T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİMDALI

NİKOTİN MARUZİYETİNİN FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNDE NÖRONAL FARKLILAŞMA ÜZERİNE ETKİSİ

İnayet Nur USLU

TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

ADANA-2021

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİMDALI

NİKOTİN MARUZİYETİNİN FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNDE NÖRONAL FARKLILAŞMA ÜZERİNE ETKİSİ

İnayet Nur USLU

TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) tarafından desteklenmiştir.

TezNo:……
ADANA-2021

KABUL ve ONAY

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
"Nikotin Maruziyetinin Fare Embriyonik Kök Hücrelerinde Nöronal Farklılaşma Üzerine Etkisi"
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: / /

TEZ SINAV JÜRİSİ

Dr.
Üniversitesi
Başkan

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık BilimleriEnstitü Müdürü

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. ...../...../20....

İMZA

Adı Soyadı

Kayıtlı olunan Program	:Tıbbi Biyoloji Doktora Programı
Tezin Konusu	: Nikotin Maruziyetinin Fare Embriyonik Kök Hücrelerinde Nöronal Farklılaşma Üzerine Etkisi
Tezin Türü	: Yüksek Lisans : ☐ Doktora ☒
Danışmanın Adı-Soyadı	: Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI
Danışmanın İletişim Bilgileri	
Telefon	: 0322 338 6060/3498
E-Posta	: payfer@cu.edu.tr
Öğrencinin İletişim Bilgileri	
Telefon	: 0322 338 6060/3498
E-Posta	: inuruslu@gmail.com
Adresi	: Çukurova Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Bu zorlu eğitim sürecimde ve tez çalışmamda bana her zaman destek olan ve yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen sevgili danışmanım Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI' na, yine çalışmalarım sırasında bilgi ve birikimini benden esirgemeyerek destek olan Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ' a ve Prof. Dr. Filiz KOÇ' a en içten dileklerimle teşekkür ederim. Tezimi yapıcı ve bilimsel katkıları ile değerlendiren saygıdeğer Prof. Dr. Nurcan ARAS ve Doç. Dr. Gülay GÜLBOL DURAN' a içtenlikle teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitim hayatımda bana yardımcı ve yol gösterici olan değerli Çukurova Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD Başkanımız Sayın Prof. Dr. Davut ALPTEKİN' e, Prof. Dr. Osman DEMİRHAN' a Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP' a, Dr. Öğr. Üye. Perçin PAZARCI' ya Öğr. Gör. Dr. Sabriye KOCATÜRK SEL' e ve bütün anabilim dalımız çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının mümkün olmasını sağlayan bana bölümünü açan ve bilgisine hayran kaldığım sevgili Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD Başkanı Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e ve misafirperverlikleri ile yardımlarını esirgemeyen Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD çalışanlarına tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Ar. Gör. Gülsevinç AKSOY' a, Dok. Öğr. Eylül AKBAL IŞIK' a, Dok. Öğr. Şerife ERDEM' e, ve Dok. Öğr. Nesrin ÇETİNEL' e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Ç.Ü.Rektörlüğü Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) tarafından desteklenmiştir.

Son olarak, sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda arkamda duran, destekleri ile beni cesaretlendiren biricik aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY iii
ETİK BEYANI i
TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER v
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xiv
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Nikotin 3
2.1.1. Nikotin Emilimi ve Dağılımı 4
2.1.2. Gebelikte Sigara Kullanımı 5
2.1.3. Nikotinin Nörogelişimsel Etkileri 7
2.1.4. Nikotinin Sinir Sistemine Etkileri 8
2.2. Kök Hücreler 9
2.2.1. Kök Hücrelerin Tarihçesi 10
2.2.2. Kök Hücre Türleri 11
2.2.2.1. Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücreler 12
2.2.2.1.1. Totipotent kök hücreler 12
2.2.2.1.2. Pluripotent kök hücreler 12
2.2.2.1.3. Multipotent kök hücreler 12
2.2.2.1.4. Unipotent kök hücreler 13
2.2.2.2. Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kök Hücreler 14
2.2.2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH) 14
2.2.2.2.2. Fetal Kök Hücreler 15
2.2.2.2.3. Kordon Kanı Kök Hücreleri 16
2.2.2.2.4. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler 16
2.2.2.2.5. Yetişkin Kök Hücreler 17

2.2.2.2.6. Fare Embriyonik kök hücreleri 17
2.3. Farklılaşma 19
2.3.1. Farklılaşmanın Epigenetik Kontrolü 20
2.3.2. Nöronal Farklılaşma 21
2.3.3. Nöral Kök Hücreler 22
2.3.4. In Vitro Farklılaştırma 24
2.4. Tez çalışmasında incelenen genler 25
2.4.1. RNA Bağlayıcı Fox-1 Homolog 3 (RNA Binding Fox-1 Homolog 3/RBFOX3) 26
2.4.2. Glikojen sentaz kinaz 3-β (GSK3B) 28
2.4.3. Neurogenin 2 (Neurog2) 30
2.4.4. Paired-Box 6 (PAX6) 32
2.4.5. Tübülin-β3 (TUBB3) 33
3. GEREÇ ve YÖNTEM 35
3.1. Araç ve Gereçler 35
3.1.1. Kimyasal Malzemeler 36
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler 37
3.2. Yöntem 37
3.2.1. STO Hücrelerinin kültür aşaması 37
3.2.2. STO Hücrelerinin Mitomisin-c ile muamele edilmesi 39
3.2.3. EKH'lerin üretilmesi, LIF'e maruz bırakılması ve çoğaltılması 39
3.2.4. Hanging Drop yöntemi ile Embriyonik Cisimlerin oluşturulması 40
3.2.5. Farklılaştırma Süreci 41
3.2.6. Total RNA izolasyonu 44
3.2.7. Total RNA'dan Ters Transkripsiyon ile Komplementer DNA'ya (cDNA) Sentezi 45
3.2.8. Real-Time PCR (RT-PCR) Reaksiyonu 45
3.2.9. Real-Time RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi 47
3.2.10. İmmunohistokimyasal Boyamalar 47
4. BULGULAR 49
4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular 49
4.1.1. İlk Hafta İmmünohistokimyasal Bulguları 49

4.1.2. İkinci Hafta İmmünohistokimyasal Bulguları 52
4.1.3. Üçüncü Hafta İmmünohistokimyasal Bulguları 55
4.2. Real Time PCR Bulguları 58
4.2.1. İlk Hafta Real Time PCR Bulguları 58
4.2.2. İkinci Hafta Real Time PCR Bulguları 59
4.2.3. Üçüncü Hafta Real Time PCR Bulguları 59
5. TARTIŞMA 61
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 68
KAYNAKLAR 69
EKLER 77
EK-1. STO Hücre Kültürü İçin Besiyeri İçeriği 77
EK-2. Embriyonik Kök hücreler İçin Besiyeri İçeriği 78
EK-3. Embriyonik Cisimler İçin Hazırlanan Besiyeri İçeriği 79
EK-4. Farklılaşma İçin Hazırlanan Nikotinsiz Besiyeri İçeriği 80
EK-5. Farklılaşma İçin Hazırlanan Nikotinli Besiyeri İçeriği 81
ÖZGEÇMİŞ 82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No: **Sayfa No:**

Şekil 1. Kök hücre nedir? Vücudu oluşturan hücre tiplerine farklılaşabilen aynı zamanda kendini yenileyebilme özelliğine sahip hücrelerdir. 10

Şekil 2. Waddington'un epigenetik modeli. Aynı noktadan başlayan vadinin tepesindeki misketlere, metaforda belirtilen aşağı yuvarlanma esnasında kanalize olunan farklı yolların (A ve B) görünmesi için diğer misketler eklenmiş ve sonlanımlarının farklı olduğu şematize edilmiştir. 11

Şekil 3. Kök hücre potensilerine göre sınıflandırılması. Döllenme sonrası oluşan zigottan erişkin hücrelere kadar farklı hücre soylarına farklılaşma yeteneğine göre, yani potensilerine göre kök hücre çeşitlerinin şematik gösterimi. İHK (İç hücre kitlesi), EKH'ler (Embriyonik kök hücreler), iPKH'ler (İndüklenmiş pluripotent kök hücreler), MKH'ler (Mezenkimal kök hücreler), HKH'ler (Hematopoietik kök hücreler), FKH'ler (Fetal kök hücreler), NKH'ler (Nöral kök hücreler). 13

Şekil 4. Embriyonik kök hücreler. Embriyonik gelişimin 4-5. Günlerine uterusa implante olmadan önceki 150-200 hücrelik blastokist aşamasında iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent kök hücreler. 15

Şekil 5. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler. Yamanaka faktörleri olarak bilinen faktörlerin (Oct4/3, Sox2, c-Myc ve Klf4) ilk olarak 2006 yılında hayvan ve 2007 yılında insan somatik hücresine viral transfeksiyon ile aktarılması yoluyla üretilmiş pluripotent kök hücrelerdir. 16

Şekil 6. Kaynaklarına göre kök hücreler. 17

Şekil 7. Nöron hücrelerin farklılaşma basamakları. Eflatun-mavi renkli boncuklar nöroepitel hücrelerinden yetişkinde ki NKH aşamasına kadar olan hücreleri göstermektedir. Orta çizginin üstünde kalan bölüm embriyo-fetüs dönemindeki gelişmeyi, altında kalan bölüm ise yenidoğan ve yetişkindeki gelişmeyi göstermektedir. Düz çizgiler deneysel verilere, kesikli çizgiler ise varsayımlara göre çizilmiştir. 23

Şekil 8. Seçilen genler arasındaki ilişki 26

Şekil 9. Yetişkin Dentate Gyrus'unda Neurogenesis. Granuler tabaka (GL), Subgranular zone (SGZ). 28

Şekil 10. Nörogeenez sırasında GSK3 sinyalleşmesinin rolü için uyarlanan bir model**.** Radyal glial hücrelerin asimetrik bölünmesi sırasında hücreler, upstream düzenleyicilerin asimetrik kalıtımı yoluyla (Örneğin. Par3, Şizofrenide Bozulmuş (DISC1) veya RhoA) veya hücre dışı faktörlerin yoluyla (örn. Wnt, fibroblast büyüme faktörü (FGF), lizofosfatidik asit (LPA), retinoik asit (RA)) farklı GSK3 aktivitelerine sahip olabilirler. Daha düşük GSK3 aktivitesine sahip yavru hücrede, β-katenin, Gli ve c-Myc gibi proliferasyon faktörleri birikir. Mikrotübül ilişkili proteinler (Ninein gibi),

hücreyi ventriküler bölge (VZ) yüzeyine tutturmak için astral mikrotübülleri organize eder. Böylece hücre progenitör kadere yönlenmiş olur. Tersine, daha yüksek GSK3 aktivitesine sahip yavru hücre, proliferatif proteinleri ve Ninein gibi mikrotübül ilişkili diğer proteinleri, muhtemelen ubikuitin-proteazom sistemi (UPS) aracılı protein yıkımı yoluyla uzaklaştırır. Sonuç olarak, hücre VZ yüzeyinden ayrılır ve bir nöron veya bir ara progenitör hücre (IPC) haline gelir. 30

Şekil 11. PAX6 cDNA sı ve proteini. cDNA, yatay çubuk (üstte) olarak temsil edilmektedir. Dikey çizgiler ekzon sınırlarını göstermektedir. PAX6, 4-13 olmak üzere 10 temel kodlama ekzonuna ve alternatif kırpılma ekzonuna, (5a) sahiptir. Ekson 5a'nın dahil edilmesi, paired domaine 14 amino asidin eklenmesiyle sonuçlanır. PB, paired-box (kırmızı); LNK, bağlayıcı bölge; HB, homeobox (sarı); PST, prolin, serin, treonin açısından zengin domain; CT, C-terminal bölgesini (yeşil) temsil etmektedir. PAX6 proteininin (altta) grafiksel bir temsili, transle edilmiş proteinin farklı domainlerini göstermektedir. Paired domain (kırmızı) ve homeodomain (sarı) DNA ile temas halinde gösterilmektedir. Homeodomain 3 sarmaldan oluşurken, paired domain 6 sarmaldan oluşur. PST domainin ve C-terminal peptidinin yapıları bilinmemektedir. N ve C, sırasıyla proteinin N- ve C-terminallerini gösterir. 33

Şekil 12. STO hücrelerinin kültür aşamaları. A,B: STO hücre kültürü 2. Gün C,D: STO hücre kültürü 4. gün 38

Şekil 13. Mitomisin-C uygulanmış STO hücreleri 39

Şekil 14. EKH kültür aşamaları A: Kültürde 0.gün B: Kültürde 2.gün C: Kültürde 4.gün....40

Şekil 15. Hanging Drop yöntemi ile Emriyonik cisimlerin oluşturulması....41

Şekil 16. EB'lerin fibronektin kaplı plate'e aktarılması 41

Şekil 17. EB inkübasyonu ve farklılaşma süreci: A, B: EB'lerin plate aktarıldğı gün çekimleri. C, D: EB'lerin aktarımdan sonraki 2. gün çekimleri. E: Nikotinli grupta farklılaşmanın 5. günü, F: Nikotinsiz grupta farklılaşmanın 5.günü. G: Nikotinli grupta farklılaşmanın 7. günü. H: Nikotinsiz grupta farklılaşmanın 7.günü J: Nikotinli grupta farklılaşmanın 14.günü K: Nikotinsiz grupta farklılaşmanın 14.günü L: Nikotinli grupta farklılaşmanın 21.günü M: Nikotiniz grupta farklılaşmanın 21. günü gösterilmiştir. 43

Şekil 18. 7. gün nikotinli grup İHC sonucu. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması ile 7. gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm 50

Şekil 19. 7. gün nikotin uygulaması yapılmayan grup İHC sonuçları. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması yapılmaksızın 7. gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm**.**....51

Şekil 20. 14. gün nikotinli grup İHC sonuçlarıEmbriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması ile 14. gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A),

GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm 53
Şekil 21. 14. gün nikotin uygulaması yapılmayan grup İHC sonuçları.Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması yapılmaksızın 14. gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm. 54
Şekil 22. 21. gün nikotinli grup İHC sonuçları. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması ile 21. Gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm 56
Şekil 23. 21. gün nikotin uygulaması yapılmayan grup İHC sonuçları. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması yapılmaksızın 21. Gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm. 57
Şekil 24. 7. Gün Real Time PCR sonuçları 58
Şekil 25. 14. Gün Real Time PCR sonuçları 59
Şekil 26. 21. Gün Real Time PCR sonuçları 60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No: **Sayfa No:**

Çizelge 1.Kök hücre belirteçleri 19

Çizelge 2.cDNA reaksiyonu için reaktif ve miktarları 45

Çizelge 3.cDNA reaksiyon döngüsü..... 45

Çizelge 4. Realtime PCR'de kullanılan Primer dizileri 46

Çizelge 5. Real Time PCR reaktif ve miktarları 47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BMP : Kemik Morfogenetik Proteini
CT-1 : Kardiyotrofin
CNS : Merkezi Sinir Sistemi
CNTF : Siliyer Nörotrofik Faktör
DEHB : Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğu
EC : Embriyonik Cisim
EKH : Embriyonik Kök Hücre
FEF : Fare Embriyonik Fibroblastı
FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü
FKH : Fetal Kök Hücre
HKH : Hematopoietik Kök Hücre
İGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
İHK : İç Hücre Kitlesi
İL-6 : İnterlökin 6
İPKH : İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
İVF : İn Vitro Fertilizasyon
LİF : Lösemi İnhibe Edici Faktör
MKH : Mezankimal Kök Hücre
nACRh : Nikotinik Asetilkolin Reseptörü
NEAA : Non Essential Aminoasit
NKH : Nöral Kök Hücre
TE : Trofoektoderm
TF : Transkripsiyon Faktörü

ÖZET

Nikotin Maruziyetinin Fare Embriyonik Kök Hücrelerinde Nöronal Farklılaşma Üzerine Etkisi

Günlük hayatımızın her evresinde birçok biyolojik, fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalmamız ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır. Hatta bu ajanlara maruziyetimiz, belki de yaşamımızın en önemli evresi diyebileceğimiz organizmanın temelinin atılıp oluşturulduğu fetal dönemden başlamaktadır. Nikotin de, bu kimyasal ajanlardan biridir. Fetal gelişim sırasında nikotine maruz kalmanın hem anne hem de fetüs için zararlı etkilerinin olduğu ileri sürülmüş ancak bu etkilerin hücresel düzeyde anlaşılabilmesi için bu konudaki çalışmaların artırılması gerekmektedir. Biz de bu tez çalışmasında gelişim sürecinde nikotine maruz kalmanın etkilerini incelemeyi amaçladık.

Bu amaçla fare embriyonik kök hücrelerini in vitro ortamda nikotine maruz bırakarak farklılaştırdık. Farklılaşma sırasında ve sonunda kültürdeki hücreleri toplayarak Gfap, Nestin, O4, β-3 Tubulin ve Map2 proteinlerine immünohistokimyasal boyama (İHC) ile baktık. Real Time PCR analizi ile de NEUROG2, RBFOX3, TUBB3, GSK3B ve PAX6 genlerinin ekspresyonlarına baktık.

Çalışmamızın sonunda; nikotine maruz kalan grubumuzda gen ekspresyonlarının değiştiği, kontrol grubuna nazaran gen ekspresyonlarında azalma olduğu görüldü. İHC sonuçlarında Map2, β-3 Tubulin ve O4 ekspresyonlarında nikotinli gruplarda nikotinsizlere nazaran azalma olduğuGfap ve Nestinde ise 21. gün hariç diğer günlerde azalma olduğu görülmüştür.

<u>Anahtar Kelimeler:</u> Embriyonik kök hücreler, Fetal gelişim, Nikotin, Nöronal farklılaşma

ABSTRACT

The Effects of Nicotine Exposure on Neural Differentiation in Mouse Embryonic Stem Cells

Exposure to many biological, physical and chemical agents in our daily life threatens our health. This exposure begins in our early life stages like fetal period that is the most important period in our lives. Nicotine is one of these chemical agents. It has been suggested that exposure to nicotine during fetal development has harmful effects for both mother and fetus, but studies on this subject need to be increased in order to understand these effects at the cellular level. In this thesis, we aimed to examine the effects of nicotine exposure during the development process.

For this purpose, we differentiated mouse embryonic stem cells by exposing them to nicotine in vitro. We looked at Gfap, Nestin, O4, β-3 Tubulin and Map2 proteins by immunohistochemical staining (IHC) by harvesting cells in culture during and at the end of differentiation. We looked at the expressions of NEUROG2, RBFOX3, TUBB3, GSK3B and PAX6 genes with Real Time PCR analysis.

At the end of our study; It was observed that gene expressions were changed in our group exposed to nicotine, and there was a decrease in gene expressions in the nicotine-exposed group compared to the control group. In IHC results, it was observed that Map2, β-3 Tubulin and O4 expressions were decreased in nicotine groups compared to non-nicotine groups, and Gfap and Nestin decreased on days other than 21 days.

Keywords: **Embryonic stem cells, Fetal development, Nicotine, Neuronal differentiation**

1. GİRİŞ

Günümüzde doğal kaynakların geri dönüşümsüz şekilde tüketimi ve artan sanayileşme ile birlikte sağlığımızın çok daha ciddi bir şekilde tehdit edildiğini görmekteyiz. Artık hayatımızın her aşamasında birçok biyolojik, fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalmamız ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır. Hatta bu ajanlara maruziyetimiz, belki de yaşamımızın en önemli evresi diyebileceğimiz organizmanın temelinin atılıp oluşturulduğu fetal dönemden başlamaktadır. Nikotin, bu kimyasal ajanlardan biri olarak, en çok karşılaştığımız tehlikeli kimyasalların başında gelmektedir. Alkaloid bir bileşik olan nikotin doğada çeşitli bitkilerin yapraklarında bulunabilmesinin yanı sıra laboratuvar ortamında sentetik olarak da üretilmektedir[1]. Amerika kıtasına özgü olan bu bitkinin kullanımı yaklaşık 2000 yıllık bir geçmişe sahiptir. İlk olarak elde edildiğinde zehirli olarak görülmüş ve böcek ilacı olarak kullanılmıştır[2]. Günümüzde ise en yoğun olarak sigara kullanımında karşımıza çıkmaktadır. Kişilerin sigara kullanması kendileri ile birlikte çevrelerindeki insanları da bu zararlı maddeye maruz bırakmalarına neden olmaktadır. Özellikle hamile kadınların bu dönemde sigara kullanması, doğacak bebeklerin ileriye dönük çeşitli sağlık problemleri ile karşılaşmasına neden olacaktır[3].

Nikotinin, kardiyovasküler, gastrointestinal, solunum ve sinir sistemini de kapsayan birçok doku ve organa zararlı etkileri olduğu gösterilmiştir. Nörolojik sistem ve beyin fonksiyonlarındaki bozukluklardan kaynaklanan nörogelişimsel hastalıkların nikotin ile ilişkisini çalışan ve bağlantılı olduklarını savunan birçok çalışma bulunmaktadır. Nörogelişimsel hastalıkların sebebinin araştırıldığı çalışmalarda, belirsizlikler devam etse de, bugüne kadarki bulgular, bu hastalıkların genetik ve çevresel faktörlerin ortak etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Çevresel faktörler üzerine yapılan araştırmalar daha çok fetal ortama odaklanmıştır[4]. Fetal dönemde maruz kalınan nikotinin hem anneyi hem fetüsü hem de yenidoğanı olumsuz şekilde etkilediği ve yaşamın sonraki döneminde bireyde kalıcı zararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Her ne kadar, gebelikte sigara kullanımının nörogelişimsel hastalıklar ile ilişkili olduğu savunulmuş ve gösterilmiş olsa da, bu etkinin hücresel düzeyde nasıl ve ne şekilde olduğu tam olarak anlaşılamamıştır[5]. Nikotinin gen düzeyindeki etkilerinin tam olarak bilinmemesi, araştırmacıların bu konudaki merakını cezbetmektedir.

Biz de bu tez çalışmamızda, gelecek neslin sağlığını riske ederek toplum sağlığını tehdit eden ve birçok çalışma tarafından zararlı etkileri gösterilen gebelik dönemi nikotin kullanımının etkilerini, hücresel düzeyde araştırmayı, bu çalışmalar ile başta gebelerde olmak üzere tüm toplumda farkındalık oluşturmayı amaçladık. Bu amaç ile çıktığımız yolda, in vitro olarak farklılaştırma yaparak nikotinin gelişimsel süreçte sinir sistemi oluşumu ve gelişimi üzerine etkisini araştırdık. Bu çalışmada fare embriyonik kök hücreleri sinir hücrelerine farklılaştırılmıştır. Farklılaştırma sırasında hücreler nikotine maruz bırakılarak nikotinin etkisi araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Nikotin

Nikotin, çeşitli bitkilerin yapraklarında bulunan alkaloid bir bileşiktir[1]. Nikotin tarih boyunca tedavi edici bir ilaç olarak kullanımının yanı sıra böcek ilacı olarak da kullanılmıştır dolayısıyla oldukça uzun bir geçmişe sahiptir[2,3]. Zamanla nikotinin memeliler üzerindeki zararlı etkisinin görülmesiyle birlikte nikotin yerini modern sentetik böcek ilaçlarına bırakmıştır[2,3]. Bir böcek ilacı olarak nikotin üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Özellikle, nikotinin sağlık üzerine zararlı etkileri bakımından bir farkındalık oluşması ile birlikte nikotin kullanımı, bilim insanları ve halk tarafından takip edilmeye başlanmıştır[2].

Günümüzde nikotin farklı şekillerde kullanılmaktadır. Günlük hayatımızda çokça maruz kalma sebebimiz ise, kendimizin, ailemizden birinin veya topluma açık ortak alanlarda üçüncü şahısların kullandığı sigaralardır. Sigara literatürde *Nicotiana tobacum* adı verilen halk arasında ise tütün olarak bilinen bir bitkiden yapılmaktadır[6]. Bu bitkinin yapraklarında bolca bulunan bu alkaloid bileşik, başlıca sigara ve diğer kullanılan çeşitli tütün ürünleri vasıtasıyla sıkça maruz kaldığımız zararlı bir maddedir[7].

Tüttürme, emme, çiğneme gibi yöntemler ile kullanılan, tütün yaprağından imal edilmiş maddeler tütün ürünü olarak kabul edilir. Tüm tütün ürünleri nikotin içermektedir; bu sebeple nikotinin zararlarından bahsederken tütün bağımlılığı ya da tütün zararları terimleri de kullanılabilir. Ancak, pratikte en sık kullanılan tütün ürünü sigara olmasından dolayı genel olarak sigara bağımlılığı ve sigaranın zararlarından söz edilmektedir[7].

Sigara kullanımı esnasında, ağız burun mukozası, solunum yolları ve alveoller, hatta deriden kolaylıkla emilebilen nikotinin beyne ulaşması 10-20 saniye içinde gerçekleşir. Yarılanma ömrü 2 saatten kısadır. Kan beyin bariyerini hızla geçerek nikotinik asetilkolin reseptörlerine bağlanan nikotin, dopamin salınımına neden olur. Dopaminin kişi üzerindeki keyif verici, rahatlatıcı etkisi bağımlılığa neden olur. Zamanla azalan dopamin kişide strese neden olarak nikotin açlığı semptomları oluşturur ve bağımlılığı güçlendirir[8].

Sigara dünyadaki en yaygın sağlık sorunlarından birisidir[9,10]. Vücuttaki neredeyse her organa zarar vermekte olup birçok hastalığa sebep olmaktadır[11]. Sigara,

dünya genelinde halk sağlığını olumsuz yönde etkilerken, önlenebilir ölüm nedenleri arasında ilk sırada gelmektedir[9,10]. Ülkemizde sigaranın neden olduğu ölüm sayısının yılda 100.000'den fazla olduğu bildirilmiştir. Gerekli tedbirler alınmadığında bu sayının 2030 yılında 240.000'e kadar çıkacağı ön görülmektedir. Sigara kullanımının son zamanlarda özellikle kadınlar ve ergenler arasında yaygınlaşmasıyla sigarayla mücadele ihtiyaç haline gelmiştir[12]. Ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalara göre kadınların sigara içme oranının yükseldiği ve yaklaşık 6 kadından 1'inin sigara kullandığı saptanmıştır[12,13]. Kadınların bulundukları sosyokültürel ortamlara göre gebelik döneminde farklı oranlarda sigara kullanmaya devam ettikleri gösterilmiştir[13]. Yine yapılan çeşitli çalışmalarca sigara kullanan kadınların %50-70'inin gebelik esnasında da sigara kullanmaya devam ettiği belirlenmiştir[13].

2.1.1. Nikotin Emilimi ve Dağılımı

Nikotin zayıf bir alkaloiddir. Nikotin, solunum yoluyla alınan katran damlacıkları ile vücuda transferi gerçekleşmektedir. Nikotin, hücre zarından ortamın pH' sına bağlı olarak emilmektedir. Oral boşlukta, deride, akciğerde, gastrointestinal sistem ve mesanede nikotin emilimi gerçekleşmektedir[14,15]. Bir baz olan nikotin; alveoller ve ince barsak gibi alkali ve geniş yüzey alanına sahip ortamlarda çok hızlı bir şekilde emilirken, mide gibi asidik ortamlarda iyonize olup kısmen emilimi gerçekleşmektedir[14,15,16].

Tütün dumanı, akciğerlerin küçük hava yollarına ve alveollerine ulaştığında, nikotin hızla emilir; sigara içilirken solunan nikotinin yaklaşık %25'i kan dolaşımına katılır ve değişik dokulara ulaşır. Hamilelerde hızlı bir şekilde plasentadan geçerek amniyotik sıvıya karışıp fetus derisi tarafından emilimi gerçekleşir ve fetal dolaşıma katılır[17]. Beyne ulaşması ise 15 saniye içinde gerçekleşmektedir[18].

