blusztajn JK., Mark GP, et al. (2003). Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 63: 214–221.

Song P.; Spindel ER. Basic and clinical aspects of nonneuronal acetylcholine: expression of non-neuronal acetylcholine in lung cancer provides a new target for cancer therapy. *J Pharmacol Sci* (2008); 106: 180-185.

Spindel ER. (2016). Cholinergic targets in lung cancer. *Curr Pharm Des* 22: 2152–2159.

Stepanov I., Carmella SG., Briggs A., Hertsgaard L., Lindgren B., Hatsukami D., et al. Presence of the carcinogen N'-nitrosonornicotine in the urine of some users of oral nicotine replacement therapy products. *Cancer Res.* (2009); 69:8236–40.

Summers AE., Whelan CJ., Parsons ME. Nicotinic acetylcholine receptor subunits and receptor activity in the epithelial cell line HT29. *Life Sci.* (2003); 72:2091–4.

Taly A., Corringer PJ., Guedin D., Lestage P., Changeux JP. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* (2009); 8: 733-750.

Tang, H., & Goldman, D. (2002). Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF-2C). *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*. doi:10.1002/0471203076.

Thunnissen F.B., Acetylcholine receptor pathway and lung cancer *J Thorac Oncol*, 4 (2009), pp. 943-946

Travlos GS., Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol.* (2006); 34(5):548-565.

Trombino S., Cesario A, Margaritora S, Granone P, Motta G, Falugi C and Russo P (2004): Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: Role of mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 64: 135-145.

Trombino S., et al. (2004) α 7-Nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: role of mitogen- activated protein kinase pathway. *Cancer Res.* 64, 135–145.

Tsurutani J., Castillo S. S., Brognard J. et al. (2005). “Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NF κ Bdependent survival in lung cancer cells,” *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 7, pp. 1182–1195.

Villablanca AC. (1998). Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J Appl Physiol* 84:2089–98.

Villablanca C. (1998) “Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro,” *Journal of Applied Physiology*, vol. 84, no. 6, pp. 2089–2098.

Virchow R., Weisses Blut. *Frorieps Notizen.* (1845); 36:151-156.

Wang C., Niu W., Chen H., Shi N., He D., Zhang M., Ge L., Tian, Z., Qi, M., Chen, T., ... Tang, X. (2017). Nicotine suppresses apoptosis by regulating α 7nAChR/Prx1 axis in oral precancerous lesions. *Oncotarget*, 8(43), 75065-75075. doi:10.18632/oncotarget.20506

Wang Y., et al. Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* (2001); 60:1201–1209.

Wang Y., Pereira EF, Maus AD, et al. (2001): Human bronchial epithelial and endothelial cells express α 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 60: 1201-1209.

Wang Y., Su D. M., Wang R. H., Liu Y., and Wang H. (2005) “Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain,” *Neuroscience*, vol. 132, no. 1, pp. 49–56.

Welch K. D., Green B. T., Panter K. E., Pfister J. A., Gardner D. R. (2013). The role of the $\alpha 7$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor in the acute toxicosis of methyllycaconitine in mice. *Journal of Applied Toxicology*, 33(9), 1011-1016. doi:10.1002/jat.2851.

Wess J., Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* (1996); 10:69–99.

Wessler I. and Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* (2008); 154: 1558-1571.

Wessler I., Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn J Pharmacol* (2001); 85: 2-10.

Wessler I., Kirkpatrick C.J., Racke K. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26 (3) (1999), pp. 198-205.

Wessler I., Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* (2008); 154:1558-71.

West K. A., Brognard J., Clark A. S. et al. (2003). “Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 111, no. 1, pp. 81–90.

Wong HPS., Yu L., Lam EKY., Tai EKK., Wu WKK, Cho CH. Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through β -adrenergic activation. *Toxicol Sci* (2007) 97:279–87. doi:10.1093/toxsci/kfm060.

Wong HP., Yu L, Lam EK, Tai EK, Wu WK, Cho CH. Nicotine promotes cell proliferation via $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine-

synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* (2007); 221:261-7.

Xu J., et al. (2007) Nicotine inhibits apoptosis induced by cisplatin in human oral cancer cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 36, 739–744.

Xu L. and Deng X. (2006) “Protein kinase C α promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, pp. 4457–4466.

Ye Y.N., et al. (2004). Nicotine promoted colon cancer growth via epidermal growth factor receptor, c-Src, and 5-lipoxygenase-mediated signal pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 66–72.

Zdanowski R., Krzyżowska M., Ujazdowska D, Lewicka A, Lewicki S. (2015) Role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways. DOI: 10.5114/ceji.2015.54602.

Zeidler R., et al. (2007) Nicotine and apoptosis. *Apoptosis* 12, 1927–1943.