Bu esnada arteriyel kanda bulunan nikotinin, venöz kandakinden altı misli fazla olmasindan dolayi beyinde yüksek konsantrasyona ulaşır[19]. Nikotinin plazmadaki seviyesi beyindeki gibi yüksek olup süratle azalır. Bu azalma ile periferik alanlar doyurulurken, bir taraftan da nikotin elimine edilir. Bir gün içinde birden çok kere sigara içildiğinde, nikotin birikim yapmaya başlar. Bu birikim yapmanın başlamasından sonra da gece boyunca nikotin seviyesinde bir korunma olur. Gün içinde nikotinin plazma seviyesi 20- 40 ng/ml arasında değişir[19].

Nikotinin birikim yaptığı organlara bakıldığında; akciğer, böbrek, karaciğer, dalak ve beyinde en fazla oranda biriktiği, yağ dokusunda birikimin ise en düşük oranda olduğu sigara kullananların otopsi örneklerinde gösterilmiştir[17].

2.1.2. Gebelikte Sigara Kullanımı

Günümüzde halk sağlığını etkileyen ve en önemli toplumsal sağlık problemlerinden biri olan sigara kullanımı sebebiyle nikotin maruziyeti gebelik döneminden itibaren başlamaktadır. Özellikle beyin gelişiminin çok hızlı olduğu 3. trimester en riskli dönemdir. Hayvan modellerinin kullanılarak yapıldığı çalışmalarda gebelik döneminde nikotin maruziyetinin nöroteratojen olduğu gösterilmiştir[20]. Gebelik sırasında annenin sigara içmesi sebebi ile fetüsün nikotine maruziyeti, doğumdan sonra davranış değisiklikleri ve bilişsel fonksiyonlarda azalmaya neden olmaktadır[20]. Gebelikte sigara içilmesi veya ortamdaki sigara dumanının solunması gebeliği, fetüs gelişimini, doğumu ve bebek sağlığını etkileyebilmektedir. Dünya sağlık örgütünün verilerine göre gelişmiş ülkelerdeki kadınların yaklaşık %20'si sigara içerken, gelişmekte olan ülkelerdeki kadınların yaklaşık %9'u sigara içmektedir. Bu kadınların çoğu sigara içmeye gebe kaldıklarında da devam etmektedirler. Bu, bir halk sağlığı problemidir. Çünkü sigara içimi sadece kadının sağlığına zarar vermekle kalmaz aynı zamanda gebelik komplikasyonlarına ve yenidoğanda ciddi sağlık problemlerine de yol açabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde bütün gebe kadınların sigarayı bırakması durumunda ölü doğumlarda %11 ve yenidoğan ölümlerinde %5 azalma olacağı tahmin edilmektedir. Yapılan bir çalışmada gebelerde sigara tüketimi perinatal ve fetal mortalite riskini artırdığı gösterilmiştir. Gebelikte sigara içimi plasentada değişikliklere ve doğum komplikasyonlarına neden olur. Yapılan çalışmalarda gebelikte sigara içimi ile plasenta previa arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni tam olarak bilinmemektedir. Sigara içen annelerin plasentalarında kontrollere göre farklılıklar saptanmıştır. Sigara içenlerde plasenta genisliğinin ve ağırlığının daha fazla olduğu, çap kalınlık oranının arttığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak plasentanın yüzey alanı genişlemekte ve plasenta previa riskinin attığı düşünülmektedir[21].

Gebelik döneminde bir şekilde nikotine maruz kalınması, hem anne hem de fetüs için sağlık risklerini artırır, ayrıca yenidoğanda sağlık problemlerine sebep olur[10]. Gebelik döneminde sigara dumanına veya sigaranın önemli bir bileşeni olan nikotine

maruziyetin, deney hayvanlarında ve farelerde nörolojik gelişimi değiştirdiği, benzer şekilde insanlarda da nörolojik hastalıklar açısından risk oluşturduğu bilinmektedir[22]. Doğum öncesi nikotin maruziyeti ile birlikte oluşan nörokimyasal değişiklikler, yetişkinlerde uzun vadeli devam eden davranışsal problemlere yol açabilmektedir[23]. Nikotin, önemli gelişimsel aşamalar sırasında sinaptik fonksiyonları hedef alan tehlikeli bir nöroteratojendir. Son araştırmalar, merkezi sinir sisteminin (CNS) gelişiminin ve zararlı çevresel etkilere karşı hassasiyetinin sigara içmenin tipik olarak başladığı ergenlik dönemine kadar uzandığını göstermektedir[24]. Gebelik döneminde nikotine maruz kalan bebek ve çocuklarda, nikotinin nörotransmitter fonksiyonlarını duyarsızlaştırdığı bu duyarsızlaştırmanın ise hastaların tüm hayatını etkileyen bir olumsuzlukla sonuçlandığı görülmüştür. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda; nikotin maruziyetinin, beyin gelişiminde nöral yolakların gelişimini riske atan bir nöroteratojen olduğu kesin bir şekilde gösterilmiştir. Bu nedenlerle doğum öncesi dönemde annenin sigara içmesi veya nikotine maruz kalma fetüs gelişiminde anormalliklere yol açabilir. Gençlik ve yetişkinlik döneminde ise nörolojik problemler açısından riskleri artırabilir[5].

Sigara içmenin ve nikotin maruziyetinin araştırıldığı çeşitli hayvan deneylerinde sigara dumanı veya nikotine maruz kalmanın fetal sinir gelişimi üzerinde geniş çapta bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Hamilelik sırasında annenin sigara içmesi ile çocuğun davranışsal ve bilişsel gelişimi arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma, hamilelik sırasında maternal sigara içmenin dolayısı ile nikotin maruziyetinin 3 ila 24 aylık çocukların sinirsel gelişimi üzerinde önemli yan etkileri olduğunu göstermiştir[5]. Doğum öncesi dönemde sigara içmenin ve nikotin maruziyetinin fetüsteki nörokimyasal ve davranışsal değişiklikler üzerindeki etkilerini belirlemek ve incelemek için yapılan başka bir çalışmada, 58 Long-Evans sıçanı kronik olarak doğum öncesi ve sonrası nikotine maruz bırakılmıştır. Bu maruziyet sonucunda doğan yavrularda uzamsal öğrenmede eksiklikler, davranış ve dikkat bozuklukları olduğu gözlenmiştir. Bilişsel işlevdeki bu anormalliklerin, nikotin maruziyetinden uzun süre uzak durduktan sonra bile devam ettiği gösterilmiştir[5].

Gebelik döneminde annenin sigara içmesi ile fetüsün nikotine maruz kalması yenidoğanda düşük doğum ağırlığı ve doğum defektleri gibi çeşitli zararlı etkilere sebep olmaktadır. Çok sayıda çalışma gebelik döneminde maruz kalınan nikotinin sinirsel

gelişim üzerine çok çeşitli yan etkileri olduğunu göstermiştir. Ancak, bu etkinin gelişim sırasında özellikle embriyonik hücrelerin sinir hücrelerine farklılaşması sırasında hücresel düzeyde ne gibi değişiklikler yaptığı ile ilgili anlaşılmayan noktalar bulunmaktadır[5].

2.1.3. Nikotinin Nörogelişimsel Etkileri

Nörogelişimsel bozukluklar, öncelikle nörolojik sistem ve beynin işleyişi ile ilişkili bozukulardır. Çocuklardaki nörogelişimsel bozuklukların örnekleri arasında dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğu (DEHB), otizm, öğrenme güçlüğü, zihinsel özür, davranış bozuklukları, serebralpalsi, görme ve işitme bozuklukları sayılabilir. Nörogelişimsel rahatsızlıklarda genetik etmenlerin önemli bir rolü vardır, hatta zihinsel özürlülük gibi bazı nörogelişimsel hastalıkların belirli genlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, çoğu nörogelişimsel hastalığın, herhangi belirli bir nedenden ziyade karmaşık ve çoklu sebepleri vardır. Bu bozuklukların ortaya çıkmasında; muhtemelen genetik, biyolojik, psikososyal ve çevresel risk faktörlerinin etkileşimi söz konusudur. Annenin hamilelik sırasında alkol, tütün veya yasadışı uyuşturucu kullanımınıda içeren çok çeşitli çevresel risk faktörleri nörogelişimi etkileyebilir. Örneğin; dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğunun, genetik ve çevresel faktörlerin ortak etkisinden kaynaklandığını göstermektedir[4]. Çevresel faktörler üzerine yapılan araştırmaların çoğu fetal ortama odaklanmıştır. Gebelikte sigara kullanımının nörogelişimsel bozukluklar üzerinde etkili olduğuna dair raporlar vardır. Hamilelik sırasında annenin sigara içmesi, çok sayıda çalışmada çocukta DEHB riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir[4].

Kemirgenler üzerinde yapılan preklinik çalısmalar göstermektedir ki asetilkolin, fonksiyonel olarak ligand ilişkili iyon kanalı olan nikotinik asetilkolin reseptörlerini (nACRh) aktive ederek beyin maturasyonunde önemli bir rol oynamaktadır. Nikotinik asetilkolin reseptörleri fetüsün santral sinir sisteminde fazla miktarda bulunur ve kritik gelişme periyodunda beynin belirli bölgelerinde yoğunluğu artar. Bu reseptörlerin aktivasyonu nörotransmitter salınımını, gen ekspresyonunu, hücre devamlılığı, maturasyonu ve sinaps oluşumunu düzenler. Nikotin de asetilkolin gibi bu resptörlere etki eder. Prenatal ve postnatal nikotin maruziyeti beynin seksüel farklılaşmasını, hücrenin yasam süresini ve sinaps oluşumunu olumsuz yönde etkilemektedir[21].

Prenatal ve postnatal nikotine maruz kalan hayvan modellerinde görülmüştür ki nikotin nöroteratojendir; nöronal hücrelerin replikasyon ve farklılaşmasını kötü yönde etkilemektedir. Aynı zamanda sinaps bölgesindeki biyokimyasal anormalliklere sebep olmaktadır[21]. Bazı yapılan invitro çalısmalarda, nikotin hipokampüsteki progenitör hücrelerde apoptozisi tetiklediği gösterilmistir. Bundan dolayı, sigara içenlerin çocuklarında dikkat ve kognitif bozukluklar, öğrenme güçlüğü ve hafızada azalma, düsük IQ seviyesi, davranış bozukluklarının insidansında artış görülmektedir. Nikotinin kognitif fonksiyonlar üzerine olan teratojenik etkisi yaşa ve cinsiyete bağlıdır, uzun sürelidir ve AMPA reseptör fonksiyonu ile ilişkilidir[21].

2.1.4. Nikotinin Sinir Sistemine Etkileri

Nikotinin sinir sistemi üzerindeki etkisi daha çok sempatik sinir sisteminde gözlenmektedir. Nikotin, adrenal medullada epinefrin salgılanmasını artırır. Epinefrin salınımı preganglionik sempatik yollardaki nikotinik asetilkolin reseptörlerini uyarır ve asetilkolin salınımında büyük oranda artış meydana gelir. Periferik sinir sisteminde nöromüsküler kavşak, otonomik ganglionlar, adrenal medullanın kromafin hücreleri ve duyusal sinir uçlarında nACRh'lerinin aktifleşmesinden dolayı sigara bırakılmasının zor oldugu belirtilmiştir[25,26].

Nikotinin sempatik sistemini uyarması kardiyovasküler sistemde kalp hızı, miyokart kontraktibilitesini yükselterek kalp debisinde artışa neden olur. Nikotin, iskelet kası gibi dokularda damar genişlemesine, deri ve bazı bölgelerde de damar daralmasına sebep olmaktadır[17].

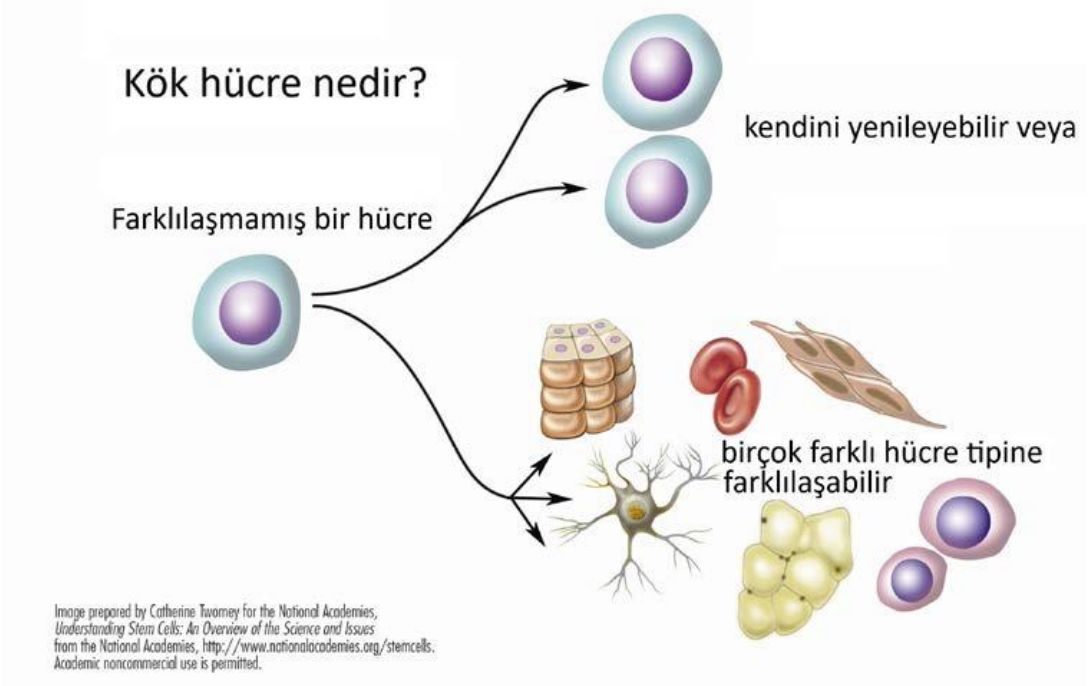
Nikotinin bazı psikoaktif etkileri olduğu da saptanmıştır. Nikotin bazı reseptörlerle hızlı bir şekilde etkileşip (dopamin, serotonin, asetilkolin, gammaamino butirik asit, glutamat) nöradrenalin gibi uyarıcı maddelerin salınımına neden olmaktadır[17,27]. Bu uyarıcı maddeler insanda akatizi'ye (huzursuzluk, yerinde duramama), iştah azalması ve metabolizma hızının artması gibi olaylara sebep olur[17].

2.2. Kök Hücreler

Kök hücreler vücudun doğal rezervuarıdır, kullanılmış veya hasar görmüş özel hücre stoklarını yeniler. Hepimizin içinde çalışan çeşitli kök hücreler bulunmaktadır. Örnek olarak; şu anda, kemik iliğimizde bulunan kök hücreler her gün ihtiyacımız olan milyonlarca yeni kan hücresini yapmaktadır[28]. Vücudumuzun çalışmasını sağlamak için sürekli olarak yeni hücreler üretmeye ihtiyacımız vardır. Kan ve kas hücreleri gibi bazı özelleşmiş hücreler, hücre bölünmesi yoluyla kendi kopyalarını yapamazlar, bunun yerine kök hücre popülasyonları vasıtasıyla yenilenirler[29].

Eskiden beri bilim insanları, çeşitli hastalıklara çare bulmaya çalışmıştır. Bu çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Özellikle doku-hücre-organ nakillerinde karşılaşılan zorluklar sonucunda; bireyin kendisinden alınan hücrelerin (kök hücreler) kullanımı gündeme gelmiştir. Yenileyici veya tamir edici tıp alanında kök hücrelerden yararlanılmaktadır. Kök hücre; uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneğinde olan, özelleşmemiş, farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneği olan ve hasarlı dokularda dokunun işlevini kazanmasını sağlayan hücreler olarak tanımlanmaktadır. Bu özellikleriyle vücuttaki somatik hücrelerden farklıdırlar.

Kök hücre terimi ilk olarak 1868 yılında Alman biyolog Ernst Haeckel tarafından filogenik ilişkilerin araştırılmasında "tüm çok hücreli organizmaların tek hücreli atası" anlamında kullanılmıştır. Sonraki yıllarda Haeckel, bu terimi filogeniden embriyolojiye genişleterek "organizmanın tüm hücrelerine yol açan döllenmiş yumurta" anlamında kullanılmasını önermiştir. 1892 yılında germ hücrelerinin embriyonik gelişimde ayrımını inceleyen Theodor Boveri, Haeckel'in bu tanımını bir adım daha ileri götürerek, kök hücreyi "döllenmiş yumurta ile olgunlaşmış germ hücreleri arasındaki germ hattı soyundaki hücreler" olarak tanımlamıştır. Aynı yıllarda, hematopoietik sistemin gelişimi ve yenilenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, kanda çeşitli hücre tiplerinin ortak bir öncü hücresinin olduğu gösterilmiştir. Bu gelişmeleri takiben, kök hücreler hematopoietik sistemin ortak öncüsünü ifade etmek için kullanılmaya başlanmıştır. Hematopoietik sistemde kök hücrelerin varlığının gösterilmesi ile merkezi sinir sistemi, bağırsak, deri gibi birçok dokuda kök hücreler belirlenmiştir. Kök hücre terimi ilk olarak yalnızca ilkel germ hücreleri için kullanılsa da günümüzde hem kendilerini yenileyebilen hem de bir veya birçok hücre tipine farklılaşabilen hücreler olarak tanımlanmaktadır[30](Şekil 1).



Şekil 1. Kök hücre nedir? Vücudu oluşturan hücre tiplerine farklılaşabilen aynı zamanda kendini yenileyebilme özelliğine sahip hücrelerdir[31].

2.2.1.Kök Hücrelerin Tarihçesi

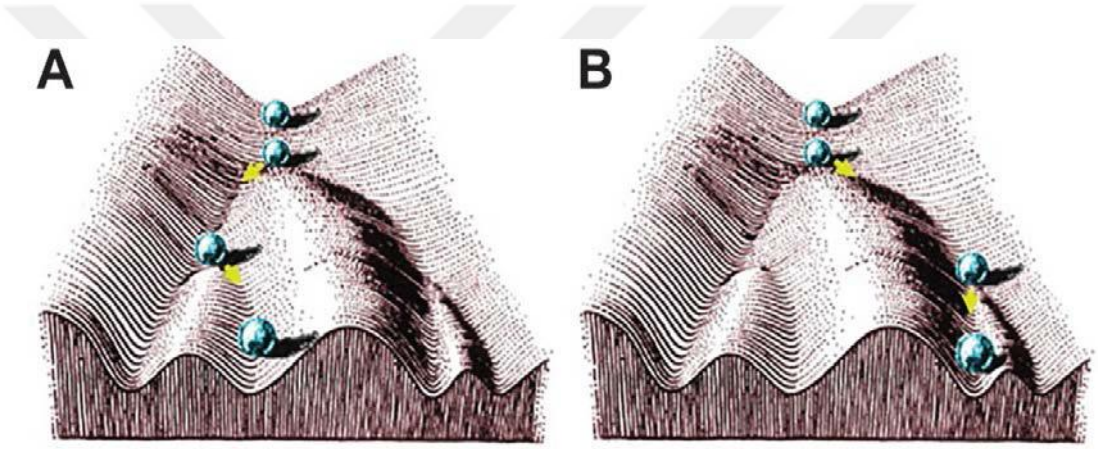
Kök hücreler, insan vücudunun özelleşmemiş hücreleridir. Bir organizmanın herhangi bir hücresine farklılaşabilme ve kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Kök hücreler hem embriyolarda hem de yetişkin hücrelerde bulunur. Birkaç özelleşme basamağı vardır. Gelişimsel potansiyeli her basamakta azalır ki bu, unipotent bir kök hücrenin, pluripotent bir kök hücre gibi birçok hücre tipine farklılaşamayacağı anlamına gelir.

Kök hücreler tüm doku ve organların gelişimi, büyümesi, bakımı ve onarımı için hayati önem taşır. Gelişimin erken aşamalarından ölene kadar insan vücudunda bulunurlar. Kök hücrelerin en önemli özelliği, hücre bölünmesi yoluyla kendilerini yenileyebilmeleri ve geniş bir hücre yelpazesine farklılaşabilmeleridir. Kendini-yenileme, kök hücrelerin sayısız kez bölünürken kök hücre özelliklerin korunması özelliğidir. Bu özellik gelişim sırasında kök hücre sayısının artmasını sağlar ve daha sonra bu hücrelerin yetişkin vücudunda yaşam boyu korunmasını sağlar. Bu olay, kök hücrelerin ana hücreye benzer kök hücre özelliklerine sahip bir veya 2 yavru hücre oluşturmak için asimetrik veya simetrik olarak bölünmesiyle gerçekleşir. Hücrelerin kendini yenileme kapasitesi, hücre mikroçevresinden gelen sinyaller tarafından

düzenlenen hücre içi mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir. Bu mikroçevre kök hücreleri korumakla birlikte bu hücrelerin fonksiyonunu düzenlemektedir.

Kök hücrelerin diğer bir özelliği, potensidir. Kök hücreler vücutta birçok dokudan izole edilebilmekle birlikte bu hücrelerin farklılaşma potansiyeli birbirlerinden farklıdır. Potensi, kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyelidir. Kök hücreler, bu farklılaşma potansiyellerine göre farklı gruplara ayrılabilir.

Kök hücrelerin potansiyeli, Waddington'un epigenetik modeli ile gösterilebilir[32]. Bu modelde, en tepedeki top en yüksek potansiyele sahip kök hücreyi temsil eder. Top ancak bir yöne doğru gitmektedir ve gittiği bu yönde kök hücre aşama aşama farklılaşır. Yolun sonunda ise en nihayet özelleşmiş bir hücre tipi ile sonlanır (Şekil 2).



Şekil 2. Waddington'un epigenetik modeli. Aynı noktadan başlayan vadinin tepesindeki misketlere, metaforda belirtilen aşağı yuvarlanma esnasında kanalize olunan farklı yolların (A ve B) görünmesi için diğer misketler eklenmiş ve sonlanımlarının farklı olduğu şematize edilmiştir[31].

2.2.2. Kök Hücre Türleri

Kök hücreleri farklı şekillerde sınıflandırmamız mümkündür. Kök hücrelerin farklılaşabilme kapasiteleri göz önüne alındığında 4 farklı grupta kök hücre olduğunu görürüz (Şekil 3). Hiyerarşinin en üst sırasında totipotent hücreler yer almaktadır. Totipotent hücrelerin bir alt basamağında pluripotent hücreler yer alır. Pluripotent hücreler blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler. Gelişim ilerledikçe hücreler pluripotensi özelliklerini kaybederek daha özelleşmiş hücrelere dönüşürler. Bulundukları dokuya özgü hücreleri oluşturabilen kök hücreler multipotent kök hücreler diye adlandırılır. Son dönemde multipotent kök hücrelerle yapılan çalışmalarda, sadece bulundukları dokuya ait hücreleri değil farklı dokulara ait hücreleri de meydana

getirebildikleri gösterilmiştir[30]. Bu tip farklılaşma transfarklılaşma veya plastisite olarak adlandırılır. Hiyerarşinin en altında ise unipotent kök hücreler ya da progenitor hücreler bulunur. Progenitor hücreler, kendini yenileme özelliğine sahip olmayıp, sadece özelleşmiş hatlara farklılaşma yeteneğindedirler[32].

2.2.2.1. Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücreler

2.2.2.1.1.Totipotent kök hücreler

Totipotent hücreler, bir oosit bir sperm tarafından döllenip zigot geliştiğinde meydana gelir. Zigot tüm bir organizmayı meydana getirebilme yeteneğindedir. Yani totipotent hücreler bir organizmanın gelişimi için gerekli olan embriyoyu ve embriyoya ait ekstraembriyonik membran ve dokuları oluşturabilirler[33]. Zigotun ilk 2 bölünmesi sonucu oluşan 4 hücreli aşamasındaki oluşan hücreler totipotent özelliktedir. Dolayısıyla totipotent kök hücreler en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerdir[34].

2.2.2.1.2. Pluripotent kök hücreler

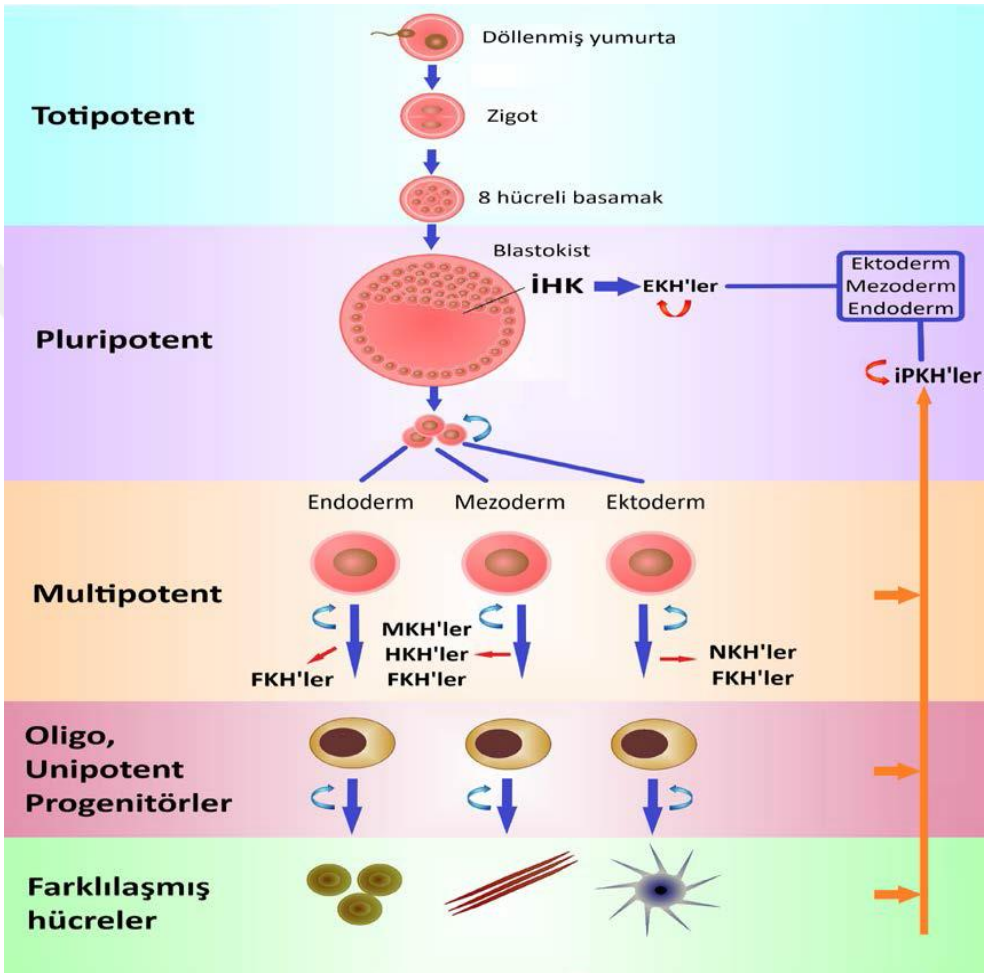
Pluripotent hücreler (embriyonik kök hücreler), embriyoya ait üç germ yaprağından gelişen tüm hücreleri yani; endoderm, mezoderm ve ektoderm olarak bilinen 3 germ tabakasına farklılaşabilme kapasitesine sahip hücrelerdir. Fakat ekstraembriyonik yapıları oluşturamazlar. Bu nedenletüm bir organizmayı oluşturabilme yeteneğinde değillerdir[35]. Zigotun birbirini izleyen 5-6 bölünmesiyle blastokist denilen yapı oluşmakta ve bu aşamadaki hücreler çoğalıp, farklılaşarak organizmadaki tüm hücre tiplerini oluştururlar. İnsanda 5-6 günlük blastokistin İç Hücre Kütlesinde (İHK) (İnner cell mass) yer alan hücreler pluripotenttir ve bütün hücre tabakalarını ve onlardan köken alacak diğer doku ve organ sistemlerini oluşturabilme kapasitesine sahiptir[36].

2.2.2.1.3. Multipotent kök hücreler

Yetişkin dokularda bulunan ve bir organ içindeki birçok belirli hücre soylarına farklılaşabilen kök hücrelerdir. Yetişkin vücudundaki kök hücreler multipotent veya unipotent özelliktedir[34].

2.2.2.1.4. Unipotent kök hücreler

Sadece tek bir hücre tipine farklılaşabilmektedir, ancak kök hücre olmayan diğer hücrelerden farklı olarak kendini yenileme kapasitesine sahiptir. Örneğin, progenitör hücreler tek bir hücre tipine farklılaşabilmelerine rağmen, kendini yenileyebilme kapasitesine sahip değildir[34].



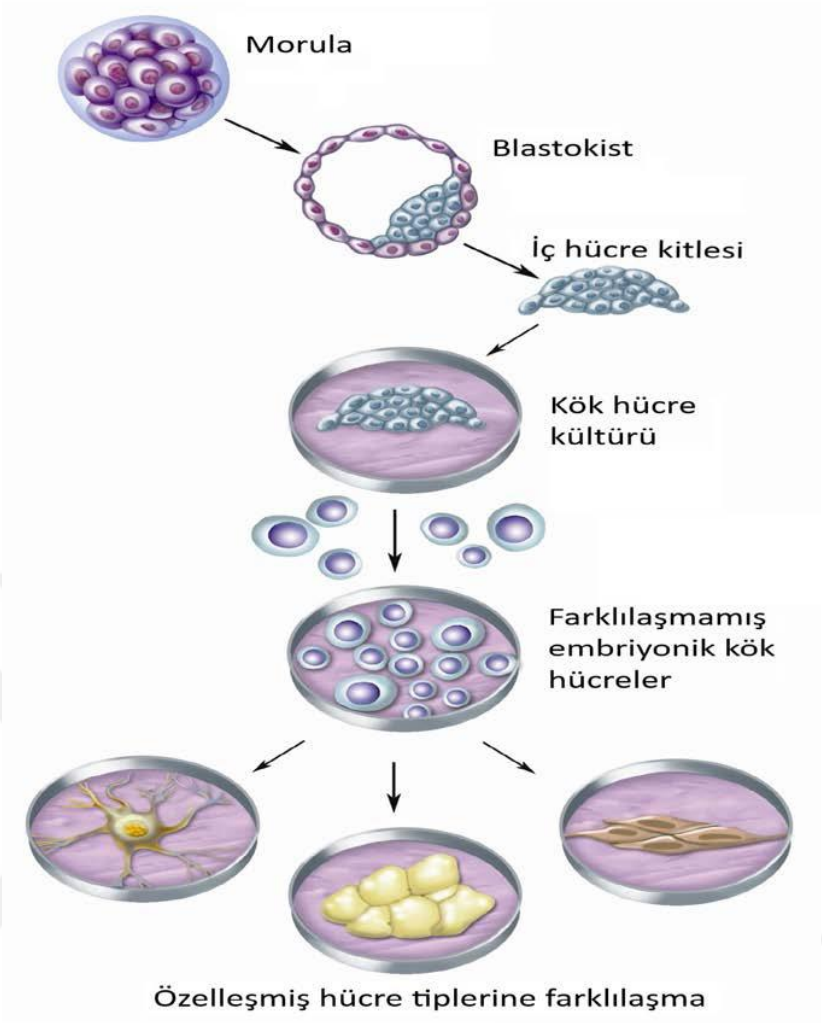
Şekil 3.Kök hücre potensilerine göre sınıflandırılması. Döllenme sonrası oluşan zigottan erişkin hücrelere kadar farklı hücre soylarına farklılaşma yeteneğine göre, yani potensilerine göre kök hücre çeşitlerinin şematik gösterimi. İHK (İç hücre kitlesi), EKH'ler (Embriyonik kök hücreler), iPKH'ler (İndüklenmiş pluripotent kök hücreler), MKH'ler (Mezenkimal kök hücreler), HKH'ler (Hematopoietik kök hücreler), FKH'ler (Fetal kök hücreler), NKH'ler (Nöral kök hücreler)[31].

2.2.2.2. Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kök Hücreler

Kök hücreleri bir başka şekilde sınıflandırmamız da mümkündür. Kök hücrelerin elde edildiği kaynak bakımından bir başka deyişle organizmada bulunduğu yer açısından sınıflandırmak da mümkündür. Kök hücreleri elde edildiği kaynak bakımından sınıflandıracak olursak (Şekil 6);

2.2.2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Gelişimin ilk 8-hücre aşamasından sonra, blastomerler totipotensi özelliklerini aşamalı olarak kaybederek 2 farklı soya farklılaşırlar. Bunlar; iç hücre kitlesi İHK ve Trofoektoderm (TE). İHK fetüsü oluşturan hücre grubu iken, TE ekstraembriyonik yapıların oluşumuna katılırlar. Embriyonik Kök Hücreler (EKH), blastokist aşamasındaki İHK içindeki endoderm, ektoderm ve mezoderm farklılaşabilen pluripotent hücrelerdir. In vivo'da İHK içindeki bu EKH'ler fetüsün gelişimi devam ettikçe hızlı bir şekilde farklılaşmaktadırlar. Ancak, bu hücreler izole edilip in vitro kültüre edildiğinde, istenilen herhangi bir hücre tipine farklılaşabilmektedir. 1981 yılında Martin ve Evans farelerin İHK'den EKH'leri elde etmişlerdir (Şekil 4). 1998'de ise Thomson ve arkadaşları İn Vitro Fertilizasyondan (IVF) üretilmiş insan embriyolarından insan EKH hücrelerini izole etmişlerdir[35]. Embriyonik kök hücreler biyomedikal araştırmalarda ve gelişimin erken dönemlerinin araştırılmasında yoğun olarak kullanılmaktadır[34].



Şekil 4. Embriyonik kök hücreler. Embriyonik gelişimin 4-5. Günlerine uterusa implante olmadan önceki 150-200 hücrelik blastokist aşamasında iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent kök hücreler[31].

2.2.2.2.2. Fetal Kök Hücreler

Gebeliğin sekizinci haftasından itibaren anne karnındaki canlıya fetüs denmektedir. Fetüste bulunan kök hücre özelliğindeki hücrelere fetal kök hücreler denmektedir. Fetal kök hücreler; fetüsün kan ve kemik iliği dokusu dahil diğer fetal dokularından da elde edilebilmektedir. Fetusta bulunan fetal kök hücreler genellikle puliripotent özellikteki kök hücrelerdir[37]. Bu pluripotent özellikteki kök hücrelerin yanında; fetal kan dokusu hematopoetik kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır. Fetal kan dokusundan elde edilen hematopoetik kök hücrelerin, kordon kanı veya yetişkin kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelere nazaran daha hızlı çoğaldığı gösterilmiştir[38].

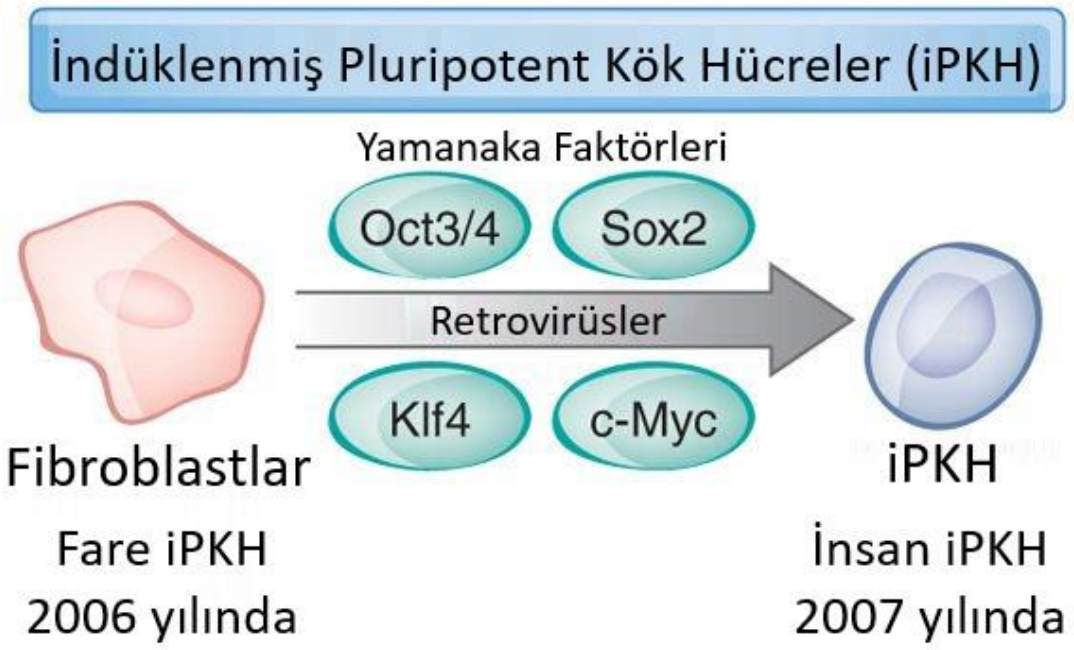
2.2.2.2.3. Kordon Kanı Kök Hücreleri

Günümüzde yapılan araştırmalar neticesinde yenidoğan göbek kordonundan elde edilen hücrelerin farklılaşma kapasiteleri daha sınırlı olan multipotent özellikte kök hücreler olduğu gösterilmiştir[34]. Son zamanlardayeni doğan kordon kanı veya bu kandan izole edilen kök hücreler saklanmaktadır.

2.2.2.2.4. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

İlaç geliştirilmesi, hastalık modellerinin oluşturulması ve özellikle gelişimsel biyoloji gibi çalışma alanlarında embriyonik kök hücrelerin sebep olduğu etik sorunların aşılması için öne çıkan bu hücreler, embriyonik kök hücreler gibi pluripotent özelliğe sahip hücrelerdir[34].

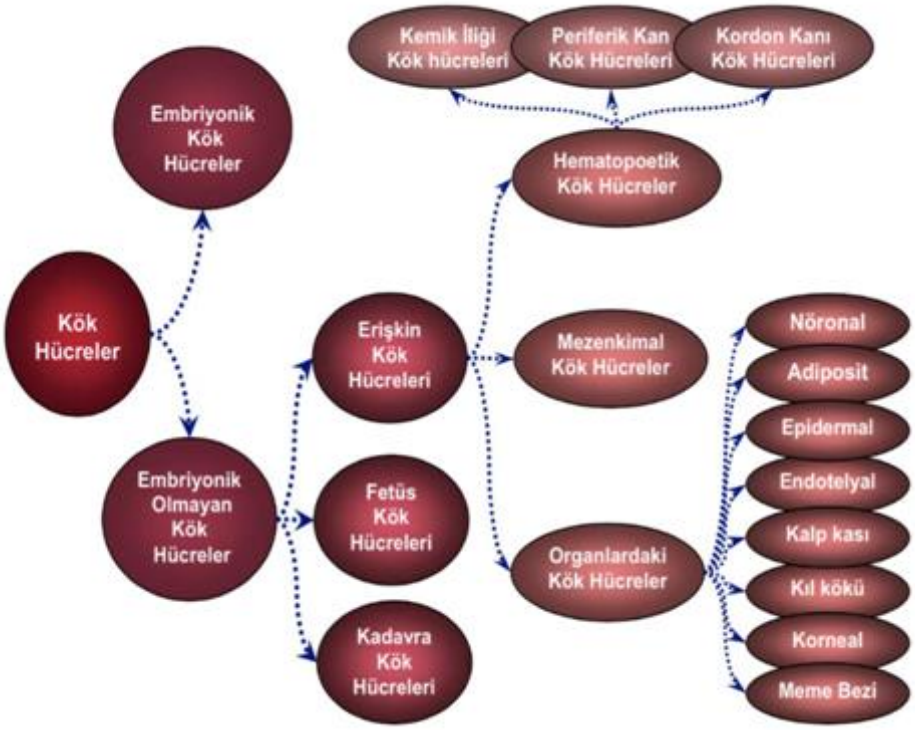
Bu hücreler tamamen laboratuvar ortamında somatik hücrelerin geri programlanması, bu hücrelere yeniden farklılaşabilme yeteneği kazandırılması ile oluşturulurlar (Şekil 5). 2006 yılında Shinya Yamanaka ve ekibi OCT4, SOX2, KLF4 ve C-MYC transkripsiyon faktörlerini kullanarak deri fibroblast hücrelerini geri programlayarak özelleşmiş bu hücrelere pluripotensi özelliği kazandırarak üretmişlerdir[39].



Şekil 5. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler. Yamanaka faktörleri olarak bilinen faktörlerin (Oct4/3, Sox2, c-Myc ve Klf4) ilk olarak 2006 yılında hayvan ve 2007 yılında insan somatik hücresine viral transfeksiyon ile aktarılması yoluyla üretilmiş pluripotent kök hücrelerdir[31].

2.2.2.2.5. Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler; yetişkin organizmada bulunan totipotent veya multipotent özellikteki, organizmada yaşam boyu süregelen yenilenme ve doku onarımı gibi yaşamsal süreçlerden sorumlu olan kök hücrelerdir. Doku bütünlüğü ve yaşamın devamı için gerekli olan; yeni hücreler üretme veya hasarlı dokuların yenilenmesi gibi görevler için gereklidir. En önemli görevleri bulundukları dokuyu korumak ve yenilemektir[34]. Yıllarca bölünmeden kalabilirler. Hastalık ve doku zedelenmesi gibi durumlarda aktifleşerek görevlerini yaparlar. Yetişkin kök hücreler diğer kök hücrelerin aksine, merkezi sinir sistemi, kemik iliği, retina, iskelet sistemi gibi birçok dokuda bulunmaktadırlar[40]. Adipoz kaynaklı kök hücreler, endoteliyal kök hücreler, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler gibi hücre çeşitleri yetişkin kök hücrelere örnek olarak verilebilir[34].



Şekil 6. Kaynaklarına göre kök hücreler[41].

2.2.2.2.6. Fare Embriyonik kök hücreleri

Fare embriyolarından elde edilen fare embriyonik kök hücreleri (EKH) ilk olarak petri kabının altındaki besleyici hücre tabakası olarak kullanılan fare embriyonik

fibroblastları (FEF) üzerinde büyütülmüş, daha sonra büyüyen koloniler pasajlanarak fare EKH üretilmiştir. Bu aşamalarda, kullanılan bazı fare suşlarının daha başarılı olduğu görülmüştür. EKH bir kez elde edildikten sonra kuramsal olarak sonsuz kez çoğalabilir ve tüm hücre tiplerine farklılaşabilir. Kültür koşullarında pasajlar boyunca normal bir karyotip sergiler, sayılarını her 12-15 saatte iki katına çıkarır ve hücre bölünme döngüsü içinde kısa bir Gl evresi geçirirler[34].

EKH'nin kültür ortamında çoğalabilmesi için mitozu durdurulmuş olan FEF'e gereksinim duyması bu hücrelerin EKH üzerinde özellikle kendini yenileme ve kendiliğinden farklılaşmayı engelleyen bazı önemli faktörleri barındırdığını gösterir. Birbirinden bağımsız çalışan iki araştırmacı grubu bu etkenin lösemi engelleyici faktör (LİF) olduğunu ortaya koymuştur[42, 43]. LIF sitokin grubu proteinlerin interlökin-6 (IL-6) ailesinin üyelerinden eriyik bir glikoprotein olup etkisini hücre zarında bulunan gp130 sinyal molekülü üzerinden gösterir.Çok sayıda hücresel olayda yer alan bu sinyal molekülü .STAT sinyal yolağını etkinleştirir. Diğer sitokin ailesi üyeleri olan IL-11, onkostatin M (oncostatin M, OSM), siliyer nörotrofik faktör (ciliary neurotrophic factor, CNTF) ve kardiyotrofin-l (cardiotrophin-l, CT-1) de EKH'nin pluripotensilerini korumada benzer etki gösterir. IL-6 ailesi sitokinlerinin yokluğu, FEF'in ortadan kalkması veya STAT3'ün etkinliğini yitirmesi gp130 molekülünün devre dışı kalmasına ve böylece hücrelerin farklılaşmaya başlamasına neden olur[34]. EKH'nin kültür ortamlarında fenotipik özelliklerinden olan embriyonumsu cisim (EC) oluşturma ve bir transkripsiyon faktörü (TF) olan Oct4 ifade düzeyi göz önüne alındığında optimum LIF derişiminin 2500 PM (pikomol; 10-12 M) olduğu bulunmuştur.Bu etki reseptör-ligand etkileşiminin belli bir eşik değerde olduğunu ve ancak uygun sitokinlerin bu etkileşimi sağlayabildiğini gösterir.

Bilindiği üzere kök hücrelerin tanımlanmasında en yaygın kullanılan ölçütler hücredeki özgün yüzey işaretleyicilerinin ve moleküllerin belirlenmesidir (Çizelge 1). Bir başka ifadeyle bir hücre grubunda bu işaretlerin yoğunluğu o hücre grubunun köklülük düzeyini gösterir. Fare kaynaklı EKH'de bugün kabul edilen en belirgin işaretler SSEA-I, 9130, Oct4, alkalin fosfataz (AF) ve telomeraz enzimi etkinliğidir[44]. Özellikle blastokiste giden süreçte Oct4'ün ortaya çıkışı ve İHK hücrelerine özgü hâle gelmesi, EKH'nin pluripotensi özelliğini kazandığı anlamına gelir. Oct4'ün pluripotensiyi koruyan düzeyinin yarısına düşmesi hücrelerin ilkel endoderm,

mesoderm ve ektoderm tabakalarını oluşturmasına sebep olur. Bir başka TF olan Nanog'un da pluripotenside önemli bir etken olduğu kabuledilir. İmplantasyon öncesi embriyolarda Nanog ifadesi sadece epiblast hücrelerinde bulunur[34].

Çizelge 1.Kök hücre belirteçleri[34]

Belirteç	*Fare EKH*	*İnsan EKH*	*Fare Epiblast KH*
Hücre yüzeyi ve çekirdek molekülleri			
SSEA-1	+	-	+
SSEA-3, SSEA-4	-	+	-
TRA-1-60, TRA-1-81	-	+	-
TRA-2-54	-	+	-
GCTM-2	-	+	-
TG343	bilinmiyor	+	bilinmiyor
TG30	bilinmiyor	+	bilinmiyor
CD9	+	+	+
CD133	+	+	+
Oct4	+	+	+
Nanog	+	+	+
Sox2	+	+	+
FGF5 ve brachyury	-	-	-

2.3. Farklılaşma

Farklılaşma, bir hücrenin (kök hücre) daha özelleşmiş işlevleri gerçekleştirebildiği başka bir hücre tipine dönüşmesidir. Farklılaşma bir dizi biyokimyasal ve fenotipik olayların yanı sıra gen ifadelerinin de değiştiği karmaşık bir süreçtir. Farklılaşma tek bir hücre olan zigottan, doku ve organ sistemlerinin olduğu çok hücreli organizmaların gelişimi sırasında sayısız kez meydana geldiği gibi yetişkin vücudunda da doku tamiri veya yenilenmesi gibi süreçlerde de gerçekleşir[45]. Hücrelerin farklılaşmasını kontrol eden mekanizmalarda sinyal iletim sistemi oldukça önemli bir rol oynar. Özellikle büyüme faktörleri, ligand gibi davranarak hücrede bulunan kendilerine spesifik reseptörlere bağlanarak, hücre içinde bir dizi fosforilasyon olayına sebep olur böylece transkripsiyon faktörleri, hücre içi iskelet proteinleri gibi önemli proteinler aktif hale gelir. Sonuçta hücrede kökten bir değişim meydana gelmiş olur[34].

Bir hücrenin yapısal ve işlevsel olarak yeni özellikler kazanmasına farklılaşma (diferansiasyon) denir. Ayrıca, kök hücre biyolojisinde kullanılan, geriye farklılaşma (dedifferansiasyon) ve öteye farklılaşma (transdiferansiasyon) gibi bazı terimler vardır[34]. Farklılaşma sürecini tamamlamış veya bu yolda ilerleyen bir progenitör

hücrenin, erken gelişim evresindeki düzeyine geri dönmesine dediferansiasyon denilir ve indüklenmiş pluripotent hücreler bunun bir örneğidir. Transdiferansiasyon yetişkin bir hücrenin, yetişkin başka bir hücreye farklılaşmasına denir. Transdiferansiasyonda süreç ya direk gerçekleşir ya da ara basamak olarak dedifferansiasyon da görülebilir[46]. Fibroblastların endotelyal hücrelere dönüşümü direk transdiferansiasyona bir örnektir.

Farklılaşmanın başlama aşaması "kararlanma (determinasyon)" olarak adlandırılır. Kararlanma sürecinde kök hücreler geri dönüşümsüz olarak farklılaşma kararını vermektedir. Bir kök hücre, spesifik bir hücre tipine farklılaşacak şekilde kararlanmışsa, ortamda farklılaşma için gerekli koşullar bozulsa bile o hücre kararlaştırdığı hücre karakterini kazanır böylece o hücreye ulaşmayı garantiler. Bir kök hücrenin farklılaşma yolundaki kararlanma aşaması, bu hücrenin bölünme zamanını ve ne yönde farklılaşacağını belirler[47].

Gelişimde farklılaşma hem hücredeki gen seti hem de hücrenin bulunduğu çevreden gelen sinyal tarafından indüklenir. Çevreden gelen sinyaller, komşu hücrelerden gelen sinyaller olabildiği gibi uzak hücrelerden hücreler arası matriks aracılığı ile de gelebilir. Ayrıca bu sinyallerin hücrenin mikroçevresinde bulunma süresi de farklılaşmada önemli rol oynar.

Farklılaşmada etkili olan başka bir mekanizma ise asimetrik hücre bölünmesidir. Hücrenin sitoplazmasında ve/veya çevresinde meydana gelen sinyallerin yönü ve uzaysal dağılımlarının farklı olmasına bağlı olarak iki yavru hücre birbirinden farklı bir fenotipe sahiptir. Bu durumda, farklılaşma sinyalleri, buna yanıt veren reseptörlerin düzeyi ve gen düzenleyicileri de farklı olacaktır. Sonuçta her iki hücre farklı bir yol seçerek bu hücrelerden biri daha özelleşmiş bir hücre olma yolunda ilerlerken, diğeri ise farklılaşmamış halde kalmaya devam edecektir.

İn vitro fare EKH üzerinde yapılan deneylerde, bu hücrelerin kardiyojenik, miyojenik, nöronal, epiteliyal ve vasküler düz kas hücrelerine farklılaşabildiği ve dokuya özgü genleri, proteinleri ve iyon kanallarını eksprese edebildiği gösterilmiştir[34].

2.3.1. Farklılaşmanın Epigenetik Kontrolü

Gametler hariç vücuttaki her hücre aynı genetik yapıya sahip olup bir hücre tipini diğer bir hücre tipinden ayıran şey ise gen ifade farklılıklarıdır. Dolayısıyla bir kök hücrenin, kök hücre, öncü hücre veya özelleşmiş olgun hücre olarak kalmasının

kararı, epigenetik mekanizmalar tarafından verilmektedir ve epigenetik mekanizmalar hücrenin farklılaşmasında önemli bir faktördür. Hücrelerin pluripotensi düzeyini belirlemede en etkili transkripsiyon faktörleri olan Oct4, Sox2 ve Nanog proteinleri, kromatin yapısı, histon değişimleri ve DNA metilasyonu ile hedef genlerin ifadesini indükler veya baskılar. Ayrıca DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen CpG dinükleotidlerindeki sitozinlerin metilasyonu DNA üzerinde kalıtılabilen bir baskı oluşturur. Örneğin EKH'lerde CpG bölgelerinin büyük bölümü metilsiz olmakla birlikte, farklılaşma ile Oct4 ve NANOG gibi bazı gen grubu metile olur ve bu genlerin ifadeleri baskılanır. Farklılaşmayı düzenleyen epigenetik mekanizmalar ise hücrede sinyal iletim sisteminden etkilenir, hücrenin bulunduğu çevrede bulunan büyüme faktörleri veya komşu hücrelerden salgılanan sinyal molekülleri hücre içinde transkripsiyon faktörleri üzerinden gen ifadesini değiştirebilmektedir[48].

1957 yılında C. H. Waddington tarafından ortaya atılan Epigenetik Vadi Modeli'nde, farklılaşma kararını vermekte olan hücrelerin vadiden aşağı yuvarlanan miskete benzetilmiştir. Waddington hücrelerin farklılaşmaya doğru giderken bazı ortak noktalardan geçtiğini, bir noktada birbirinden ayrıldığını ve her bir hücre grubunun farklı yollara girip yolun sonuna kadar ilerlediğini öne sürmüştür[49]. Bu vadide kromatin düzenleyicileri, DNA metilasyonunda yer alan proteinler (DNA metiltransferazlar ve DNA demetilazlar), histon değişimleri yapan proteinler (histon asetiltransferazlar, histon demetilazlar, histon metiltransferazlar histon demetilazlar) ve transkripsiyon faktörleri önemli rol oynamaktadır[48].

2.3.2. Nöronal Farklılaşma

Memelilerin sinir sisteminin karmasık gelişimi, embriyogenez ve erken postnatal süreçte bir dizi epigenetik ve hücrenin endojen sinyalleri ile kontrol edilir. Gastrulasyondan sonra ilk gelişen doku taslaklarından birisi sinir sistemidir. Sinir sisteminin gelişmesi nöral kök hücre farklılaşmasını gerektirmektedir. Başlangıçta ektoderm tabakası nöral yol ve epidermis yolu olmak üzere 2 farklı yöne farklılaşabilir. Nöral farklılaşma sürecinde, ektoderm kökenli hücrelerden nöral plaka gelişmesi uyarıcı-düzenleyici sinyaller tarafından başlatılır. Bu nöral uyarım rastgele olmamakla beraber, epidermis yönündeki gelişimin baskılanmasıyla oluşur. Gelişim sürecinde, gastrulasyon sırasında kemik morfogenetik protein (BMP) sinyallerinin baskılanmasıyla

nöral doku oluşmaya başlar, eğer bu sinyaller baskılanmaz ise nöral farklılaşma yerine epidermis yönüne farklılaşma gerçekleşir[50]. Notokordda, chordin, noggin ve follistalin proteinleri sentezlenir ve bu proteinler BMP'i baskılar.

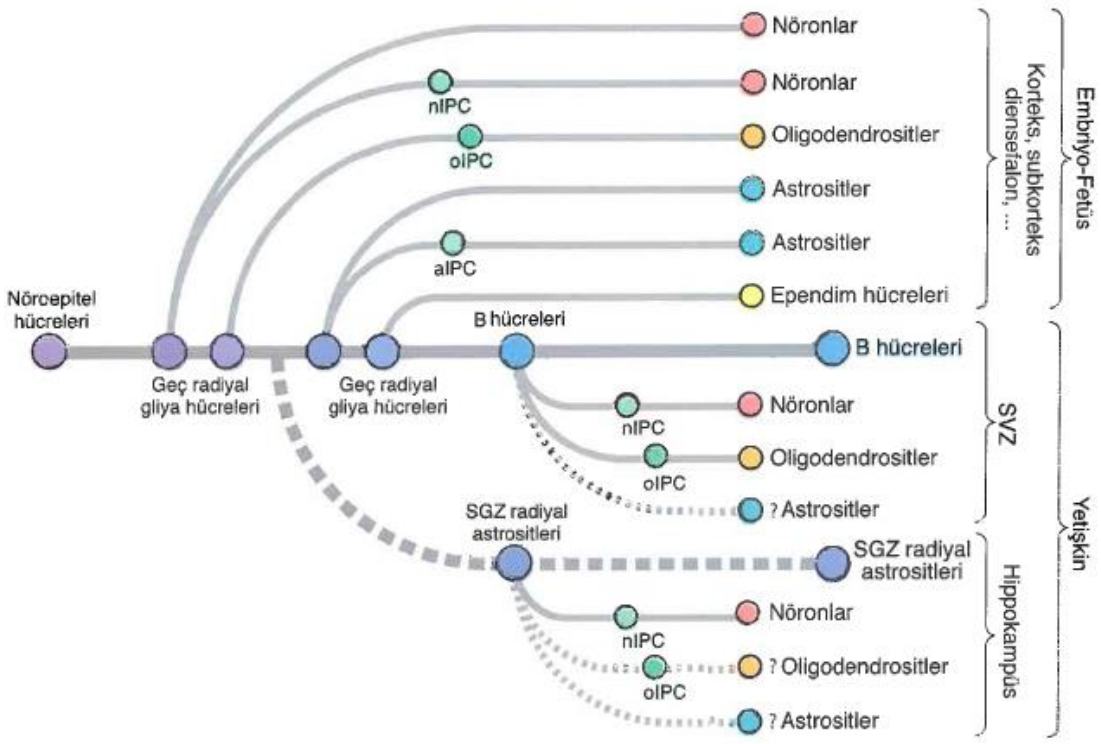
Ayrıca nöronal gelişimde oldukça önemli olan Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) sinyalleri de gastrulasyondan hemen önce ortaya çıkmaktadır. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) ve anti-Wnt sinyal molekülleri olan cerberus, dickkopf ve frzb nöral uyarımda rol oynayan diğer faktörler arasında gösterilebilir[51].