Zhao Y., Wang X, Wang T, Hu X, Hui X, Yan M, Gao Q, Chen T, Li J, Yao M, Wan D, Gu J, Fan J and He X. (2011). Acetylcholinesterase, a key prognostic predictor for hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces chemosensitization. *Hepatology*; 53: 493-503.

Zia S, Ndoye A, Lee TX, et al. (2000): Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 973-981.

Zia S., Ndoye A., Nguyen VT, et al. (1997): Nicotine enhances expression of the $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ and $\alpha 7$ nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 97: 243-262.

Zoheir N., Lappin D. F., Nile C. J. (2012). Acetylcholine and the alpha 7 nicotinic receptor: a potential therapeutic target for the treatment of periodontal disease?. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 61(9), 915-26.

Zoli M., Pistillo F., Gotti C (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 96: 302–311.

Zoli M., Pucci S., Vilella A., Gotti C. (2018). Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors , 16(4): 338 – 349 DOI: 10.2174/1570159X15666170912110450.



P-90

Alfa 7 nikotinik asetil kolin reseptörlerinin K562 hücre çoğalması ve sinyal iletilisindeki rolleri üzerine çalışmalarGözde ÖNDER^{1*}, Banu AYDIN¹, Hülya CABADAK¹¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Başbüyük Yerleşkesi, İstanbul, Türkiye

*gozdeonder_1544@hotmail.com

Asetil kolin (ACh) kolinerjik sisteme aracılık eden nörotransmitterdir. Asetilkolin iki farklı reseptör ailesi ile etkileşmektedir. Bunlar nikotinik asetil kolin reseptörleri n(AChR) veya muskarinik asetil kolin reseptörleridir. Nikotin, nikotinik reseptörlere, muskarine ise muskarinik reseptörlere bağlanan doğal bileşenlerdir [1]. Nikotinik reseptörler hem nöronal hemde nöronal olmayan hücrelerde ekspres olmaktadır. Nöronal olmayan nAChR sinyal yolağının kanser ve kardiyovasküler hastalıklarda önemli etkileri vardır. Kanser hücrelerinde $\alpha 7$ nikotinik reseptörünün nikotin proliferatif etkilerine aracılık eden ana nAChR altbirimi olduğunu göstermiştir [2]. Nöronal olmayan hücrelerdeki rolleri henüz tam açıklanamamıştır. Bu çalışmada K562 hücrelerinde nikotinik alfa 7 reseptörünün rolünü belirlemek için asetil kolin, nikotinik alfa 7 reseptör antagonisti Methyllaconitine citrate (MLA) ve kolinerjik antagonist atropin varlığında hücre çoğalmasına etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca Asetil kolinin Ca düzeyine etkisine bakılmıştır. İnsan K562 hücreleri (ATCC No: CCL-243) çoğaltıldı. Hücreler asetilkolin ve/veya nikotinik antagonist Methyllaconitinecitrate (MLA) ve kolinerjik antagonist, atropin ile etkileştirildikten sonra BrDu hücre sayım kiti (Roche), kullanılarak hücre çoğalması belirlenmiştir. Asetil kolinin kalsiyum düzeyine etkisi ELISA yöntemi ile belirlendi. Bu çalışmada, insan K562 hücrelerinde asetil kolin, kolinerjik antagonist ve nikotinik antagonistlerin hücre çoğalmasına etkileri gösterilmiştir. İnsan K562 hücrelerinde asetil kolinin hücre çoğalmasındaki etkisini nikotinik antagonistler MLA ve Curare 24 ve 48. saatlerde geri çevirmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nikotinik reseptörler; lösemi; kalsiyum; asetil kolin.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-CYLP-120418-0158 kodlu proje ile desteklenmiştir

Kaynaklar

- [1] Russo P, Del Bufalo A, Milic M, Salinaro G, Fini G, Cesario A. Cholinergic Receptors as Target for Cancer Therapy in a Systems Medicine Perspective. *Current Molecular Medicine* 2014;14:1-13.
 [2] Gotti C, Clementi F: Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 2004; 74: 363-396.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Gözde	Soyadı	ÖNDER
Doğum Yeri	Ankara	Doğum Tarihi	05.01.1993
Uyruğu	T.C.	Tel	+905518650594
E-mail	gozdeonder_1544@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Hacettepe Üniversitesi	2016
Lise	Anıttepe Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre(YılYıl)
Fizik Öğretmeni	Atalay Akademi	2013-2014
Gönüllü Öğretmen	LÖSEV	2015-2015
Fizik Öğretmeni	TED Karabük Koleji	2016-2017

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
Almanca	Zayıf	Zayıf	Zayıf
İngilizce	Orta	Orta	Orta

GÖZDE ÖNDER	MARMARA ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	YÜKSEK LİSANS TEZİ	İSTANBUL-2019
--------------------	---	---------------------------	----------------------