Nöral plakanın oluşumundan sonra, buradaki hücreler bir dizi fenotipik ve moleküler değişiklikler geçirerek nöral katlantıları oluşturur ve daha sonra nöral tüp meydana gelir. Nöral tüp oluşumundan sonra, nöral tüpün iki ucu kapanır. Tüm bu süreç insanda 25-27. günlerde gerçekleşir. 5-6. Haftalarda ön beyin (prozensefalon), orta beyin (mezensefalon) ve arka beyin (rombensefalon) taslakları oluşarak bunlar da alt bölümlere ayrılır[34].

2.3.3. Nöral Kök Hücreler

Nöral plakalardan sonra oluşan nöral katlantılar, nöroepitel hücrelerin simetrik olarak bölünmesi ile çoğalır. Bu hücreler, Radiyal gliya (RG) olarak adlandırılan spesifik hücrelere dönüşür. Bu RG hücreleri bipolar bir hücre olup, bir kolu beyin zarının altındaki marfinal bölge denilen beyin dokusuna uzanırken, diğer bir kolu ventriküler bölgesine (VB) uzanır. Ayrıca bu hücreler gliya hücrelerinde bulunan GFAP (glial fibrillmy acidic protein) ve astrositlere özgü olan GLAST (glutamate aspartate transporter) proteinlerini sentezlemesi gibi glial hücrelerin pek çok özelliğine sahiptir. Ayrıca BLBP (brain lipid-binding protein), tenascin C (TN-C), nestin, vimentin sentezini de gerçekleştirir. Bu RG hücreleri, gerektiğinde çoğalarak nöron veya gliyaya farklılaşabilen bir ara progenitör hücreye dönüşürler. Dolayısıyla RG hücreleri sinir sisteminin ilk ortaya çıkan nöral kök hücreleridir (NKH). Bu ara progenitör hücrelerin çoğalması subventriküler bölgede (SVB) gerçekleşir. Embriyogenezin erken süreçlerinde VB ve SVB'de başlayan nörojenik etkinlik yenidoğan ve yetişkin döneminde de sürer. Nöron alt tipleri belirli bir göç yolunu izleyerek, hedef bölgelerine ulaşır ve bu bölgede akson ve dentritlerini uzatıp sinapslar oluşturarak farklılaşmalarını tamamlarlar. NKH olan RG hücrelerinin farklı ara progenitör hücrelere veya farklı nöron oluşturabilme yetenekleri farklı transkripsyon faktörlerine sahip olmasından

kaynaklanmaktadır. Farklı RG hücrelerinin Pax6, Emxl, Gshl, Gsh2, Er81, Sp8, Nkx2-1, DIXI, DIx2 ve Olig2 gibi transkripsiyon faktörleri içerdikleri belirlenmiştir. Bunların her biri tek başına veya birlikte bulunması, gelişmekte olan sinir sisteminde farklı nöron alt tiplerinin ortaya çıkmasına yol açar[34].



Şekil7. Nöron hücrelerin farklılaşma basamakları. Eflatun-mavi renkli boncuklar nöroepitel hücrelerinden yetişkinde ki NKH aşamasına kadar olan hücreleri göstermektedir. Orta çizginin üstünde kalan bölüm embriyo-fetüs dönemindeki gelişmeyi, altında kalan bölüm ise yenidoğan ve yetişkindeki gelişmeyi göstermektedir. Düz çizgiler deneysel verilere, kesikli çizgiler ise varsayımlara göre çizilmiştir[34].

Sinir sisteminin gelişimi postnatal evrede de devam etmektedir ve bu nedenle postnatal dönemde ve yetişkin beyninde de NKH bulunur. Bu hücreler hem nöronları da hem de gliya hücrelerini üretebilmektedir (Şekil 7). Postnatal ve yetişkin beyninde nöronlar lateral ventriküllerin duvarlarındaki SVB'de oluşur. Embriyo döneminde oluşan RG hücrelerinin bir kısmı multipotent özelliklerini koruyarak doğum sonrası dönemlerde kullanılır.

2.3.4. In Vitro Farklılaştırma

EKH'lerin in vitro farklılaşma kapasiteleri çok yüksektir. EKH'nin uygun nöron alt tiplerine yönlendirilebilmesi için öncelikle nöronal uyarımın uygun biçimde gerçekleştirilmesi gerekir. Bunun için 3 teknik uygulanabilir;

i) Embriyonik body (EB) oluşturulmasından sonra nöronal uyarım,
ii) stroma hücrelerinden oluşan besleyici tabaka üzerinde nöronal uyarım,
iii) herhangi bir destekleyici hücre ile kültüre etmeksizin nöronal uyarımın var olan programa göre kendiliğinden oluşmasının gerçekleştiği kültür yaklaşımlar

EKH'ler embriyonik body oluşturmasından sonra (yaklaşık 4 gün) FGF (Fibroblast growth factor, fibroblast büyüme faktorü) içeren kültür ortamına tekrar ekilerek nöron öncülleri çok katlı rozetler oluşturur. Nöron öncüleri çevrelerindeki hücrelerden enzimle ayrıştırıldıktan sonra nöroküre oluşturma ortamlarında ve yine FGF2 varlığında kültüre edildiğinde nöron ve astrositler oluşmaya başlar. Ortaya çıkan en temel hücrelerden birisi GABAerjik ve glutamaterjik nöronlardır. Bu rozetlerin in vitro ortamda nöral tübe benzer yapıları oluşturabileceği öne sürülmüştür. İnsana ait EKH'lerde çok sayıda rozet benzeri yapılar oluşurken, fare EKH'lerinde bu rozet benzeri yapılan nadiren görülür. Embriyonik kök hücre hatlarının Retinoik asit (RA) muamelesi sonucu nöral hücrelere farklılaştığı gösterilmiştir. Embriyonik kök hücrelerin nöral farklılaşmanın uyarılması için RA haricinde βNGF (Beta Nerve Growth Factor, beta sinir büyüme hormonu), FGF, N2 medyumu da kullanılmaktadır[34].

Nöral farklılaşmayı desteklemek için ayrıca insan EKH'leri, gonad ve kemik iliği gibi birçok organda bulunan gevşek bağ doku hücreleri olan ve diğer hücrelerin işlev görmesinde matriks desteği sağlayan stromal hücreler (PA6, MS5, S2 gibi) ile birlikte kültüre edilebilmektedir. Bu destek hücreleri kullanarak dopaminerjik nöronların başarı ile oluşturulması, nöral farklılaşma için stromal türevli indükleyici aktivitelerin gerekli olduğunu göstermektedir[51].

RA, nöral gelişimde oldukça önemli olup, yetişkinlikte akson rejenerasyonu, erken embriyonik dönemde ise nöral plakanın ve nöral tüpün nöronal farklılaşmasında önemli rol oynar. RA aracılı nöronal ve glial farklılaşma, transkripsiyon faktörlerini (BRN2, NFkB, SOX1, SOX6 vb.), hücre sinyal moleküllerini veya ilişkili hücre

yapılarını (seramid, PSEN1, MAP2 vb.) ve hücre dışı molekülleri (WNT sinyallemesi) içeren farklı genlerin aktivasyonu ile meydana gelir. Bu farklı moleküllerin aktivasyonu, kompleks moleküler yolakların nöronal farklılaşmayı düzenlediğini göstermektedir. Fare ve insan EKH'lerinin nöral farklılaşması için RA hücre kültür ortamında 1-10 μM konsantrasyonlarda kullanılabilmektedir[52].

Kemik morfogenik proteinleri (BMP), TGFβ (dönüştürücü büyüme faktörü) süper ailesinin üyeleri olup, merkezi ve periferik sinir sisteminin gelişiminde çok sayıda rol oynar. Omurgalılarda notokord ve taban plakasından salgılanan noggin, kordin, follistatin gibi BMP-antagonistlerinin BMP sinyalinin baskılanması, gastrulasyon sırasında ektodermden gelen nöral indüksiyonu sağlar. Ancak gelişimin ilerleyen aşamalarında, BMP sinyalleri nöral ve astro-gliyal hücrelerin oluşumunu indükleyerek önbeyin hücrelerinin özelleşmesini sağlar. Nöral farklılaşmayı indüklemek için, BMP antagonisti olan noggin, laminin veya matrigel üzerinde kültüre edilen insan EKH'larının veya EB kültüründe kullanılmıştır. Noggin ile muamele, nöral transkripsiyon faktörleri olan Pax6 ve Sox2'nin ve nestin gibi diğer nöral belirteçlerin ekspresyonunu artırmaktadır. Noggin ile muamele edilen insan EKH'lerinin nöral progenitörler oluşturduğu ve nörogenezi artırdığı gösterilmiştir[51].

Raf, MEK (mitojenle aktive edilmiş ve hücre dışı sinyal regüle edilmiş kinaz) ve MAPK (mitojenle aktive edilmiş protein kinaz) gibi kinaz yolaklarını aktive eden FGF reseptörleri aracılığıyla etki gösteren FGF omurgalı embriyolarında nöral hücrelerin ve nöral dokuların indüksiyonunda rol oynamaktadır. FGF, erken embriyonik gelişim sırasında nöral farklılaşmada iki farklı rol oynayabilir; 1) erken aşamada nöral durumu indükleyebilir. 2) BMP sinyallerinin antagonisti olarak davranarak nöral farklılaşmayı stabilize eder. Dolayısıyla FGF sinyallemesi ile erken dönemde ön beyin nöral hücre öncüllerinin hayatta kalması ve çoğalmasını artırdığı için, EKH lerin in vitro ortamda nöral hücrelere farklılaştırılması, nöral progenitörlerin izolasyonu ve kültürünün devamlılığının sağlanmasında FGF kullanılmaktadır[51].

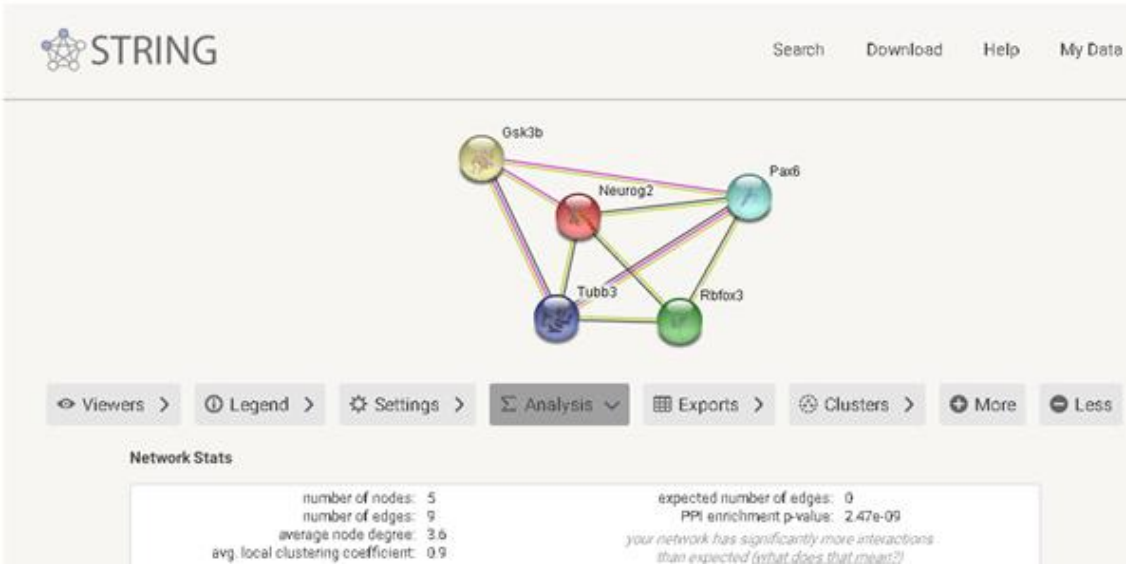
2.4. Tez çalışmasında incelenen genler

Zigot oluşumu ile başlayıp bir dizi hücresel bölünme, farklılaşma ve çoğalmanın gerçekleştiği perinatal dönemde; çeşitli çevresel ajanlara maruziyetin, yaşamımızın sonraki evrelerinde iz bırakacak etkileri olabileceği düşüncesi ile yola çıktığımız bu tez

çalışmamızda; fare embriyonik kök hücrelerini in vitro ortamda nöron hücrelerine farklılaştırıp, farklılaşma esnasında nikotine maruziyetin etkilerini inceledik.

Nikotine maruziyetinin yetişkinler ve fetüs üzerinde zararlı etkileri olduğu gösterilmiştir. Ancak bu durumun, gelişim ve nöronal farklılaşma sırasında, özellikle hücresel seviyede nasıl olduğu araştırılmaya muhtaç bir konu olmuştur. Bu sebeple, bu tez çalışmamızda özellikle sinirsel farklılaşmada rol alan genlerin ifadesinde herhangi bir farklılık olup olmadığı, dahası bu farklılıkların, ileriki dönemlerde herhangi bir hastalık ile ilişkili olma olasılığını araştırmayı amaçlayarak; nöronal farklılaşma ve olgunlaşmada rol aldığı bilinen ve çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiş aday genleri literatür ışığında seçtik. Bu genlerin birbiri ile muhtemel ilişkisini araştırmak için bir biyoinformatik araç olan string veritabanı kullanılmıştır. Bu genler arasında bulunan ilişki aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 8).

Bu amaçla tez çalışmamızda RBFOX3, GSK3B, NEUROG2, PAX6 ve TUBB3 genleri araştırılmıştır.



Şekil 8. Seçilen genlerin arasındaki ilişki

2.4.1. RNA Bağlayıcı Fox-1 Homolog 3 (RNA Binding Fox-1 Homolog 3/RBFOX3)

RNA bağlayıcı Fox-1 ailesinin üç üyesinden biri olan Rbfox3 alternatif kırpılmanın düzenlenmesinde rol aldığı düşünülen RNA bağlayıcı bir proteindir[53]. Memelilerdeki Rbfox ailesi, Rbfox1 (Fox-1 veya A2BP1 olarak da bilinir), Rbfox2

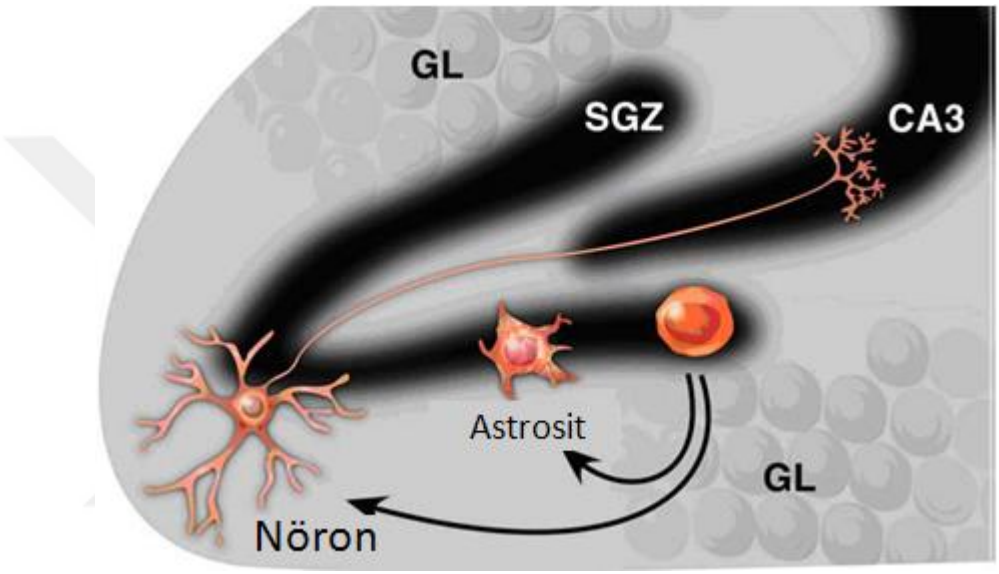
(Fox-2, Rbm9 veya Fxh olarak da bilinir) ve Rbfox3 (Fox-3, D11Bwg0517e veya NeuN olarak da bilinir) olmak üzere üç üyeden oluşur[54,55]. Rbfox ailesi, bir RNA bağlayıcı protein ailesi olup, alternatif kırpılmayı düzenler ve yukarıda bahsettiğimiz yüksek oranda korunmuş üç gen tarafından kodlanır: Rbfox1, Rbfox2 ve Rbfox3[56,57]. Rbfox1, nöronlarda, kalpte ve iskelet kası miyositlerinde eksprese edilirken, Rbfox2, nöron ve embriyonik kök hücreler dahil olmak üzere yaygın olarak çeşitli doku ve hücre tiplerinde eksprese edilir. Buna karşılık, Rbfox3 ifadesi nöronlarla sınırlıdır[54,55].Omurgalı merkezi sinir sisteminde (MSS), üç Rbfox proteininin tümü ifade edilmektedir[58]. Yapılan çalışmalar Rbfox3'ün beyin fonksiyonunda önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Alternatif kırpılmanın ağırlıklı olarak beyinde olduğu ve bu kırpılmanın sonucu olarak oluşan proteinin; nöronal devre gelişimi, sinaptik fonksiyon veya sinaptik plastisite gibi farklı görevler için çeşitlendiği gösterilmiştir[59].

Fare embriyonik karsinoma hücrelerinin retinoik asit ile farklılaştırıldığı çalışmalarda nöronal farklılaşma sırasında Rbfox3'ün indüklendiği gösterilmiştir[55,60]. Yine omurilik gelişimini araştıran, siRNA aracılı fonksiyon kaybı çalışmalarında; postmitotik nöronların; nöronal farklılaşması için Rbfox3'ün gerekli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bir sinyal adaptör proteini kodlayan *Numb* pre-mRNA'sının Rbfox3'ün hedefinde olduğunun gösterilmesi, Rbfox3 bağımlı *Numb* alternatif kırpılmasının nöronal farklılaşma ve beyin gelişimi sürecinde önemli bir rol aldığına kanıt oluşturmaktadır[58].

Kayda değer bir diğer nokta ise, Rbfox3'ün NeuN antijeni olduğu konusundaki keşiftir. Bu antijen 20 yıldır omurgalı gelişimi ve kök hücre farklılaşmasında rol alan Nöronal markır olarak tanımlanmıştır[55,61]. Pre-mRNA alternatif kırpılma regülatörü olan ve sonradan Rbfox3 olarak tanımlanan Nöronal çekirdekler Geni (Neuronal nuclei /NeuN)[56,57] farklı türler arasında yüksek oranda korunmuştur ve post-mitotik nöronların iyi bilinen bir belirtecidir[53,61,62].

Rbfox3'ün insanda nörolojik fonksiyonlarda rol aldığı düşüncesi, Rbfox3 mutasyonlarının insanlarda nörogelişimsel gecikme[63,64], bilişsel bozukluklar[65], otistik özellikler[64] ve epilepsi[66] ile ilişkilendirildiği çalışmalar sebebiyle ortaya çıkmıştır. Rbfox3 mutasyonlu bireylerde gözlemlenen bilişsel bozukluklar ve nöbete yatkınlık ile birlikte Rbfox3'ün nöronal farklılaşma ve olgunlaşmadaki muhtemel önemi de göz önüne alındığında, dentat granül nöronların yaşam boyunca sürekli olarak subgranüler

bölgedeki nöral progenitör hücrelerden üretilmeye devam ettiği beyindeki benzersiz bir bölge olarak görülen hipokampusun dentat girusunun Rbfox3'ün genetik bozulmasından özellikle etkilenebileceği sonucuna varılmıştır[59]. Hipokampal (Dentate Gyrus) DG'nin öğrenme, hafıza, biliş ve anksiyetide önemli bir rolü vardır[67,68]. Dahası, DG, aksi takdirde temporal lob nöbetlerine sebep olabilecek hipereksitabiliteye karşı koruma sağlamak için önemli bir filtre görevi görür. Bu sebeple Rbfox3 mutasyonlu bireylerde gözlenen primer fenotiplere DG işlev bozukluğunun sebep olduğu düşünülmektedir[59].



Şekil 9. Yetişkin Dentate Gyrus'unda Neurogenesis. Granuler tabaka (GL), Subgranular zone (SGZ)[69].

2.4.2. Glikojen sentaz kinaz 3-β (GSK3B)

Glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), çeşitli substratların serin ve treonin bölgelerini fosforile eden bir kinazdır[70]. İlk olarak 1980'lerde keşfedildi ve fosforilasyon yoluyla inhibisyonuna neden olduğu glikojen sentaz aktivitesini düzenleyen kinazlardan biri olarak tanımlandı[71].

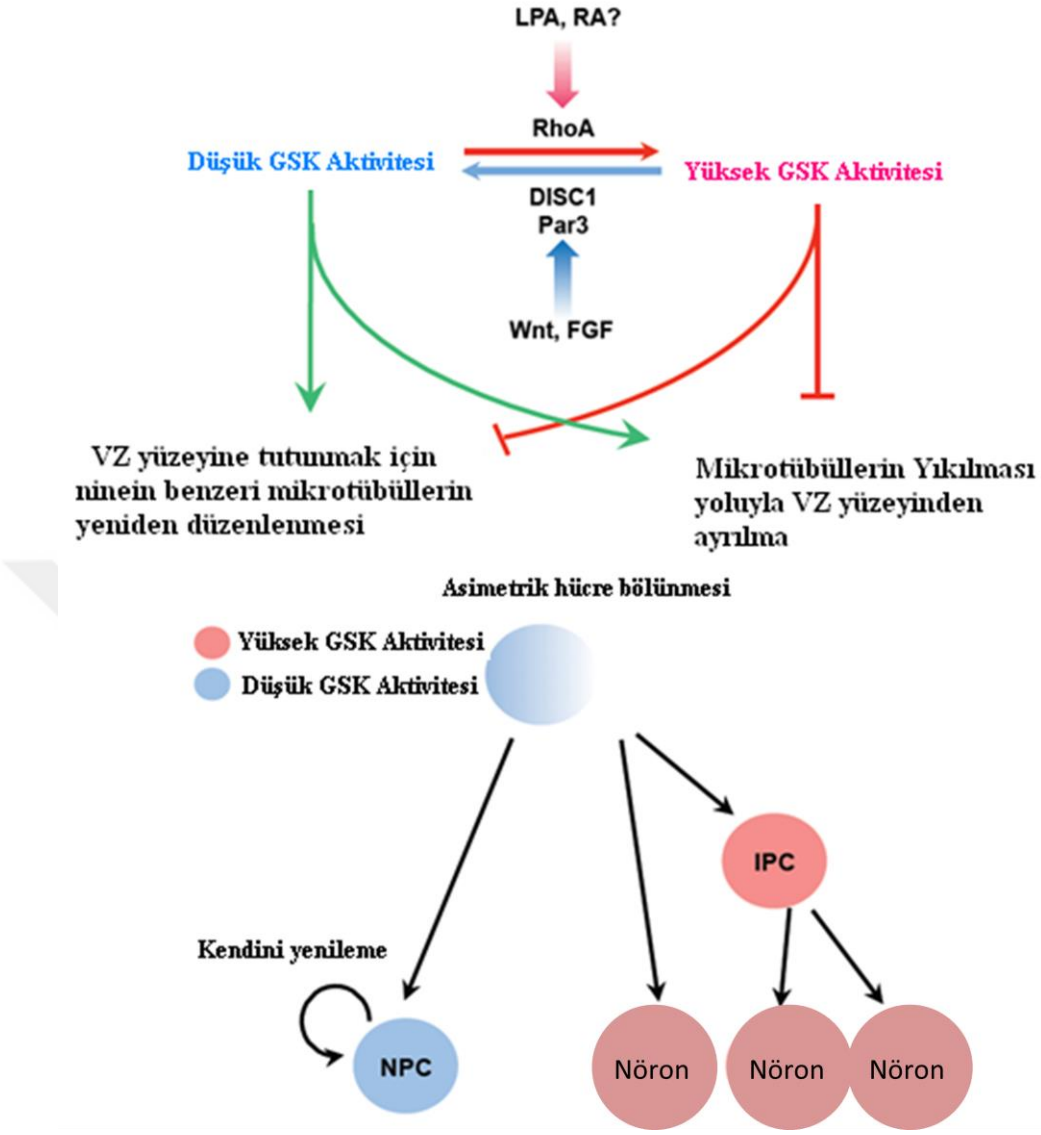
GSK3 başlarda glikojen sentazı fosforile etme ve glikoz metabolizmasını düzenleme fonksiyonu göz önüne alınarak adlandırılmıştır. Ancak, bu çok işlevli kinazın, daha sonra hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, farklı hücrelerde sinyal düzenlenmesi, apoptoz, hücre proliferasyonu ve büyümesini de içeren çok sayıda hücresel işlevde kritik bir bileşen olduğu bulunmuştur[71-77]. Buna ilaveten, son zamanlarda artan kanıtlar, GSK3 sinyal yolunun, nöronal farklılaşma, proliferasyon ve nörogenez, gibi nöral gelişimin farklı yönlerinin düzenlenmesinde kilit rol oynadığını

göstermektedir[77,78]. Dahası GSK3 reseptör trafiği ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde rol oynamaktadır[79]. Tavşan iskelet kasından GSK3'ün elde edildiği bir başka çalışmada, GSK3'ün hücre apoptozu, farklılaşma, çoğalma ve mikrotübül morfolojisi dahil olmak üzere birçok hayati hücresel sürecin düzenlenmesinde yer aldığı gösterilmiştir[79,80].

GSK3 temel olarak aktif bir gendir ve merkezi sinir sisteminde yüksek düzeyde ifade edilmektedir[70]. Keşfinden sonra GSK3 ile ilgili araştırmalar büyük oranda artmıştır. GSK3-α ve GSK3-β (olarak adlandırılan); 19. ve 3. kromozomlar üzerinde farklı genler tarafından kodlanmış olmalarına rağmen yapı olarak %98 oranında benzer olan iki izozimi tanımlanmıştır[81]. Benzer yapılarının aksine, bu izozimlerin farklı substratlar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir[82]. Aslında, in-vivo çalışmalarda, GSK3-β'nın tamamen ortadan kaldırılmasının embriyoda ölüme neden olurken, GSK3-α'nın genetik delesyonunun hayatta kalma üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gösterilmiştir[83,84].

Son dönemde artan çalışmalar, beyin gelişimi sırasında progenitör proliferasyonu ve farklılaşmanın koordinasyonu için GSK3 sinyalinin gerekli olduğunu göstermektedir[77,85]. Nörogenez sırasında, GSK3 inaktivasyonunun nöral progenitör proliferasyonunu uyardığını, GSK3 aktivasyonunun ise nöronal farklılaşmayı indüklediğini gösteren çalışmalar vardır. GSK3'ün nörogenezdeki rolünün, protein stabilitesinin ve mikrotübül oluşumunun düzenlenmesi yoluyla olduğu gösterilmiştir[86].

GSK3'ün Alzheimer hastalarının merkezi sinir sisteminde aşırı ifade olduğunun gösterilmesi ile Gsk3'ün tau proteinin hiperfosforilasyonuna sebep olarak Alzheimer hastalığında (AH) rolü olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile GSK-3'ün tau fosforilasyonundaki belirgin rolü, bu kinazın çoğunlukla AH ile ilişkili olduğunu düşündürmekteydi. Ancak, inflamasyon, ER-stresi, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz gibi hücresel hasar süreçlerinde GSK3'ün rol aldığını gösteren çalışmalar ile anormal GSK3 aktivasyonunun ayrıca Parkinson Hastalığı (PH) gibi diğer nörolojik/nörodejeneratif bozukluklarda da rol oynadığı bulunmuştur[80,81,87].



Şekil 10. Nörogeenez sırasında GSK3 sinyalleşmesinin rolü için uyarlanan bir model**.** Radyal glial hücrelerin asimetrik bölünmesi sırasında hücreler, upstream düzenleyicilerin asimetrik kalıtımı yoluyla (Örneğin. Par3, Şizofrenide Bozulmuş (DISC1) veya RhoA) veya hücre dışı faktörlerin yoluyla (örn. Wnt, fibroblast büyüme faktörü (FGF), lizofosfatidik asit (LPA), retinoik asit (RA)) farklı GSK3 aktivitelerine sahip olabilirler. Daha düşük GSK3 aktivitesine sahip yavru hücrede, β-katenin, Gli ve c-Myc gibi proliferasyon faktörleri birikir. Mikrotübül ilişkili proteinler (Ninein gibi), hücreyi ventriküler bölge (VZ) yüzeyine tutturmak için astral mikrotübülleri organize eder. Böylece hücre progenitör kadere yönlenmiş olur. Tersine, daha yüksek GSK3 aktivitesine sahip yavru hücre, proliferatif proteinleri ve Ninein gibi mikrotübül ilişkili diğer proteinleri, muhtemelen ubikuitin-proteazom sistemi (UPS) aracılı protein yıkımı yoluyla uzaklaştırır. Sonuç olarak, hücre VZ yüzeyinden ayrılır ve bir nöron veya bir ara progenitör hücre (IPC) haline gelir[86].

2.4.3. Neurogenin 2 (Neurog2)

Nörogeninler (Ngn1/2/3) yüksek oranda korunmuş nöral basic heliks-loop-heliks (bHLH) protein sınıfı transkripsiyon faktörleri olarak omurgalı nörogenezinin temel

düzenleyicisidir. Transkripsiyon faktörleri, embriyonik gelişim sırasında hücre kaderi belirleme ve farklılaşma dahil birçok biyolojik süreci düzenler. Transkripsiyon faktörlerinin (TF'ler) ifadeleri, EKH'lerin kan, kas, hepatosit, pankreas ve nöronal hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşmasını indüklemektedir[88]. Nörogeninlerin nöral hücreler tarafından ifade edildiği ve gelişim sırasında önemli roller oynadığı gösterilmiştir[89,90,91,92]. NEUROG2, NEUROD1 ve NEUROD2 TF'lerinin beraberce araştırıldığı bir çalışmada, bu TF'lerinin fibroblast hücrelerini bile nöronlara yeniden programlayabildiğinin gösterilmesi ile nöronal farklılaşmadaki önemli rolü kanıtlanmıştır[93]. Ayrıca NEUROG1, NEUROG2, NEUROG3, NEUROD1 ve NEUROD2 TF'lerinin topluca ve teker teker etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise; bu beş transkripsyon faktörlerinden birinin ifadesindeki artışın nöronal farklılaşmayı sağladığı ve farklılaşma sürecinin daha hızlı olduğu gösterilmiştir. Yine nöral farklılaşmayı araştıran başka bir çalışmada Neorog2'nin pluripotent hücrelerden olgun nöron oluşumunu indüklediği ve bu süreç için yeterli olduğu gösterilmiştir[94]. Farklı hücre tiplerinin farklılaşmasının araştırıldığı çalışmalarda Neurog2'nin çeşitli retinal yolakları indüklediği gösterilmiştir. Periferal sinir sistemindeki Neurog2 nöronların farklılaşmasında rol oynarken, Retinada bulunan neurog2 nöral olmayan retinal pigment epitel hücrelerinin retinal nöronlara farklılaşmasına neden olabilmektedir[95].

Embriyonik kortekste NEUROG2, fare kortikal nöronları oluşur oluşmaz göç etmeye başlamadan önce küçük GTP-bağlayan protein Rnd2 'nin ekspresyonunu indüklemektedir. NEUROG2 geninin baskılanması aracılığı ile Rnd2'nin ekspresyonunun azaltılması, kortikal nöronların radyal göçünde kusurlara neden olmaktadır. Böylece Neurog2'nin, Rnd2 genini transkripsiyonel olarak aktive etmesiyle başlattığı yolak üzerinden hücre göçünü kontrol ettiği sonucuna ulaşılabilir[96].

NEUROG2'nin düzenlenmesi ile ilgili bazı çalışmalarda NEUROG2'nin kinazlar tarafından birçok bölgesinden fosforile edilerek aktivitesinin değişebileceği ileri sürülmekle birlikte, Neurog2'nin farklılaşmaya indükleme kapasitesinin tez çalışmamızda incelediğimiz diğer bir gen olan GSK3B tarafından düzenlendiği rapor edilmiştir. Diğer taraftan, Neurog2'nin ekspresyonu, tez çalışmamızda incelediğimiz bir diğer gen olan PAX6'nın yanı sıra NURR ve MASH1 gibi diğer TF'ler tarafından da düzenlenebilmektedir. NEUROG2'nin ekspresyonunun retinoik asit, sonic hedgehog ve

fibroblast büyüme faktörü tarafından düzenlenebildiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu mekanizmalar aracılığıyla artan NEUROG2 ekspresyonu ve aktivitesi kök hücre farklılaşmasını indükleyebilmektedir[97,98].Tüm bu çalışmalar neticesinde; NEUROG2'nin nöronal farklılaşmada oldukça önemli bir rolü olduğu görülmektedir[88].

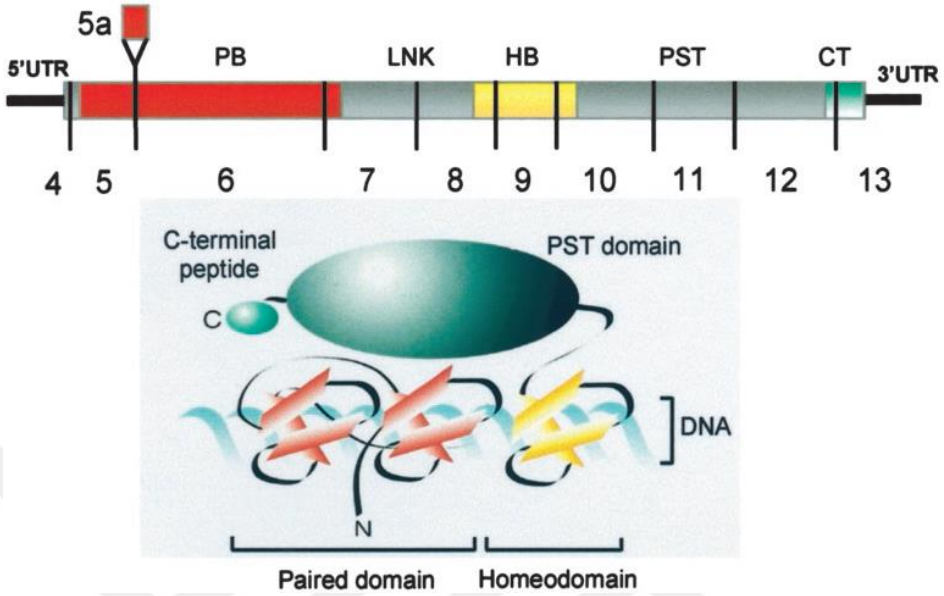
NEUROG2' nin mutasyonlu olduğu farelerde, kraniyal ve spinal duyu ganglionları ve ventral omurilik nöron kayıplarının gösterildiği çalışmalarda kanıtlandığı gibi, NEUROG2 nöronal bağlantı için gereklidir[99].

2.4.4. Paired-Box 6 (PAX6)

İlk kez Drosophila da homolojisi olan paired-box (PAX) gen ailesine üye olarak klonlanan PAX6, beyin gelişiminde anahtar bir rol oynayan transkripsiyon faktörlerinden biridir[100]. PAX6 iki DNA'ya bağlanma bölgesi içerir; biri, paired box-domain ve diğeri homeodomaindir. Paired-box bölgesi, PAI ve RED motifleri olmak üzere iki DNA'ya bağlanma bölgesine ayrılır[101]. PAX6'nın işlevleri türler arasında değişiklik gösterebilmektedir buna rağmen PAX6'nın moleküler yapısı iyi korunmuştur[102]. PAX6'nın göz oluşumunun yanı sıra beyin gelişiminde de önemli rolleri olduğu bulunmuştur. Embriyonik ve yetişkin dönemde beynin farklı bölgelerinde PAX6'nın eksprese edildiği gösterilmiştir[103,104,105]. PAX6 nöral kök hücreler ve nöral progenitör hücreler tarafından eksprese edilirken, farklılaşmış nöron hücreleri tarafından eksprese edilmez. Neokortekste PAX6 fonksiyon kaybı prematür nörogeneze ve nöron sayısında net bir azalmaya neden olmaktadır[101].

Korteksteki nörogenez ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve memeli evrimi süresince beyin yapısının boyut ve karmaşıklık açısından arttığı gösterilmiştir[106]. Beyin yapısında meydana gelen bu değişikliklerin, PAX6'nın nöral kök/progenitör hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını dengelemedeki rolünden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Çünkü bir transkripsiyon faktörü olarak PAX6 korteks gelişiminde rol almaktadır. Son zamanlarda yapılan genom çapındaki transkriptom analiz çalışmaları, PAX6'nın kontrol ettiği binlerce genin (downstream genleri) korteks gelişiminde rol aldığını göstermiştir[101]. Kortikogenez sürecinde ortaya çıkan anormallikler mikrosefaliye sebep olurken, benzer şekilde, nöral gelişimde ortaya çıkan anomalilerde, zihinsel engellilik, dikkat eksikliği-hiper aktivite bozukluğu ve otizm spektrum

bozukluğu (OSB) gibi nörogelişimsel rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Yine PAX6'nın OSB'e sebep olduğunu savunan çalışmalar bulunmaktadır[101,107].



Şekil 11. PAX6 cDNA sı ve proteini. cDNA, yatay çubuk (üstte) olarak temsil edilmektedir. Dikey çizgiler ekzon sınırlarını göstermektedir. PAX6, 4-13 olmak üzere 10 temel kodlama ekzonuna ve alternatif kırpılma ekzonuna, (5a) sahiptir. Ekson 5a'nın dahil edilmesi, paired domaine 14 amino asidin eklenmesiyle sonuçlanır. PB, paired-box (kırmızı); LNK, bağlayıcı bölge; HB, homeobox (sarı); PST, prolin, serin, treonin açısından zengin domain; CT, C-terminal bölgesini (yeşil) temsil etmektedir. PAX6 proteininin (altta) grafiksel bir temsili, transle edilmiş proteinin farklı domainlerini göstermektedir. Paired domain (kırmızı) ve homeodomain (sarı) DNA ile temas halinde gösterilmektedir. Homeodomain 3 sarmaldan oluşurken, paired domain 6 sarmaldan oluşur. PST domainin ve C-terminal peptidinin yapıları bilinmemektedir. N ve C, sırasıyla proteinin N- ve C-terminallerini gösterir[108].

2.4.5. Tübülin-β3 (TUBB3)

Merkezi sinir sisteminin gelişimi sırasında, belirli bir uzaysal ve zamansal pencere içinde çok sayıda hücre bölünmesi ve göç olayının doğru bir şekilde düzenlenmesini gerektiren üç hücresel süreç bulunmaktadır: nörogenez, nöronal göç ve nöronal farklılaşma[109]. Nöronlar ve glial hücreler çoğalmalı, serebral kortekste uygun alanlara göç etmeli ve sinaps oluşturmak için diğer hücresel uzantılar (aksonlar ve dendritler) oluşturarak, diğer nöronlarla iletişime geçebilmeli ve böylece sinirsel ağların oluşturulmasını sağlamalıdırlar. Bu temel süreçlerde mikrotübüller önemli rol oynamaktadır[109,110].

Mikrotübüller; hücre şeklinin belirlenmesinde, hücre içi taşımada, mayozda ve mitozda işlev gören hücre iskeletinin bir parçasını oluştururken, aynı zamanda α ve β

tübülinin yapısına katılmaktadırlar[111]. Mikrotübüller ayrıca, serebral korteks gelişiminin aşamaları sırasında uygun hücre yapısınının oluşması ve nöronların göç edebilmesi için de gereken hücre içi kuvveti oluşturarak kilit rol oynarlar[110]. Tübülin-β3, Tubulin-β3 (TUBB3) geni tarafından kodlanan, normal olarak nöronal hücreler ve testislerde eksprese edilen yedi β-tübülin proteininden biridir[111]. Çeşitli makalelerde, TUBB3'ün sinir sistemi gelişimi ve nöronal hastalıklarda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir[111]. TUBB3 geninde meydana gelen mutasyonlar, ilk olarak oküler motilite bozukluğunda, otozomal dominant kalıtım gösteren oldukça yüksek penetranslı ekstra oküler kas konjenital fibrozis tip 3 te (CFEOM3) tanımlanmıştır[110]. Tubb3'ün ayrıca asimetrik kortikal displazi, polimikrogiri benzeri kortikal displazi ve multifokal displazi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir[110,112]. TUBB3'ünde dahil olduğu 7 tübülin proteinin mutasyonlarının bir dizi kortikal gelişim malformasyonuna (MCD) sebep olduğu gösterilmiştir[110].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda kısaca; fare embriyonik kök hücrelerini in vitro ortamda nöron hücrelerine farklılaştırdık. Farklılaşma sürecinde hücrelerin bir kısmını nikotine maruz bırakarak nikotinin farklılaşma üzerine etkisini ve bu etkinin çeşitli nörogelişimsel hastalıklar ile ilişkisini araştırdık. Bu etkilerin incelenmesi için, literatür taramasında belirlenen, hem nöronal farklılaşmada rol alan hem de nörogelişimsel hastalıklar ile ilişkili olduğu düşünülen GSK3B, RBFOX3, PAX6, TUBB3 ve NEUROG2 genlerinin ekspresyon analizleri ile birlikte hücrelerin immünohistokimyasal (İHC) analizi yapılmıştır. Çalışmamızda kullanılan Fare embriyonik kök hücreleri ile Fare Embriyonk Fibroblast hücreleri Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Seda VATANSEVER'den temin edilmiştir. Çalışmamızın, hücre kültürü aşaması ve İHC analizi Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD'da yapılmıştır. Ekspresyon çalışmaları Çukurova Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'da yapılmıştır.

Çalışmamız özetle şu basamaklardan oluşmaktadır;

1. Fare Embriyonik Fibroblast Hücrelerinin (STO) in vitro ortamda çoğaltılması
2. STO hücrelerinin mitomisin-c ile muamele edilmesi
3. Embriyonik Kök Hücrelerinin (EKH) mitomisin-c ile muamele edilmiş STO üzerine ekilmesi
4. EKH lerin LIF'e maruz bırakılması ve çoğaltılması
5. Hanging drop yöntemi ile Embriyonik cisimlerin oluşturulması
6. Farklılaştırma aşaması
7. 21 gün süren farlılaştırma aşamasında her haftanın sonunda bir kısım hücrenin Ekspresyon analizi ve İHC analizi amacı ile toplanması
8. Real Time PCR'ın yapılması
9. Real Time PCR ve İHC sonuçlarının değerlendirilmesi

3.1. Araç ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler markaları ile birlikte, cihazlar ve teknik malzemeler aşağıda listelenmiştir.

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

1. DMEM High Glucose with Nadium Pyruvate (Dmem-Hpa, Capricorn)
2. Fetal Bovine Serum (Fbs-11b, Capricorn)
3. L-glutamin (Gln-B Capricorn)
4. Penicillin-Streptomycin (Ps-b, Capricorn)
5. Non Essential Aminoacids (Neaa-b, Capricorn)
6. 2-Mercaptoethanol (M7522, Sigma)
7. Leukemia Inhibitory Factor (Lif1005, Merck)
8. Mitomicin C (M4287, Sigma)
9. Phosphate Buffer Saline (Pbs-1a, Capricorn)
10. Gelatin From Bovine Skin Type B (G9391, Sigma)
11. N-2 Plus Media Supplement (Ar003, R&D)
12. Recombinant Human FGF basic (233-FB-025, R&D)
13. Recombinant Human EGF (236-EG-200, R&D)
14. Bovine Fibronectin (1030-FN-01M, R&D)
15. Hıgh Pure RNA İsolation Kit (Roche)
16. cDNA Synthese Kit (Roche)
17. Etanol (Antalya Alkollü İçecek San.ve Tic. A.Ş.)
18. DEPC su (İnvitrogen)
19. Plate kapağı (Applied Biosystem)
20. Sybr Green Master Mix (Applied Biosystem)
21. 96-kuyucuklu plate (Applied Biosystem)
22. Primerler (Macrogen)
23. Anti-Map2 (Sc-32791 - Santa Cruz Biotechnology)
24. R&D Neural Lineage Functional Identification Kit (SC028, R&D)
25. Paraformaldehit (PFA TP704404-415, Merck)
26. Triton®-X-100 (A4977-0100, AppliChem)
27. Hidrojen Peroksit (K31355100 303, Merck)
28. Bloklama solüsyonu (TP-125-HL, Thermo Scientific)
29. Zytovision Sekonder Kit
30. Diaminobenzidin (DAB, Thermo Scientific)
31. Hematoksilen (Thermo Scientific)

3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

1. İnkübatör (nemlendirilmiş ve %5 CO_2'li ortam)
2. Işık Mikroskopu
3. İnvert mikroskop
4. Lamin air flow
5. Steril petri kabı
6. Steril Plate 6 gözlü (Kültür için)
7. Steril Plate 12 gözlü (Kültür için)
8. Steril falkon (15ml, 50ml)
9. Steril enjektörler (20 ml)
10. Steril filtre (2µm)
11. Steril Serolojik Pipetler (5ml, 10ml, 20ml)
12. Thoma Lamı
13. Lamel
14. Pipet Tabancası
15. Mikropipet
16. Soğutmalı Santrifüj
17. PCR tüpü (0,2ml, 1,5ml)
18. Mikro Santrifüj
19. 96 kuyucuklu plate (Real Time PCR için)
20. Plate kapağı (Real Time PCR için)
21. Steril Mikropipet uçları
22. Vortex
23. Thermal Cycler

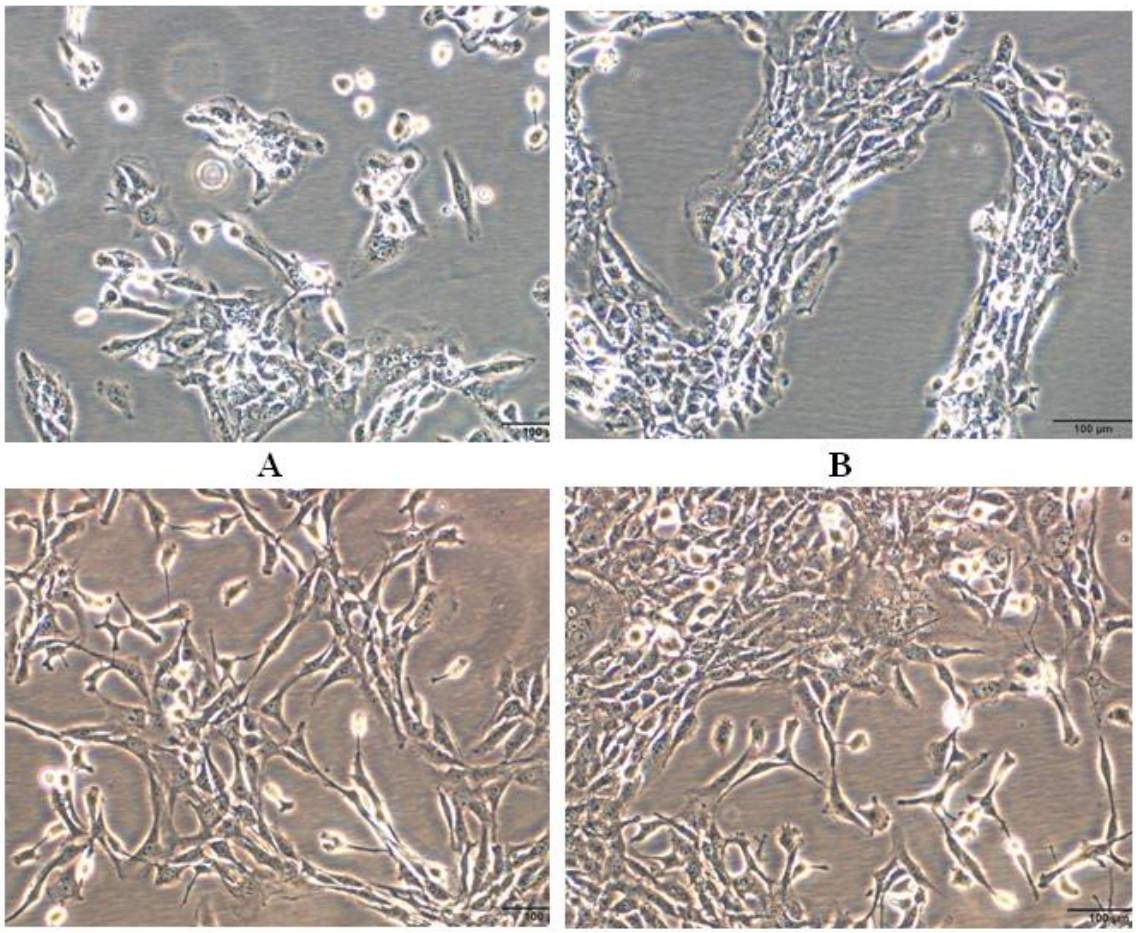
3.2. Yöntem

3.2.1. STO Hücrelerinin kültür aşaması

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ABD'dan temin edilen STO hücreleri, embriyonik kök hücreler için besleyici tabaka (Feeder Layer) olması amacı ile kültüre edilmiştir. Öncelikle, distile su kullanılarak %1 lik jelatin hazırlandı. 6 gözlü plate'in ekim yapılacak hergözüne 1ml eklendi. 1 saat oda koşullarında

beklendikten sonra kalan jelatin ortamdan uzaklaştırıldı. Kuyucuklar STO için hazırlanan medyum (Ek 1) ile yıkandı ve STO hücreleri 2ml medyum içine ekildi.

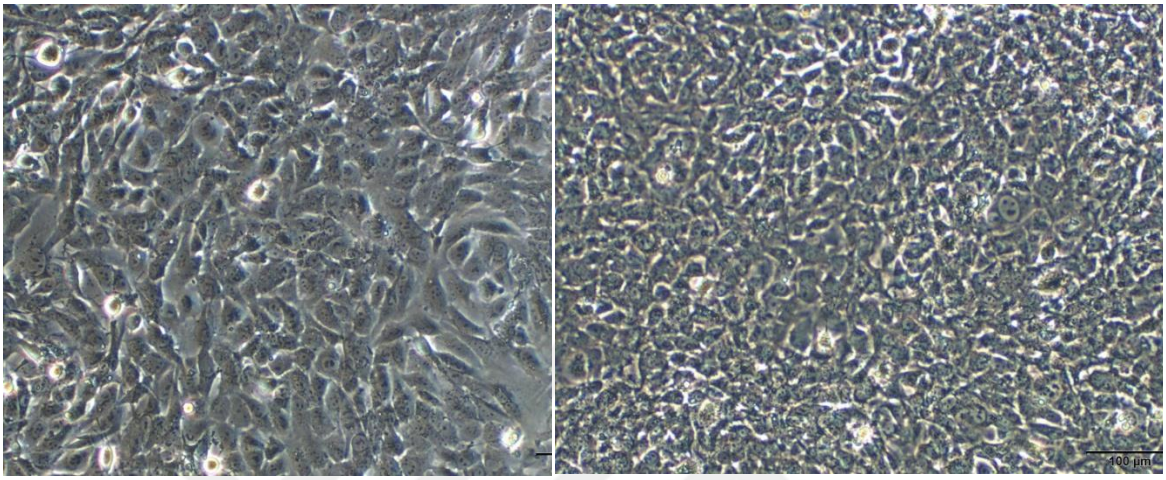
Hücreler iki güne bir kontrol edilerek medyumları değiştirildi. Hücreler çoğalıp, plate'i kaplayıncaya kadar (5-7 gün) kültür devam ettirildi.



Şekil 12. STO hücrelerinin kültür aşamaları. A,B: STO hücre kültürü 2. Gün C,D: STO hücre kültürü 4. gün

3.2.2. STO Hücrelerinin Mitomisin-c ile muamele edilmesi

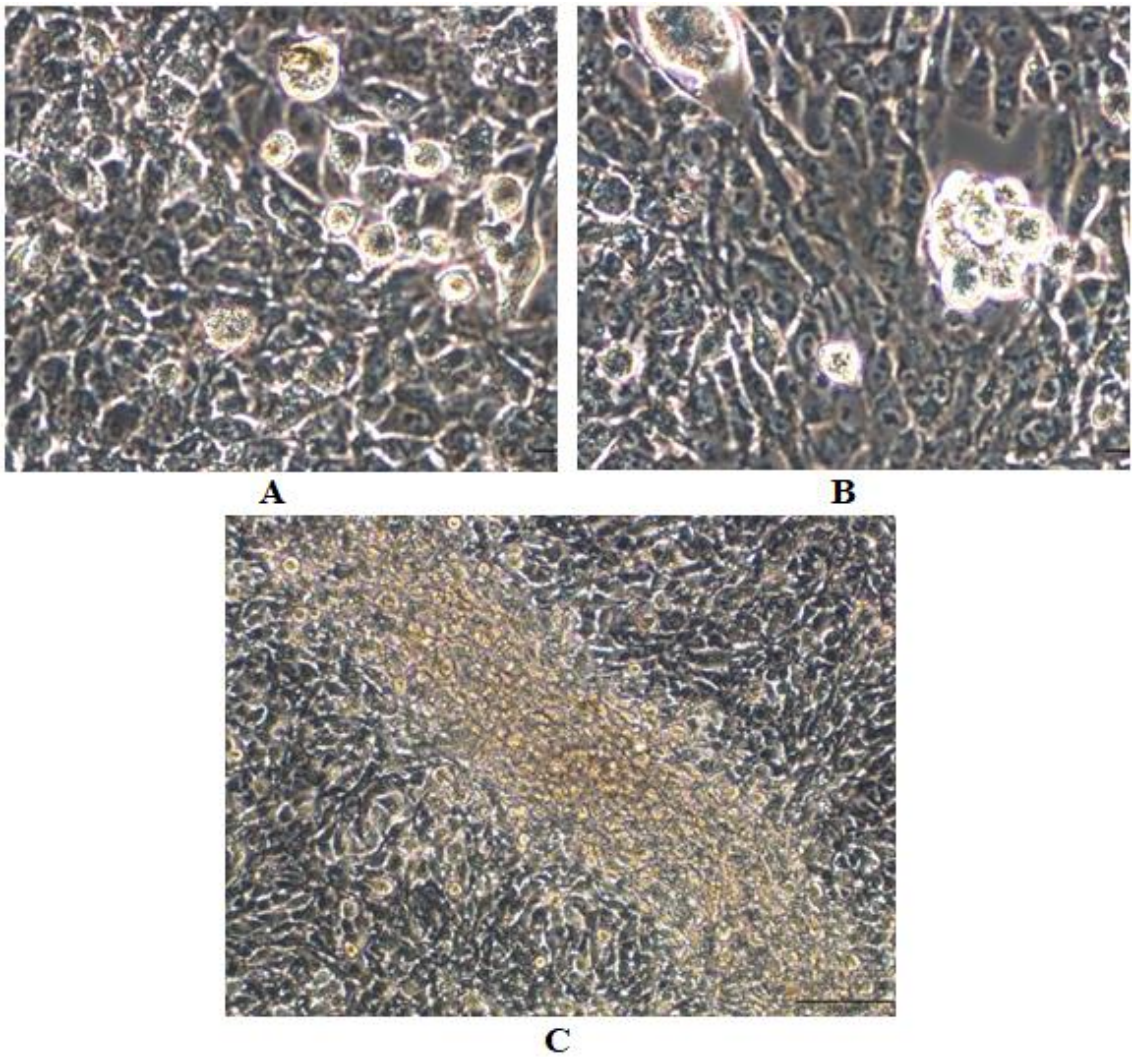
Yeteri kadar çoğaltılan STO hücrelerine, bölünmelerini engellemesi amacı ile mitomisin-c (20µg/ml) eklendi. Mitomisin-c uygulanmış STO hücreleri inkübatörde 2.5 saat inkübe edildi. Süre sonunda mitomisin-c uzaklaştırıldı.



Şekil 13. Mitomisin-C uygulanmış STO hücreleri

3.2.3. EKH'lerin üretilmesi, LIF'e maruz bırakılması ve çoğaltılması

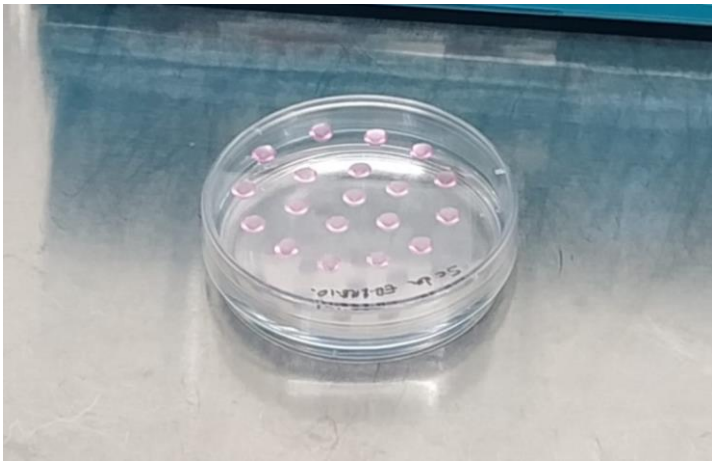
Embriyonik kök hücreler, Mitomisin-C ile muamele edilmiş STO üzerine ekildi. 37^0C'de %5 CO_2 olan inkübatörde kültüre edildi. Kültür sırasında farklılaşmayı önleyici olarak kullanılan LIF'inde bulunduğu EKH için hazırlanmış medyum (Ek 2) kullanıldı. Gün aşırı hücreler kontrol edilerek, medyum değiştirildi. İstenen hücre miktarı elde edilinceye kadar kültür devam ettirildi.



Şekil 14. EKH kültür aşamaları A: Kültürde 0.gün B: Kültürde 2.gün C: Kültürde 4.gün

3.2.4. Hanging Drop yöntemi ile Embriyonik Cisimlerin oluşturulması

EKH'lerin kültürü sonunda hücreler Tripsin edta yardımı ile kaldırılarak Embriyonik cisimler (EB) için hazırlanan medyum (Ek 3) içine alındı. Örnekler 1000 devirde 5dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 500µl EB medyum konarak homojenize edildi. Daha önceden ısıtılmış steril PBS konmuş petri kutularının kapağına 20µl hacminde ve herbirinde yaklaşık olarak 3×10^4 - 4×10^4 farklılaşmamış embriyonk kök hücre içeren droplar kondu. Sonrasında kapaklar dikkatlice ters çevrilip kapatıldı. Bu şekilde inkübator içinde 2 gün inkübe edildi.



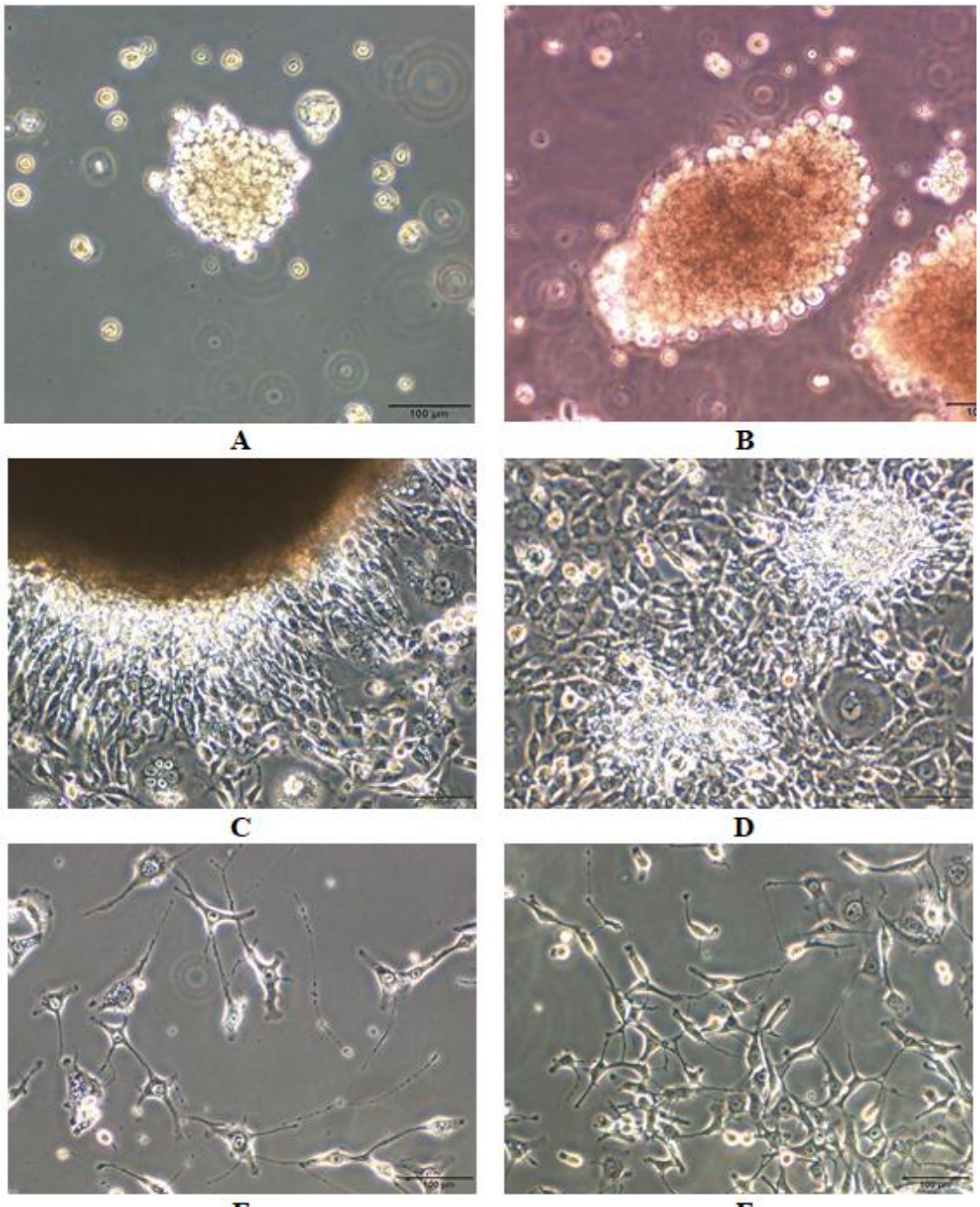
Şekil 15. Hanging Drop yöntemi ile Emriyonik cisimlerin oluşturulması

3.2.5. Farklılaştırma Süreci

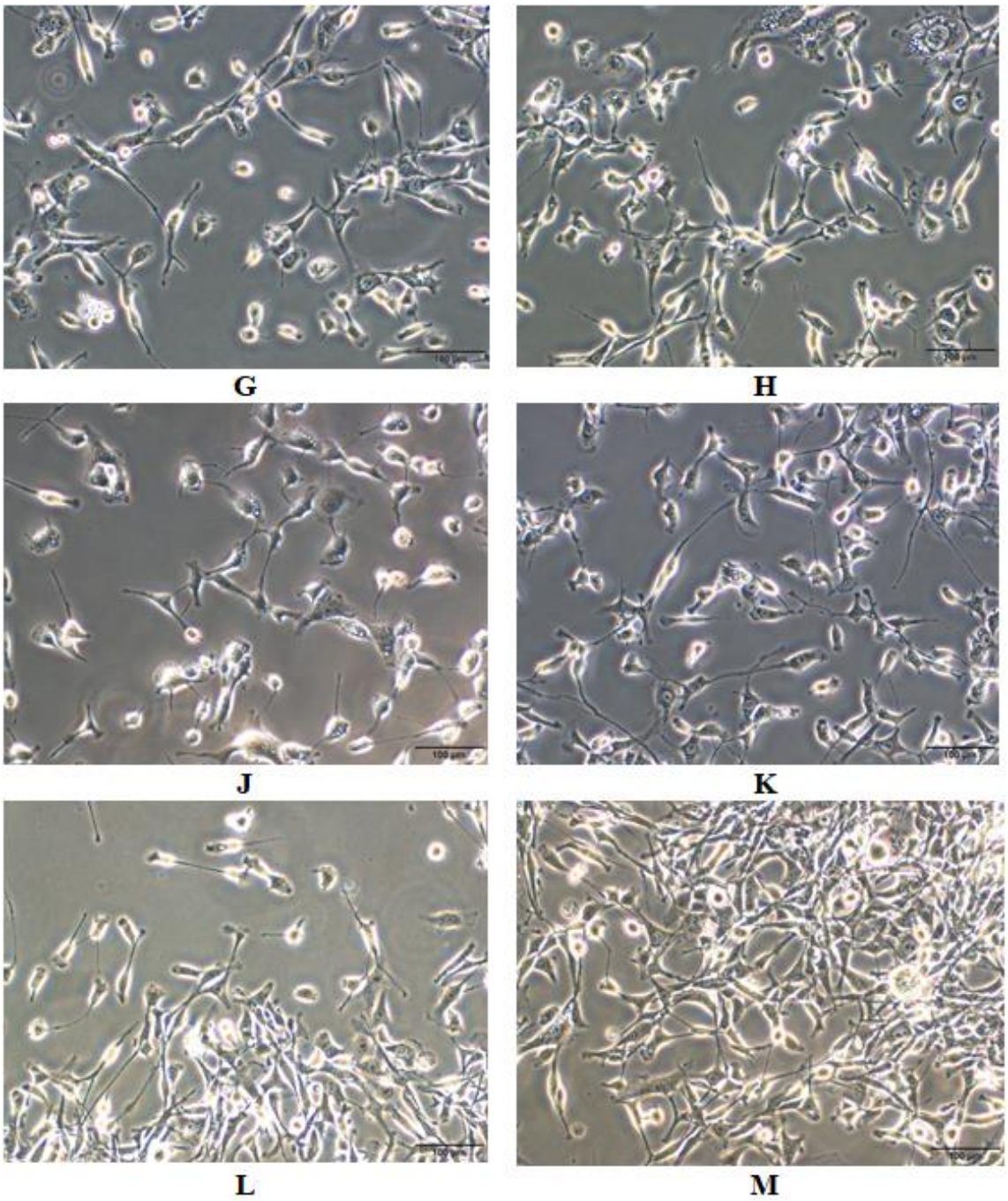
EB'lerin inkübasyonu bitmeden 1 gün önce nikotinli ve nikotinsiz gruplar için 1'er tane olmak üzere 2 tane 6 gözlü plate, EB medyum kullanılarak hazırlanan fibronectin (1µg/ml) ile gece boyunca inkübatörde tutularak kaplandı. Süre sonunda kuyucuklarda kalan fazla miktar atılarak, EB medyum ile yıkandı. Kültür süresi dolan EB'ler fibronektin kaplı platelere ekilerek inkübatöre kaldırıldı. İki gün sonra konsantrasyonu 25ng/ml olacak şekilde hazırlanan nikotinli veya nikotinsiz farklılaşma medyumu (Ek 4, Ek 5) konmaya başlandı.



Şekil 16. EB'lerin fibronektin kaplı plate'e aktarılması



A B C D E F



Şekil 17. EB inkübasyonu ve farklılaşma süreci: A, B: EB'lerin plate aktarıldığı gün çekimleri. C, D: EB'lerin aktarımdan sonraki 2. gün çekimleri. E: Nikotinli grupta farklılaşmanın 5. günü, F: Nikotinsiz grupta farklılaşmanın 5.günü. G: Nikotinli grupta farklılaşmanın 7. günü. H: Nikotinsiz grupta farklılaşmanın 7.günü J: Nikotinli grupta farklılaşmanın 14.günü K: Nikotinsiz grupta farklılaşmanın 14.günü L: Nikotinli grupta farklılaşmanın 21.günü M: Nikotiniz grupta farklılaşmanın 21. günü gösterilmiştir.

3.2.6. Total RNA izolasyonu

Nikotinli ve nikotinsiz olmak üzere iki grup farklılaştırma yaptığımız çalışmamızda her grup için 7. 14. ve 21. günlerde olmak üzere toplamda 6 grup RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu için, Roche High Pure RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. İzolasyon sırasında aşağıdaki adımlar sırası ile gerçekleştirilmiştir.

1. Kültürü devam eden hücreler 7. 14. ve 21. günlerinde tripsin kullanılarak kaldırıldı.
2. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 200 µl PBS'te 10^6 hücre olacak şekilde ayarlanarak çözelti eppendorf tüplere aktarıldı.
3. Her eppendorfa 400 µl Lizis Binding Buffer eklenip yaklaşık 15 s vortex yapıldı.
4. Çözelti, toplama tüpüne yerleştirilmiş filtreli tüpe aktarıldı.
5. 8000g de soğutmalı santrifüjde 15 s santrifüj yapıldı.
6. Toplama tüpüne geçen çözelti döküldü.
7. Ayrı bir yerde her örnek için 90 µl DNase inkübasyon Buffer ile 10 µl DNase karıştırıldı. Bu karışımdan her tüpe 100 µl konarak oda koşullarında 15dk inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonunda her tüpe 500 µl Wash Buffer-I eklendi.
9. 8000g de soğutmalı santrifüjde 15 s santrifüj yapıldı Süzülen çözelti atıldı
10. 500 µl Wash Buffer-II eklendi. (gerek görülürse tekrar edilebilir)
11. 8000g de soğutmalı santrifüjde 15 s santrifüj yapıldı. Süzülen çözelti atıldı
12. 200 µl Wash Buffer-II eklendi.
13. 13000g de 2dk. santrifüj edildi.
14. Filtreli tüp toplama tüpünden çıkarılarak nihai saklama tüpüne alındı.
15. Her örneğe 50-100 µl Elution Buffer eklendi.
16. 8000g de soğutmalı santrifüjde 1dk santrifüj yapıldı.
17. Elde edilen RNA öncelikle spektrofotometrik yöntemler ile ölçüldü. Daha sonra saklanmak üzere bölünerek -80 ^{0}C' ye kaldırıldı.

3.2.7. Total RNA'dan Ters Transkripsiyon ile Komplementer DNA'ya (cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA'ların cDNA'ya çevrilmesinde Roche cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Şu basamaklar izlenmiştir.

1. İzole edilen total RNA'dan 1µg Random Hexamer Primer'den 2 µl olacak şekilde karıştırıldı ve üzeri moleküler su ile 13 µl'ye tamamlandı.
2. Daha önceden ısıtılmış PCR cihazında 10dk. 65^0C de tutuldu.

Süre sonunda cihazdan çıkarılan örnekler hızlı bir şekilde soğutuldu. Ayrı bir yerde, reaksiyon başına aşağıdaki çizelgede belirtilen kimyasallar ve miktarları hazırlanarak örnekler üzerine dağıtıldı. Totalde 20 µl hacimde reaksiyon ortamı elde edildi.

Çizelge 2.cDNA reaksiyonu için reaktif ve miktarları

Transkriptör Reverse Transkriptaz Reaction Buffer	**4 µl**
Protector RNase İnhibitör	**0,5 µl**
Deoksinükleotid karışımı	**2 µl**
Transkriptör Reverse Transkriptaz	**0,5 µl**

Reaksiyon için aşağıda verilen tablodaki döngü kullanılmıştır.

Çizelge 3.cDNA reaksiyon döngüsü

25^0C'de	**10 dakika**
55^0C'de	**30 dakika**
85^0C'de	**5 dakika**

3.2.8. Real-Time PCR (RT-PCR) Reaksiyonu

Çalışmamızda, SYBR green kullanarak Real-Time PCR reaksiyonu tabloda verilen primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4. Realtime PCR'de kullanılan Primer dizileri

Gen Adı: Mus musculus Glycogen Synthase Kinase 3 beta ***(Gsk3b)***	
	(5'→3')
Forward Primer:	**GGCTGTGTGTTGGCTGAATT**
Reverse Primer:	**CTCTAATTTGCTCCCTTGTTGGT**
Gen Adı: Mus musculus Paired box gene 6 (***Pax6***)	
	(5'→3')
Forward Primer:	**TACCAGTGTCTACCAGCCAAT**
Reverse Primer:	**TGCACGAGTATGAGGAGGTCT**
Gen Adı: Mus musculus RNA binding protein fox-1 (***Rbfox3***)	
	(5'→3')
Forward Primer:	**GGCAAATGTTCGGGCAATTCG**
Reverse Primer:	**TCAATTTTCCGTCCCTCTACGAT**
Gen Adı: Mus musculus Tubulin, beta 3 class III (***Tubb3***)	
	(5'→3')
Forward Primer:	**TAGACCCCAGCGGCAACTAT**
Reverse Primer:	**GTTCCAGGTTCCAAGTCCACC**
Gen Adı: Mus musculus Neurogenin 2 (***Neurog 2***)	
	(5'→3')
Forward Primer:	**AACTCCACGTCCCCATACAG**
Reverse Primer:	**GAGGCGCATAACGATGCTTCT**
Gen Adı: Mus musculus β-Actin (***Actb***)	
	(5'→3')
Forward Primer:	**GTGTGACGTTGACATCCGTA**
Reverse Primer:	**GTACTCCTGCTTGCTGATCC**

RT-PCR aşaması için reaksiyon başına kullanılan malzeme ve miktarları aşağıda verilen tablodaki gibidir:

Çizelge 5. Real Time PCR reaktif ve miktarları

Sybr Green Master mix	**12,5 µl**
Moleküler Su	**9 µl**
Forward primer	**1,25 µl**
Reverse primer	**1,25 µl**
cDNA	**1 µl**
Toplam Reaksiyon	**25 µl**

3.2.9. Real-Time RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Her bir gen için deney ve kontrol gruplarından alınan cDNA örnekleri duplike olarak çalışılmıştır ve bu reaksiyonlardan elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alınarak kullanılmıştır. Çalışmamızda, referans gen olarak bir housekeeping gen olan B-ACTİN (ACTB) geni kullanılmıştır. GSK3B, RBFOX3, PAX6, TUBB3 ve NEUROG2 genlerine ait ekspresyon değerleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir:

Deney Grubu ΔCt = Ct Hedef gen – Ct Referans gen

Kontrol grubu ΔCt = Ct Hedef gen – Ct Referans gen

ΔΔCt = Deney Grubu ΔCt - Kontrol grubu ΔCt

Ekspresyon değeri = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

3.2.10. İmmunohistokimyasal Boyamalar

İmmunohistokimyasal analiz için örnekler %4‟lük paraformaldehit içersinde 30 dk tespit edildikten sonra 3 defa 5’ er dakika fosfat tamponu PBS ile yıkandı. Hücrelerin permeabilizasyonu %1’ lik Triton X-100 ile 15 dk oda sıcaklığında yapıldıktan sonra 3 defa 5’ er dakika PBS ile yıkandı ve immunohistokimya protokolüne alındı. Tüm gruplardaki örnekler (hücre ve kesitler) 10 dk %3’ lük H_2O_2 ile oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 3 defa 5’er dakika PBS ile yıkanıldı. Örnekler bloklama solüsyonunun 1 saat inkübasyonundan sonra yıkama yapılmadan primer antikorlar (anti-c-kit, anti- CD90, anti-akrozin) 1/50 dilüsyonda olacak Şekilde konularak bir gece +4°C’de inkübe edildi. Ertesi gün örnekler PBS solüsyonu ile 3 defa

yıkandıktan sonra, biotinlenmiş ikincil antikor ilave edilerek 30 dk inkübe edildi ve 3 defa 5 dk yıkama işleminden sonra streptavidin-peroksidaz ilave edilerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. İmmunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidin (DAB) ile 1 dk boyandıktan sonra örnekler distile su ile yıkandı ve artalan boyaması amacı için örnekler Mayer's hematoksilen ile 3 dk boyandıktan sonra immunohistokimyasal kapatma vasatı ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda analiz edildi.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında; gelişim sırasında maruz kalınan nikotinin, nöron oluşumu ve sinir sistemi gelişimi üzerindeki muhtemel zararlarını ve bu zararların hücrede ne gibi değişiklikler yaparak sebep olduğuna dair bilgi edinebilmeyi amaçladık. Bu amaç ile çıktığımız yolda fare embriyonik kök hücrelerini in vitro ortamda sinir hücrelerine farklılaştırdık. Farklılaşma sırasında biri kontrol diğeri nikotine maruz bıraktığımız 2 grup ile çalıştık. Embriyonik kök hücrelerin çoğaltılması işleminden sonra farklılaştırma aşaması 21 gün sürmüştür. Bu süreçte yedinci ve ondördüncü günlerde bir kısım hücre immünohistokimyasal boyama ve ekspresyon analizi için toplanmış kalan kısım ile kültür devam ettirilmiştir. Farklılaşmanın tamamlandığı 21. günde hücreler İHC boyama ve ekspresyon analizi için kullanılarak kültüre son verilmiştir.

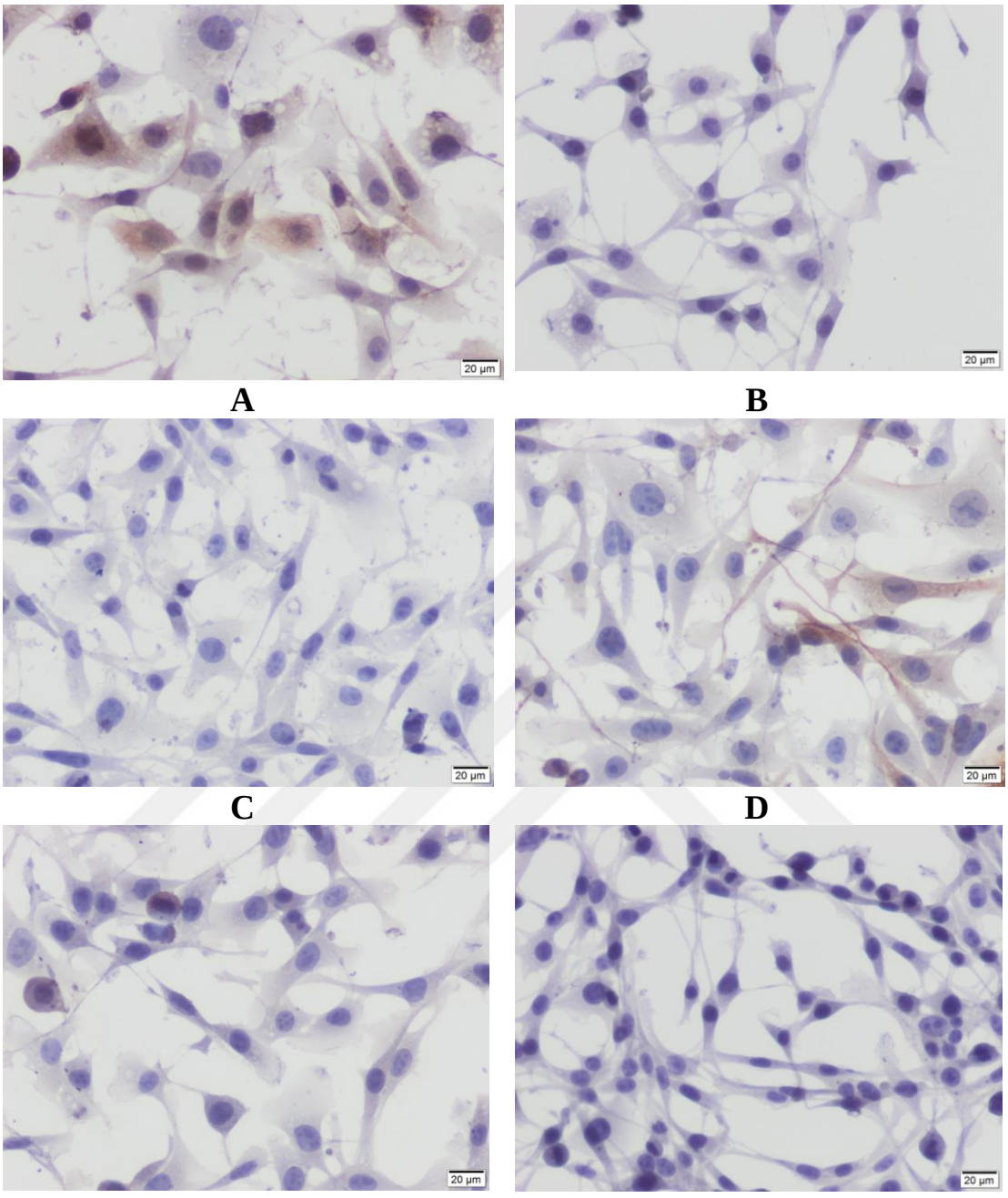
Bu çalışmada İHC analizi için Adobe İllustrator programından faydalanılmıştır. Sybr Green karışımının kullanıldığı Real-Time PCR $\Delta\Delta$Ct yöntemi yardımıyla analiz edilmiştir.

4.1.İmmünohistokimyasal Bulgular

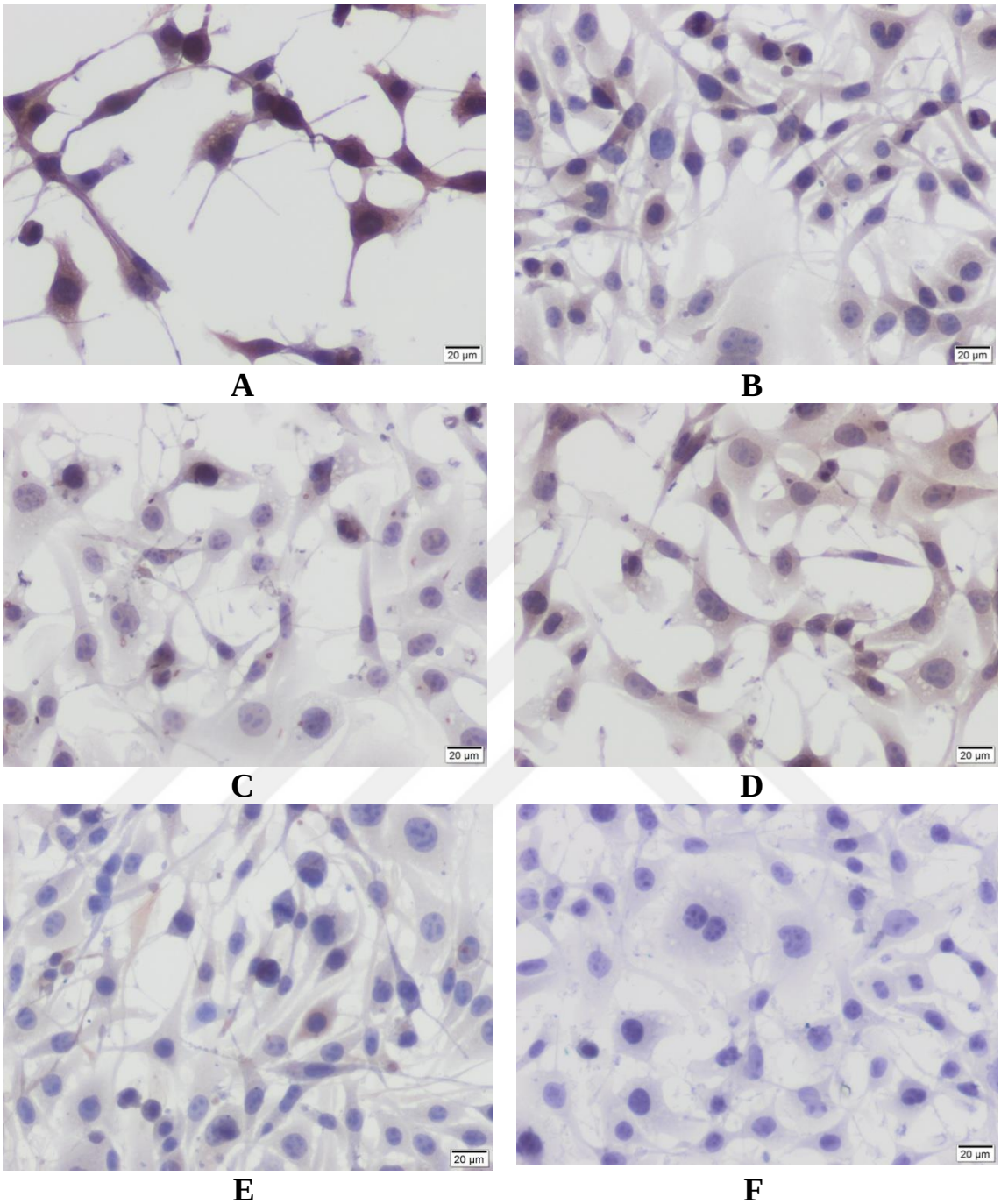
21 gün süren farklılaştırma sırasında 7. 14. ve 21. günlerde hücreler toplanıp İHC boyaması yapıldı. İHC boyamasında Gfap, Map2, β-3 Tubulin, Nestin ve O4 immünoreaktivitelerine bakıldı. Her hafta sonuçları nikotinli ve nikotinsiz olmak üzere aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir. Şekiller incelendiğinde MAP2, β-3 Tubulin ve O4 ekspresyonlarında nikotinli gruplarda nikotinsizlere nazaran azalma olduğu Gfap ve Nestinde ise 21. gün hariç diğer günlerde azalma olduğu görülmüitür.

4.1.1. İlk Hafta İmmünohistokimyasal Bulguları

Farklılaştırmamızın 1. Haftasında toplanan hücreler ile yapılan analiz sonuçlarına göre; β-3 Tubulin ve Nestin immünoreaktivitelerinin nikotinsiz grupta daha şiddetli olduğu görülmektedir. Gfap, Map2 ve O4 immünoreaktivitelerinde belirgin bir fark yoktur.



Şekil 18. 7. gün nikotinli grup İHC sonucu. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması ile 7. gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm



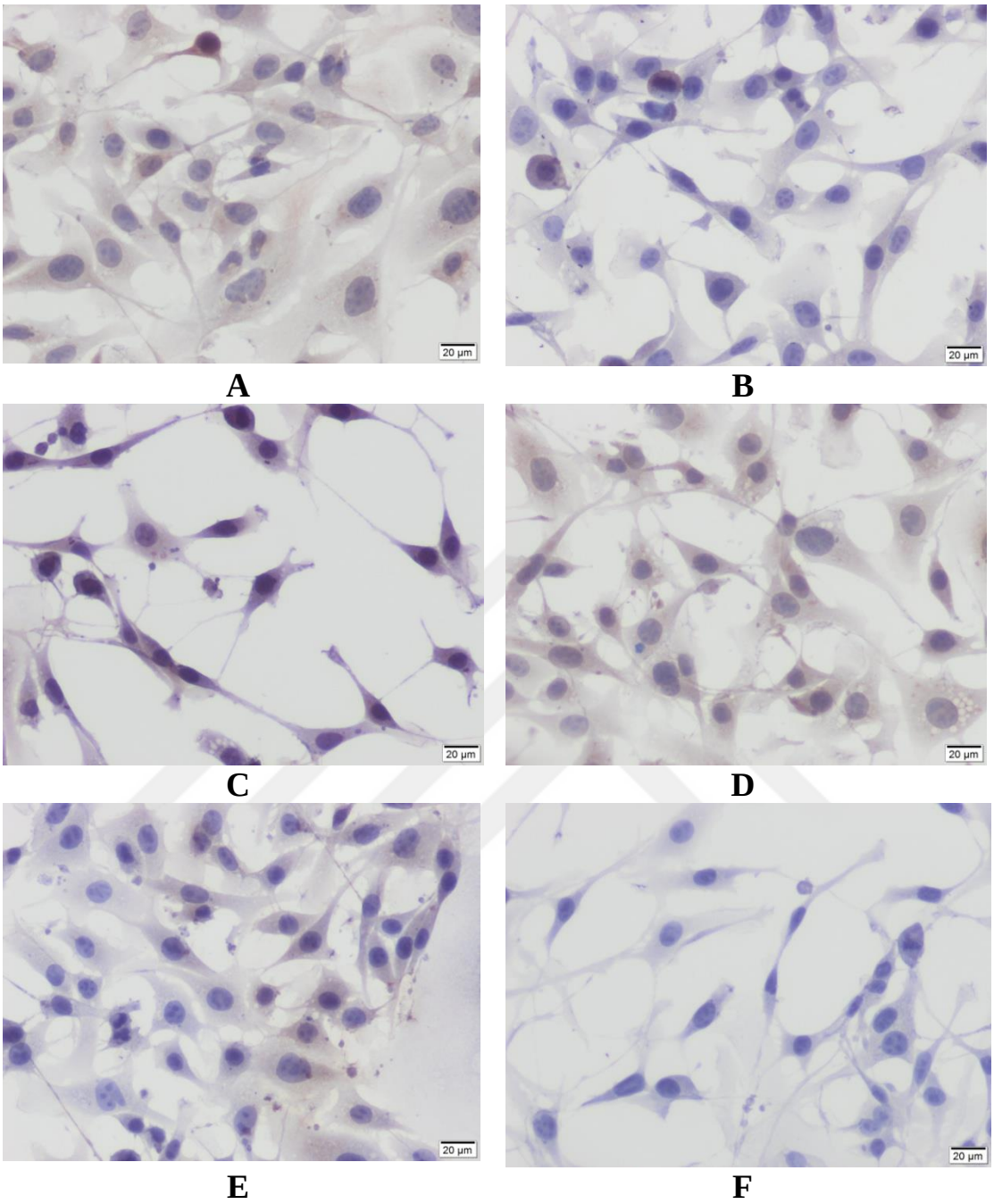
Şekil 19. 7. gün nikotin uygulaması yapılmayan grup İHC sonuçları. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması yapılmaksızın 7. gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm**.**

Çizelge6: 7. gün immünoreaktivitelerinin kıyaslanması

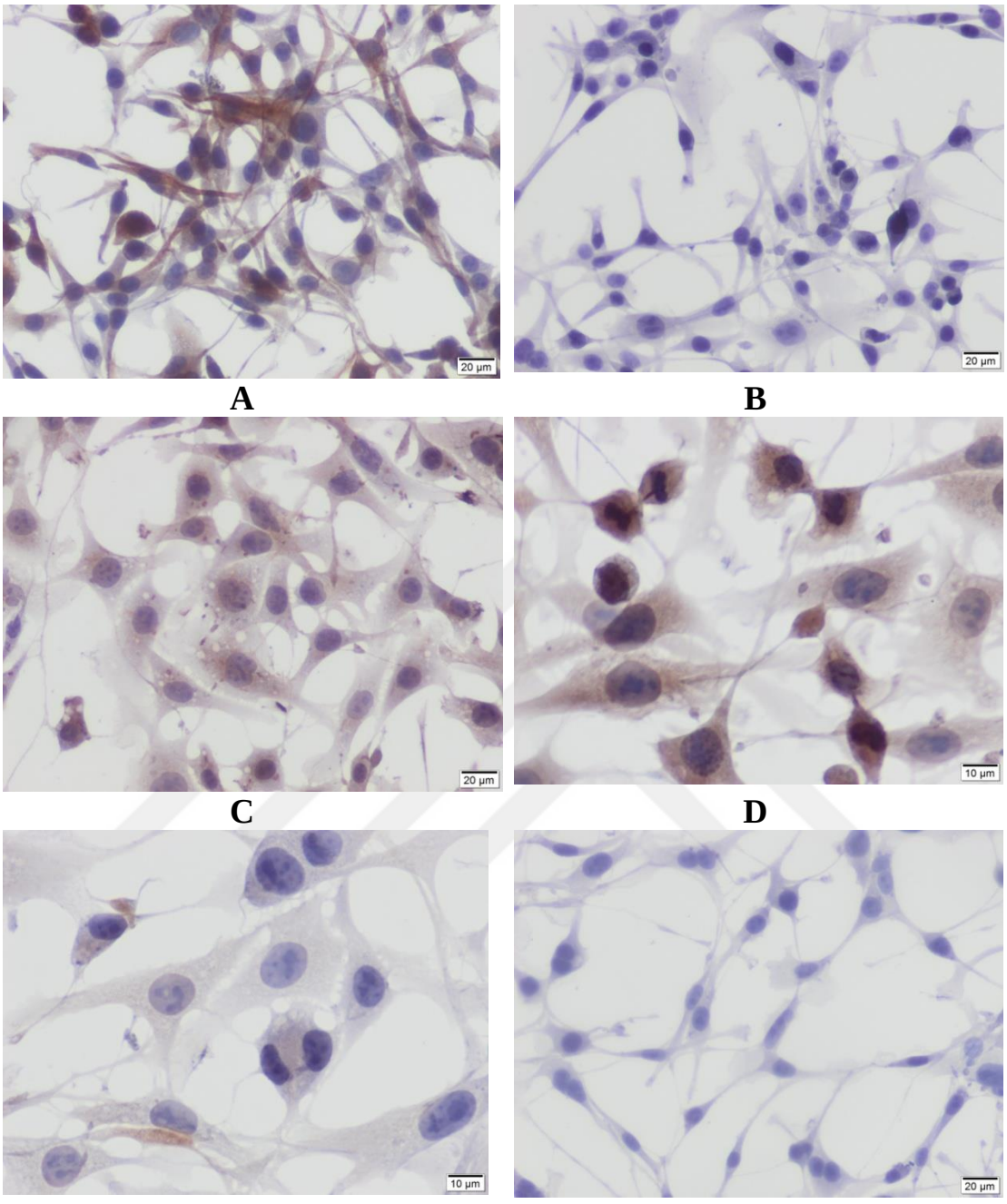
ESC 7. Gün Nöron farklılaştırma	Nikotinli	Nikotinsiz
β-3 Tubulin	++	+++
GFAP	+	+
MAP2	+	+
Nestin	+	++
O4	+	+

4.1.2. İkinci Hafta İmmünohistokimyasal Bulguları

Farklılaştırmamızın 2. Haftasında toplanan hücreler ile yapılan analiz sonuçlarına göre; β-3 Tubulin, Map2 ve Nestin immünoreaktivitelerinin nikotinsiz grupta daha yoğun olduğu görülmektedir. Gfap, ve O4 immünoreaktivitelerinde belirgin bir fark yoktur.



Şekil 20.14. gün nikotinli grup İHC sonuçlarıEmbriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması ile 14. gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm



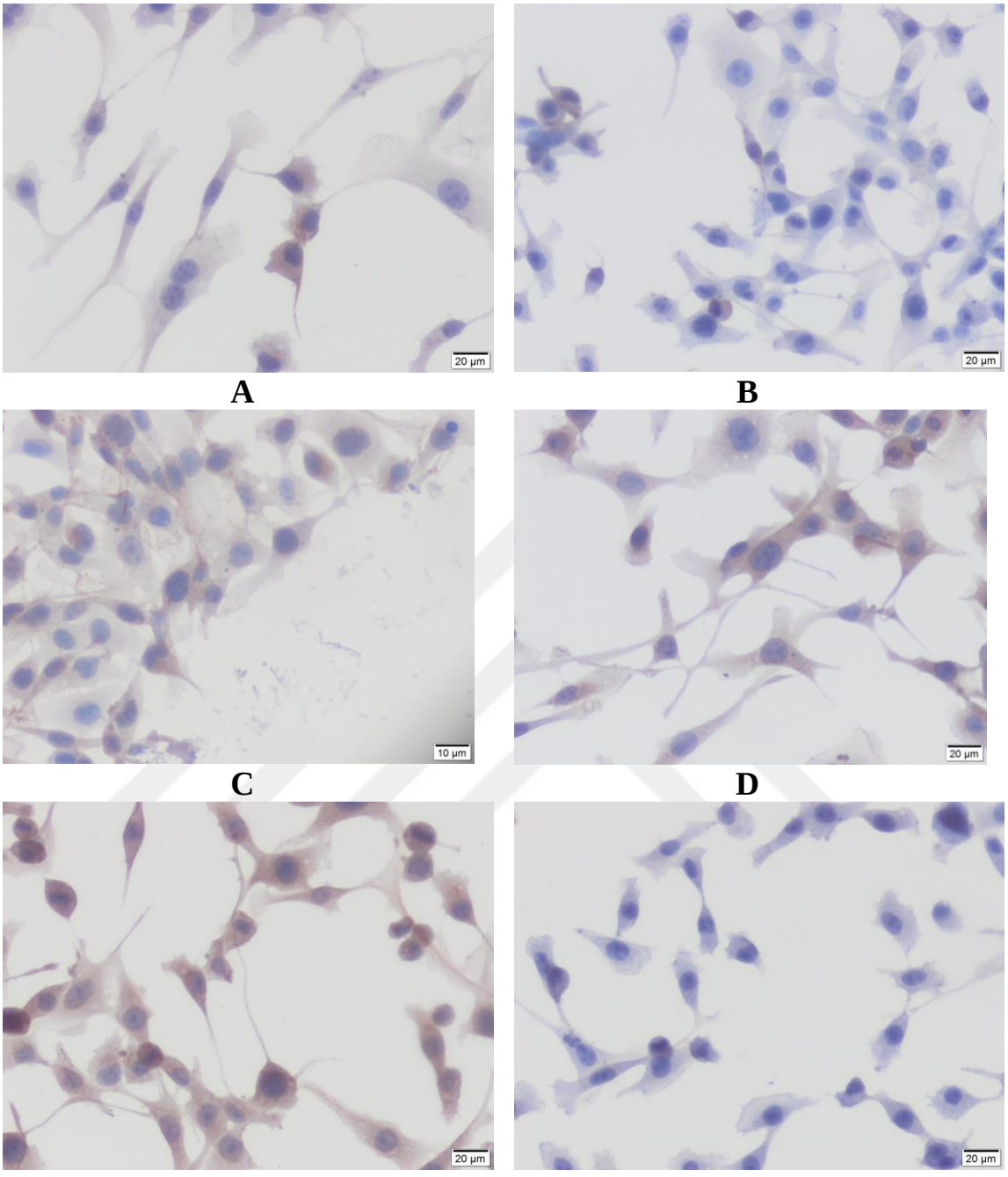
Şekil 21. 14. gün nikotin uygulaması yapılmayan grup İHC sonuçları. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması yapılmaksızın 14. gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm**.**

Çizelge7: 14. Gün immünoreaktivitelerinin kıyaslanması

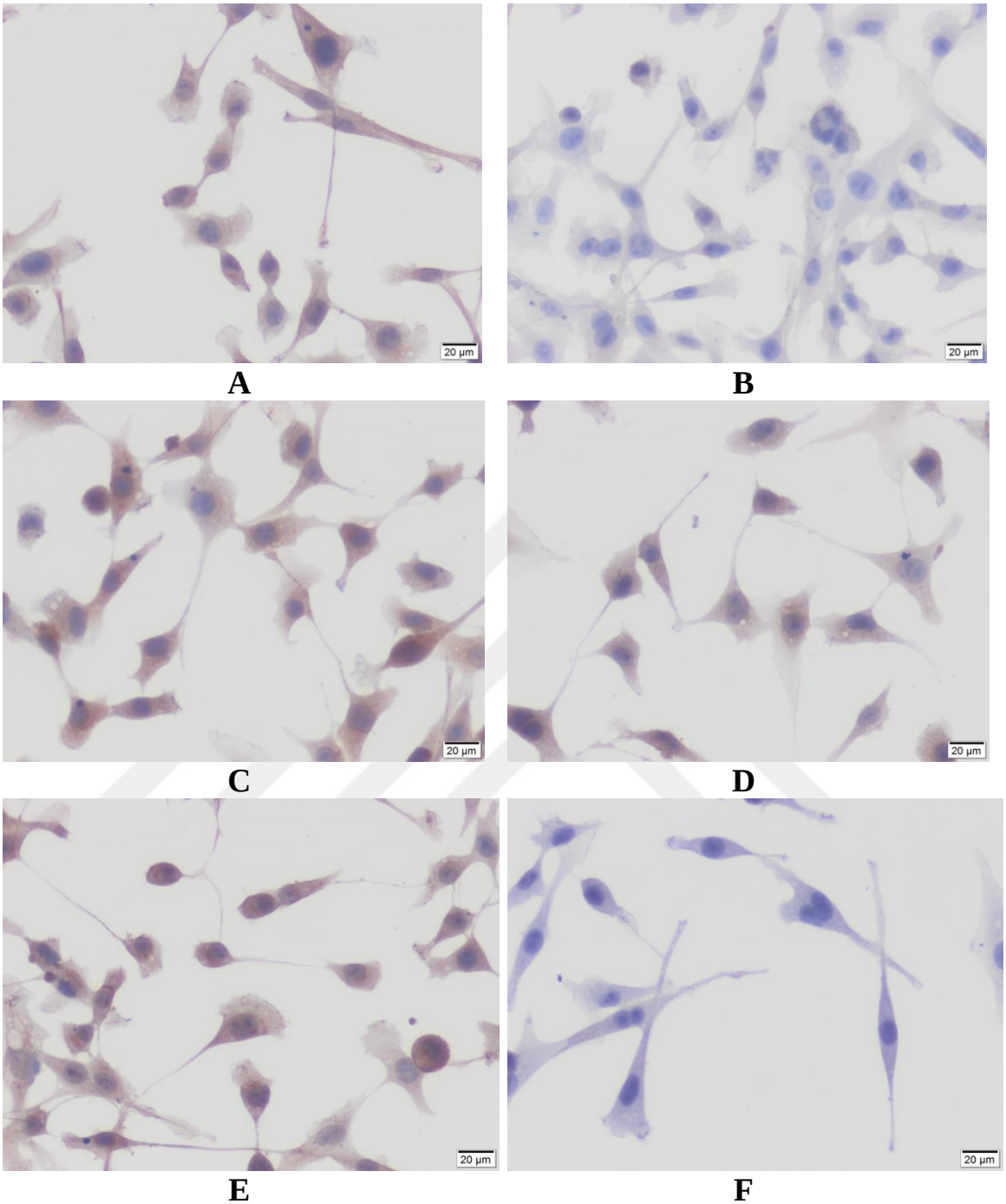
ESC 14. Gün Nöron farklılaştırma	Nikotinli	Nikotinsiz
β-3 Tubulin	++	+++
GFAP	+	+
MAP2	++	+++
Nestin	++	+++
O4	+	+

4.1.3. Üçüncü Hafta İmmünohistokimyasal Bulguları

Farklılaştırmamızın 3. Haftasında toplanan hücreler ile yapılan analiz sonuçlarına göre; β-3 Tubulin ve Map2 immünoreaktivitelerinin nikotinsiz grupta daha şiddetli olduğu görülmektedir. Gfap, Nestin ve O4 immünoreaktivitelerinde belirgin bir fark yoktur.



Şekil 22.21. gün nikotinli grup İHC sonuçları. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması ile 21. Gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm



Şekil 23.21. gün nikotin uygulaması yapılmayan grup İHC sonuçları. Embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan nöron benzeri hücrelerin nikotin uygulaması yapılmaksızın 21. Gün farklılaştırmasında β-3 Tubulin (A), GFAP(B), MAP2(C), Nestin(D) ve O4(E) immunoreaktivitesi. Kontrol immunohistokimya boyaması (F). Ölçek: 20µm**.**

Çizelge8: 21. Gün immünoreaktivitelerinin kıyaslanması

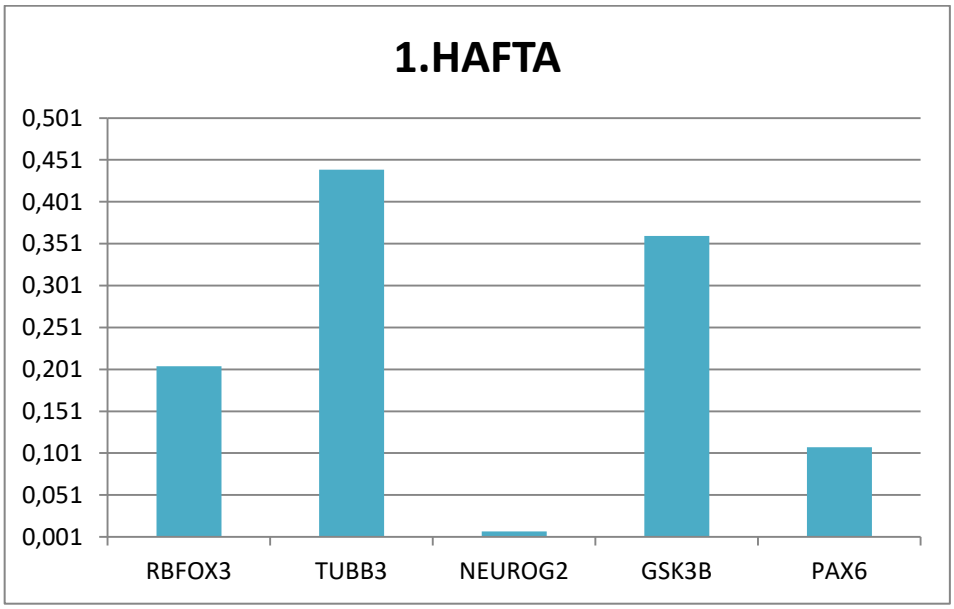
ESC 21. Gün Nöron farklılaştırma	Nikotinli	Nikotinsiz
β-3 Tubulin	++	+++
GFAP	+	+
MAP2	++	+++
Nestin	++	++
O4	+++	+++

4.2. Real Time PCR Bulguları

Real Time PCR testi sonuçları aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.

4.2.1. İlk Hafta Real Time PCR Bulguları

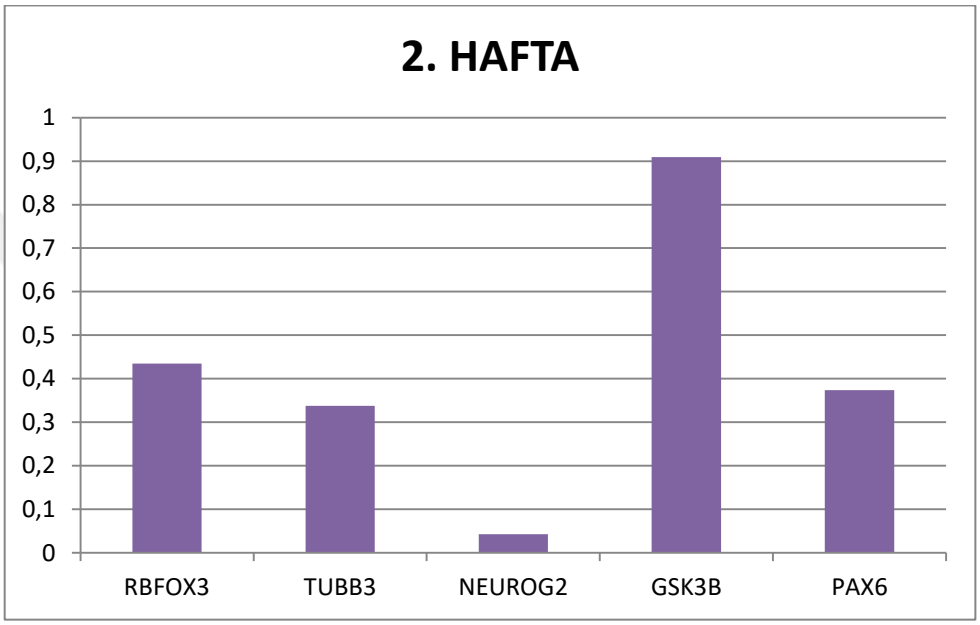
Çalışmamızda; fare embriyonik kök hücrelerinin sinir hücrelerine farklılaşması 21 gün sürmüştür. Her hafta hücrelerin bir kısmı alınarak GSK3B, RBFOX3, PAX6, TUBB3 ve NEUROG2 genlerinin ekspresyonları Real Time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Kontrol olarak ACTB geni kullanılmış olup, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre analiz edilmiştir. Kontrol ekspresyon değeri 1 kabul edilmiştir. İlk hafta sonuçlarında GSK3B, RBFOX3, PAX6 ve TUBB3 genlerinin ekspresyon seviyelerinin yarı yarıya düştüğü (0,5 kat) görülmüştür. Neurog2' nin ekspresyonu ise yaklaşık olarak 1000 kat azalmıştır (Şekil 24).



Şekil 24.7. Gün Real Time PCR sonuçları

4.2.2. İkinci Hafta Real Time PCR Bulguları

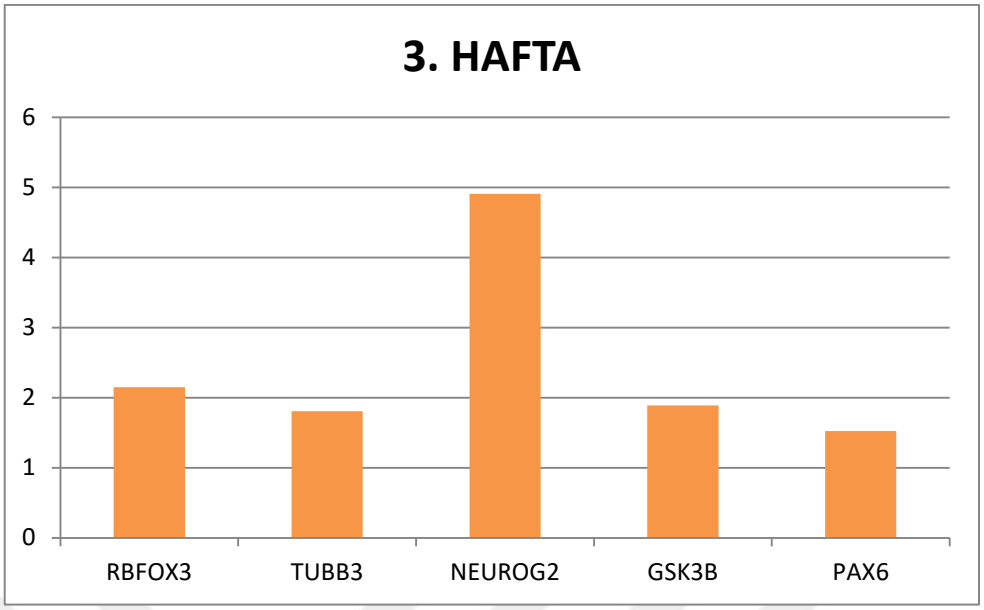
Farklılaştırmamızın 2. Haftasında toplanan hücreler ile yapılan analiz sonuçlarına göre; RBFOX3, PAX6 ve TUBB3 genlerinin ekspresyon seviyelerinin yarı yarıya (0,5 kat) düştüğü görülmüştür. GSK3B' nin ekspresyonun azaldığı ancak kontrole çok yakın olduğu görülmüştür. Yine NEUROG2' nin ekspresyonunda yaklaşık olarak 1000 kat azalma olduğu görülmüştür (Şekil 25).



Şekil 25.14. Gün Real Time PCR sonuçları

4.2.3. Üçüncü Hafta Real Time PCR Bulguları

Farklılaştırmamızın 3. Haftasında toplanan hücreler ile yapılan analiz sonuçlarına göre tüm aday genlerin ekspresyonunda artış olduğu görülmektedir. Bu artışın NEOROG2 de yaklaşık 5 kat olduğu, RBFOX3, PAX6, GSK3B ve TUBB3 genlerinde ise yaklaşık 2 kat olduğu görülmüştür. (Şekil26).



Şekil 26.21. Gün Real Time PCR sonuçları

5. TARTIŞMA

Günlük hayatımızda çeşitli biyolojik, fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalmaktayız. Sigara ürünlerinin bir bileşeni olarak bu kimyasal ajanlardan biri olan nikotin, sigara kullanmasak dahi maruz kaldığımız toplum sağlığını tehdit eden bir ajandır[2,3]. Sigara kullanımına bağlı hastalıklar dünyadaki en yaygın sağlık sorunlarından birisi olup, önlenebilir ölümlerin en sık sebebidir[9,10]. Bununla beraber sigara kullanım yaşı iyice düşmüştür[12]. Bağımlılık yapan bu kimyasal ajanı birçok gebeninde kullandığı gösterilmiştir[5].

Dikkat eksikliği/Hiperaktivite bozukluğu, otizm, görme ve duyma problemleri, mental retardasyon ve serebral palsi gibi birinci ölçüde nörolojik sistem ve beyin fonksiyon bozukluklarının sebep olduğu; birçok nörogelişimsel hastalığın sebebi tam olarak bilinmemektedir. Nörogelişimsel hastalıklarda genetik çok önemli rol oynamaktadır ve bazı hastalıklar için spesifik bir genden bahsedilmektedir. Ancak çoğu nörogelişimsel hastalık komplekstir ve kesin bir sebepten ziyade çeşitli birden fazla etkileşimden kaynaklanmaktadır. Bu hastalıkların, genetik, biyolojik, psikososyal ve çevresel risk faktörlerinin bir karışımı olarak ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bilim insanları bu risk faktörlerinden çevresel faktörleri araştırırken, özellikle fetal çevre üzerinde durmuşlardır[4]. Maternal sigara kullanımının, ileriye dönük nörogelişimsel hastalıklara neden olabileceği gösterilmiştir[113].

Birçok hayvan modeli kullanılarak yapılan çalışmalarda gebelik döneminde nikotin maruziyetinin nöroteratojen olduğu gösterilmiştir. Bu da annenin sağlığı ile birlikte gelişim sürecindeki bebeğin sağlığında da risk oluşturmaktadır[5]. Fetal dönemde nikotine maruz kalmanın ileriki dönemlerde çeşitli sağlık problemlerine yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir[24]. Fetüsün nikotine maruziyeti, doğumdan sonra davranış değişiklikleri ve bilişsel fonksiyonlarda azalmaya neden olmaktadır[5]. Nikotinin, nöron hücrelerinde replikasyon ve farklılaşmasını kötü yönde etkilediği gösterilmiştir. Aynı zamanda sinaps bölgesindeki biyokimyasal anormalliklere sebep olduğu da görülmüştür[21]. Hamilelik sırasında annenin sigara içmesi ile çocuğun davranışsal ve bilişsel gelişimi arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, hamilelik sırasında maternal sigara içmenin dolayısı ile nikotin maruziyetinin 3 ila 24 aylık çocukların sinirsel gelişimi üzerinde önemli yan etkileri olduğunu göstermiştir[5]. Sigara

içmediği halde arkadaşları veya akrabaları gibi kişilerin sigara içmesi sebebi ile nikotine maruz kalan kadınlarda pasif içiciliğin erken doğan bebeklerdeki etkilerini incelendiği bir çalışmada nikotinin nöronal gelişim üzerine zararlı etkileri olduğunu göstermişlerdir[116]. Doğum öncesi dönemde sigara içmenin ve nikotin maruziyetinin fetüsteki nörokimyasal ve davranışsal değişiklikler üzerindeki etkilerini belirlemek ve incelemek için yapılan başka bir çalışmada, 58 Long-Evans sıçanı kronik olarak doğum öncesi ve sonrası nikotine maruz bırakılmıştır. Bu maruziyet sonucunda doğan yavrularda uzamsal öğrenmede eksiklikler, davranış ve dikkat bozuklukları olduğu gözlenmiştir. Bilişsel işlevdeki bu anormalliklerin, nikotin maruziyetinden uzun süre uzak durduktan sonra bile devam ettiği gösterilmiştir[5]. Çok sayıda çalışma gebelik döneminde maruz kalınan nikotinin sinirsel gelişim üzerine çeşitli yan etkileri olduğunu göstermiştir[113]. Doğum öncesi nikotine maruz kalmanın zararlı etkilerini inceleyen bir başka araştırmada, beyin organoid modellemesi ile nikotin maruziyetinin bozulmuş nörogenezise ve anormal kortikal gelişime neden olduğu gösterilmiştir[114]. Nikotin ve şizofreni arasında bir ilişki olduğunu savunan bir çalışmada, sigara içilmesi ile artan plasma kotin miktarı ile şizofreni arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir[118].

Nikotine maruz kalan kişilerde; nikotinin, hücreye ‘dıştan içe’ ve ‘içten dışa’ olmak üzere iki farklı şekilde etki ettiği öne sürülmüştür. İlk olarak en iyi bilinen etkisi olan ‘dıştan içe’ etkisi açıklanmıştır. Bu etkide, nikotin nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nACRh) bağlanıp asetilkolin benzeri olarak bu reseptörleri aktifleştirmektedir. Bir süre sonra nACRh’ lerinde duyarsızlaşma meydana gelir ki bu nikotinin kronik etkisidir. İkinci olarak nikotinin hücreden içeri hatta Endoplazmik Retikulum içine girmesi ve burada üretilen nACRh’lerine bağlanarak şaperon gibi davrandığı ‘içten dışa’ etkisidir[115].

Sonuç olarak nikotinin fetal dönem etkileri çokça araştırılmıştır. Ancak, bu etkinin gelişimde özellikle embriyonik hücrelerin sinir hücrelerine farklılaşması sırasında hücresel düzeyde ne gibi değişiklikler yaptığı ile ilgili anlaşılmayan noktalar bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında nöral gelişim ve farklılaşmada rol alan, bununla birlikte çeşitli nörogelişimsel hastalıklar ile ilişkilendirilmiş genlerin ekspresyonunu araştırmayı amaçladık. Bu araştırma için ulusal ve uluslararası literatür taranarak; nöronal farklılaşma sırasında rol aldığı savunulan ancak daha önce nikotin ile ilişkisine bakılmamış, çeşitli çalışmalarca nörogelişimsel hastalıklar ile bağlantılı olduğu

savunulan veya nöronal farklılaşmada rolü olduğu düşünülen genler seçilmiştir. Bu yönüyle de çalışmamız literatüre yeni bilgiler ışığında farklı bir bakış açısı sunmayı amaçlamıştır. Bu genler ile birlikte literatürde nöron belirteçleri olarak kabul edilen proteinlerede İHC boyaması yaparak hem kültür sonunda nöron hücrelerini göstermeyi hem de immünoreaktivite şiddetlerini yorumlayarak nikotinin farklılaşma üzerine etkilerini nitel olarak da görebilmeyi amaçladık. İn vitro olarak 21 gün süren farklılaşma sürecinde 7. 14. ve 21. günlerde elde edilen hücrelere İHC ve ekspresyon çalışmaları yapıldı.

Çalışmamızın İHC bulguları göz önüne alındığında, nöron belirteçleri olan Map2, Gfap ve O4 (gliyal ve oligodentrosit hücre belirteci)[119] immünoreaktiviteleri; nikotinli ve nikotinsiz gruplar kıyaslandığında 7. günde görülen şiddet farkı belirgin değildir. Öte yandan β-3 tübülin (nöron belirteci) ve Nestin (nöron öncülü hücre belirteci)[119] immünoreaktivitesinin nikotinsiz grupta daha belirgin olduğu görüldü. Bu da bize nikotinli grupta farklılaşmanın geciktiğini düşündürtmektedir. 14. günde Map2, β-3 tübülin ve Nestin immünoreaktivitelerinde nikotine maruz bırakılmayan grupta nikotinli gruba nazaran şiddetlerinde artış olduğu görülmüştür. Ki bu durum farklılaşma sürecinin nikotinsiz grupta daha yoğun gerçekleştiğini düşündürmektedir.14. günde Gfap ve O4 immünoreaktiviteleri açısından bir fark bulunmaması populasyonun nörogliyal veya oligodendrit hücreleri değilde nöron hücreleri yönünde farklılaşmasından kaynaklandığını düşündürtmektedir. Farklılaşmanın 21. gününde nikotinli grupta nikotinsiz gruba nazaran Map2 ve β-3 tübülin proteinlerinin şiddetinde azalma vardır. Bu bulgular ilk izlenim olarak nikotinsiz grupta farlılaşmanın daha belirgin gerçekleştiğini düşündürtmektedir. Nestin immünoreaktivitesinin 7. ve 14. günde nikotinsiz grupta daha yoğunken 21. günde bir fark olmadığı görülmüştür. Bu durumun, farklılaşmada daha etkili olan nestin proteininin farklılaşma ile downregüle olduğunu savunan çalışmalar[119] ile uyumlu olduğunu düşünmekteyiz. 21. günde yine Gfap proteini açısından nikotinli ve nikotinsiz gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Bu da farklılaşmanın glial yönde olmadığını göstermektedir.

Nikotinin etkilerinin araştırıldığı çalışmamızda beyin fonksiyonunda önemli bir rolü olan RBFOX3 geninin ekspresyonuna bakılmıştır. Bu gen ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda RBFOX3'ün nöronal farklılaşmada rolü olduğu gösterilmiştir[55,58,60]. Bununla birlikte RBFOX3 mutasyonlarının insanlarda nörogelişimsel gecikme[63,64],

bilişsel bozukluklar[65], otistik özellikler[64] ve epilepsi[66] ile ilişkilendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızda RBFOX3'ün 7. 14. ve 21. günlerdeki ekspresyonuna baktığımızda RBFOX3 ekspresyonunun 7. ve 14. günlerde azaldığı görülmektedir (Şekil 24-25). Nikotine maruz kalmanın, nöral farklılaşmada önemli bir rolü olan bu genin ekspresyonunda azalmaya sebep olması; nikotinin nöral farklılaşmayı olumsuz yönde etkileyebileceğini düşündürtmektedir. Bununla birlikte 21. gün RBFOX3 ekspresyonunun kontrole nazaran arttığı görülmektedir (Şekil 26). Bu bize uzun vadede nikotinin etkisinin akut etkisinden daha farklı bir mekanizma ile gen ekspresyonunu etkilediğini ancak her şekilde gen ekspresyon paterninde değişikliklere sebep olarak nörogelişimsel hastalıklar için tehlikeli bir kimyasal ajan olabileceğini düşündürtmektedir.

Çalışmamızda belirlediğimiz bir başka aday gen GSK3B' dir. Bu gen ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde son zamanlarda artan kanıtlar, GSK3 sinyal yolunun, nöronal farklılaşma, proliferasyon ve nörogenez, gibi nöral gelişimin farklı yönlerinin düzenlenmesinde kilit rol oynadığını göstermektedir[77,78]. Dahası GSK3 reseptör trafiği ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir.[79] yine in vivo yapılan araştırmalarda, GSK3B' nin tamamen ortadan kaldırılmasının embriyoda ölüme neden olduğu gösterilmiştir[83,84]. GSK3B geni ile nörogelişimsel hastalıkların ilişkilendirildiği çalışmalarda; GSK3'ün Alzheimer hastalarının merkezi sinir sisteminde aşırı ifade olduğu ve tau proteinin hiperfosforilasyonuna sebep olarak Alzheimer hastalığında (AH) rolü olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, inflamasyon, ER-stresi, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz gibi hücresel hasar süreçlerinde GSK3'ün rol aldığını gösteren çalışmalar ile anormal GSK3 aktivasyonunun ayrıca Parkinson Hastalığı (PH) gibi diğer nörolojik/nörodejeneratif bozukluklarda da rol oynadığı bulunmuştur[80,81,87] Çalışmamızın sonuçlarına göre; GSK3B ekspresyonu 7. ve 14. günlerde azalmıştır. (Şekil 24-25). Ancak, 21. günde GSK3B ekspresyonu kontrole nazaran artmaktadır (Şekil 26). Farklı haftalarda farklılaşma sürecinin tamamlanmamasından kaynaklı olarak farklı tipte hücrelerde nikotinin etkisinin farklı olabileceği düşünülmektedir. Farklılaşmanın tamamlandığı 21. günde GSK3B ekspresyonunun artması ise Parkinson Alzheimer gibi nörogelişimsel hastalıklar ile bu genin ilişkili olduğunu gösteren çalışmaları destekler niteliktedir. Nikotinin, organizma üzerindeki zararlı etkilerini, hücrelerde GSK3B ekspresyonunu değiştirerek göstermiş

olabileceği sonucuna varılabilir.

Bir başka aday gen olarak düşünülen PAX6'nın göz oluşumunun yanı sıra beyin gelişiminde de önemli rolleri olduğu çeşitli çalışmalarca gösterilmiştir. Embriyonik ve yetişkin dönemde beynin farklı bölgelerinde PAX6'nın eksprese edildiği bulunmuştur[103,104,105]. PAX6 nöral kök hücreler ve nöral progenitör hücreler tarafından eksprese edilirken, farklılaşmış nöron hücreleri tarafından eksprese edilmez. Neokortekste PAX6 fonksiyon kaybı prematür nörogeneze ve nöron sayısında net bir azalmaya neden olmaktadır[101]. Bir transkripsiyon faktörü olarak PAX6' nın korteks gelişiminde rol aldığı ispatlanmıştır. Son zamanlarda yapılan genom çapındaki transkriptom analiz çalışmaları, PAX6'nın kontrol ettiği binlerce genin (downstream genleri) korteks gelişiminde rol aldığını göstermiştir[101]. Kortikogenez sürecinde ortaya çıkan anormallikler mikrosefaliye sebep olabilmektedir. Benzer şekilde, nöral gelişimde ortaya çıkan anomaliler de, zihinsel engellilik, dikkat eksikliği-hiper aktivite bozukluğu ve otizm spektrum bozukluğu (OSB) gibi nörogelişimsel rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Yine PAX6'nın OSB'e sebep olduğunu savunan çalışmalar bulunmaktadır[101,107]. Çalışmamızda, PAX6 ekspresyonunda normal süreçten farklı olarak 7. ve 14. günde gen ifadesinde yaklaşık olarak yarı yarıya (0,5 kat) bir azalma olduğu görülmektedir. 21. günde ise gen ifadesinde artış vardır ancak bu değişimin yine de nornal süreçten farklı olması (Şekil 24-25-26), PAX6' nın gelişimsel önemi de göz önünde bulundurulduğunda, nikotinin çeşitli bilişsel ve nörogelişimsel hastalıklar ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Çeşitli makalelerde, TUBB3'ün sinir sistemi gelişimi ve nöronal hastalıklarda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir[111]. TUBB3 geninde meydana gelen mutasyonların, oküler motilite bozukluğunda, otozomal dominant kalıtım gösteren oldukça yüksek penetranslı ekstra oküler kas konjenital fibrozis tip 3' e (CFEOM3) sebep olduğu gösterilmiştir[110]. TUBB3'ün ayrıca asimetrik kortikal displazi, polimikrogiri benzeri kortikal displazi ve multifokal displazi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir[110,112]. Çalışmamızın sonuçlarına göre; TUBB3 ekspresyonu 7. ve 14. günlerde azalmıştır. (Şekil 24-25). Ancak, 21. günde ekspresyonu kontrole nazaran artmaktadır (Şekil 26). Farklılaşma sırasında görülen bu değişimlerin normalden sapma olarak görülmesi nikotinin beklenildiği gibi nöronlar üzerinde muhtemel etkisini göstermektedir.

Yüksek oranda korunmuş nöral basic heliks-loop-heliks (bHLH) protein sınıfı

transkripsiyon faktörleri olarak omurgalı nörogenezinin temel düzenleyicisi olan Nörogeninler (Ngn1/2/3) den NEOROG2 bir başka aday gen olarak çalışmamızda araştırılmıştır. Nörogeninlerin nöral hücreler tarafından ifade edildiği ve gelişim sırasında önemli roller oynadığı gösterilmiştir[89,90,91,92]. Çeşitli transkripsiyon faktörlerinin araştırıldığı çalışmalarda NEUROG2'nin, fibroblast hücrelerini bile nöronlara yeniden programlayabildiğinin gösterilmesi ile nöronal farklılaşmadaki önemli rolü kanıtlanmıştır[93]. Ayrıca; nöronal farklılaşmanın araştırıldığı bir başka çalışmada, NEUROG2'nin ifadesindeki artışın nöronal farklılaşmayı sağladığı ve farklılaşma sürecini hızlandırdığı gösterilmiştir[88]. Yine nöral farklılaşmayı araştıran başka bir çalışmada NEOROG2'nin pluripotent hücrelerden olgun nöron oluşumunu indüklediği ve bu süreç için yeterli olduğu gösterilmiştir[94]. Farklı hücre tiplerinin farklılaşmasının araştırıldığı çalışmalarda NEUROG2'nin çeşitli retinal yolakları indüklediği gösterilmiştir. Periferal sinir sistemindeki NEUROG2 nöronların farklılaşmasında rol oynarken, Retinada bulunan NEUROG2 nöral olmayan retinal pigment epitel hücrelerinin retinal nöronlara farklılaşmasına neden olabilmektedir[95]. Bu tez çalışmasında 7. ve 14. günlerde 1000 kata yakın azalmıştır. (Şekil 24-25). Bu durum nikotinin farklılaşma sürecini geciktirdiğini düşündürtmektedir. Ancak, 21. günde NEOROG2' nin ekspresyonu kontrole nazaran 5 kat artmaktadır (Şekil 26). NEUROG2'nin farklılaşmayı indükleme kapasitesinin tez çalışmamızda incelediğimiz diğer bir gen olan GSK3B tarafından düzenlendiği rapor edilmiştir. Diğer taraftan, NEUROG2'nin ekspresyonu, tez çalışmamızda incelediğimiz bir diğer gen olan PAX6 tarafından da düzenlenebilmektedir. NEUROG2'nin ekspresyonunun retinoik asit, sonic hedgehog ve fibroblast büyüme faktörü tarafından düzenlenebildiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır[97,98].

Çalışmamızın bulguları incelendiğinde kök hücrelerden nöronlara farklılaşma sürecinde nikotine maruz kalmanın gen ekspresyonlarında değişimlere sebep olduğu görülmektedir. Farklılaşmada ve olgun nöron oluşumunda rollerinin yanı sıra nörogelişimsel hastalıklar ile ilşkilendirilen bu genlerin ifadesindeki düzensizliklere nikotinin sebep olması, nikotin ile yapılan diğer çalışmalarda nikotinin nöronal gelişim sürecini kötü yönde etkilediğine dair kanıtları güçlendirmektedir[5,24,116,114]. Literatürdeki nikotin ile ilgili çalışmaların sonuçları tezimizi destekler niteliktedir. Yine gelişim döneminde çevresel ajanlar sebebi ile değişen gen ifadesindeki farklılıkların ileriye

dönük sağlık problemlerine yol açtığı bilinmektedir[5,10,20,23,24]. Normal süreç göz önüne alındığında gen ifadelerinde meydana gelen değişimlerin (azalmalar veya artmalar) tehlikeli olabileceği düşünülmelidir. Mekanizması bilinmemekle birlikte birbiri ile ilişkili olduğunu düşünerek seçtiğimiz aday genlerin nikotine verilen cevapta benzerlikler göstermesi bu genlerin ilişkili olabileceğini göstermiştir. Bu bulgu ise ileriye dönük çalışmalar için araştırmacılara fikir olacak niteliktedir.

Genel olarak, farklılaşma sürecinin başında diyebileceğimiz 7. ve 14. günlerde gen ifadeleri kontrole nazaran azalmıştır. Bu nikotinin farklılaşmayı geciktirdiğini düşündürebilir. Bu düşünce immünohistokimyasal bulgularımız ile örtüşmektedir. Birinci ve ikinci hafta immünohistokimyasal bulgularımız nöral farklılaşmada rolü olan nestin immünoreaktivitesinin nikotin uygulanmayan grupta daha yoğun olması nikotin uygulamasının, farklılaşmayı olumsuz yönde etkilediğini düşündürmektedir. Bununla birlikte immünohistokimyasal bulgularımızın, Map2, β-3 Tubulin ve O4 immünoreaktivitelerinde nikotinli gruplarda nikotinsizlere nazaran azalma olması Gfap immünoreaktivitesinde bir değişiklik olmamasına rağmen, nikotin uygulamasının, farklılaşmayı olumsuz yönde etkilediğine dair düşüncemizi desteklemektedir.

Çalışmamızın bulgularından yola çıkarak ilk haftalarda gen ifadelerinin azalması sonrasında tüm gen ifadelerinde kontrole nazaran artış olması, öncelikle nikotinin uzun süreli etkisinin bir sonucu olarak nACRh'de duyarsızlaşmaya neden olmasından kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Ancak son zamanlarda gösterilen nikotinin 'içten dışa' etkisinin, nikotinin maruziyet süresinin artması ile birlikte artması sonucu olabileceğini düşündürtmektedir. Bununla birlikte nACRh' lerinin farklı alt ünitelerinin nikotine farklı hassasiyette olması ve gelişimin farklı zamanlarında eksprese edilmeleri[117] nikotinin farklılaşmanın farklı aşamasındaki hücrelerde gen ekspresyonuna farklı şekillerde etki etmesinin bir sebebi olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmamızda, gelişim sürecinde maruz kalınan nikotinin, hayatımızın daha ileriki evrelerinde, sebebini tam olarakta açıklayamadığımız kompleks hastalıkların kaynağı olabileceği hipotezi ile yola çıktık. Kompleks bir hastalık olan nörogelişimsel hastalıkların fetüsün maruz kaldığı nikotinden kaynaklanabileceğini savunduk. Bu tezimizi ispatlamak için, fare embriyonik kök hücrelerini in vitro ortamda nikotine maruz bırakarak nöron hücrelerine farklılaştırdık. 21 gün süren farklılaşma sürecinde 7. 14. ve 21. günlerde hücreler, İHC ve Real Time PCR yöntemleri kullanılarak incelendi. Bu analiz sonuçları göz önüne alındığında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır,

1. Nikotin, nöral farklılaşmada rolü olan genlerin ifadesini değiştirmesiyle gelişim sürecinde nöral farklılaşma üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir.
2. Nikotinin etkisi maruz kalınan süreye göre farklılık göstermektedir.
3. Farklılaşmanın yanı sıra nörogelişimsel hastalıklar ile ilşkilendirilmiş genlerin ifadelerinde farklılıklara sebep olarak nikotin, nörogelişimsel hastalıklar açısından risk faktörüdür.
4. Gebelik esnasında sigara kullanımı gelecek nesillerin sağlığını tehdit eden toplumsal bir sorundur.

Nikotinin zararları araştırılırken özellikle fetal çevreye odaklanılması ve bu çalışmaların artırılması, toplumsal bilincin uyandırılmasını sağlayacaktır. Sigara kullanımının muhtemel zararlarının araştırılması gerekmektedir. Ayrıca nikotinin hücreye olan etkilerinin altında yatan mekanizmalar ortaya çıkarılmalıdır. Gelişim üzerine yapılan in vitro çalışmalar hayvan deneyleri ile desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. **Neal L. Benowitz, Janne Hukkanen.** Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.***2009**;192: 29–60.

2. **I. Yamamoto, J.E. Casida.** Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor. 1st edition, Tokyo: Springer-Verlag, **1999**:1-24.

3. **Kazuhiko Matsuda, Steven D. Buckingham, Daniel Kleier, James J. Rauh,Marta Grauso and David B. Sattelle.** Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences***2001**;11: 573-580

4. Neurodevelopmental Disorders Erişim: (https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/ace3_neurodevelopmental.pdf) Erişim Tarihi: 06.09.2021.

5. **Kim C, Lee S, Ko E, Go R, Jeung E, Kim M, Choi K.** Inhibitory effects of cigarette smoke extracts on neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Reproductive Toxicology***2020**;95: 75‑85

6. What's In a Cigarette? Erişim: (https://www.lung.org/quit-smoking/smoking-facts/whats-in-a-cigarette) 2021. Erişim Tarihi: 06.09.2021

7. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Tütün bağımlılığı ile mücadele el kitabı. **2010**

8. **Karlıkaya C, Öztuna F, Aytemur Solak Z, Özkan M, Örsel O**. Tütün kontrolü. *Toraks Derg*. **2006**;7(1):51‑64.

9. **Valentinea G, Sofuoglu M**. Cognitive Effects of Nicotine: Recent Progress. *Current Neuropharmacology*, **2018**;16: 403-414

10. **Mund M, Louwen F, Klingelhoefer D, Gerber A.** Smoking and Pregnancy — A Review on the First Major Environmental Risk Factor of the Unborn *Int J Environ Res Public Health*. **2013**;10(12):6485–6499.

11. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, monitoring tobacco use and prevention policies. Geneva: *World Health Organization*; **2017**

12. **Bolat F**. Maternal smoking during pregnancy and eff ects on neonatal anthropometry: a prospective study. *Turk J Med Sci***2012**; 42 (6): 999-1005.

13. Gebelik ve sigara. Erişim (https://havanikoru.saglik.gov.tr/dosya/dokumanlar/sagligimiza_etkileri/Gebelik_ve_Sigara.pdf) Erişim Tarihi: 06.09.2021

14. **Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL.** Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.***2005**; 57(1): 79-115

15. **Benwell ME, Balfour DJ, Anderson JM**. Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[3H]nicotine binding sites in human brain. *J Neurochem***1988**; 50: 1243-1247

16. **Dempsey D, Tutka P, Jacob P, et al**. Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clin. Pharmacol Ther***2004**; 76: 64-72.

17. Payas A. Embriyonal Gelişim Üzerine Nikotinin Teratojenik Etkisine Karşı B12 Vitaminin Sıçan Ön (Üst) Ekstremite Kemiklerinin Gelişimine Etkisi. *Erciyes Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi,***2018.**

18. Nicotine and health *Drug and Therapeutics Bulletin* **2014**;52**:**78-81.

19. **Uğur M.** Sigara Bağımlılığı Ve Kadın, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. 2008;62:127-142

20. **Eppolito AK, Bachus SE, McDonald CG, Meador-Woodruff JH, Smith RF.** Late emerging effects of prenatal and early postnatal nicotine exposure on the cholinergic system and anxiety-like behavior. *Neurotoxicol Teratol*. **2010**;32(3):336-45.

21. **Kara Öncü S.** Gebelikte ve Laktasyon döneminde Nikotin Maruziyetinin kognitif fonksiyonlar üzerine olan olumsuz etkileri omega 3 kullanımı ile önlenebilir mi? *Erciyes Üniv. Tıpta Uzmanlık Tezi***2012.**

22. **J. Blood-Siegfried, E.K. Rende,** The long-term effects of prenatal nicotine exposure on neurologic development**,** *J. Midwifery Womens Health***. 2010;**55: 143–152**.**

23. **Eppolito A.K, Smith R.F.** Long-term behavioral and developmental consequences of pre- and perinatal nicotine, *Pharmacol. Biochem. Behav*. **2006**;85: 835–841

24. **Xu Z, Seidler FJ, Ali SF, Slikker W Jr**. Slotkin TA. Fetal and adolescent nicotine administration: effects on CNS serotonergic systems. *Brain Res*. **2001**;914(1-2):166-78

25. **Jiloha RC**. Biological basis of tobacco addiction: Implications for smokingcessation treatment. *Indian J Psychiatry***2010**; 52: 301-307

26. **Hezel M, Groat WC, Galbiati F.** Caveolin-3 promotes nicotinic acetylcholine receptor clustering and regulates neuromuscular junction activity. *Mol Biol Cell***2010**; 15: 302-310.

27. **Akl EA, Jawad M, Lam WY, et al**. Motives, beliefs and attitudes towards waterpipe tobacco smoking: a systematic review. *Harm Reduct J***2013**; 10: 12.

28. What are stem cells? Erişim: (https://www.eurostemcell.org/types-stem-cells-and-their-uses) Erişim Tarihi: 06.09.2021.

29. What are stem cells, and why are they important? Erişim: (https://stemcells.nih.gov/info/basics/stc-basics/#stc-I) Erişim: 06.09.2021

30. **Ramalho-Santos M, Willenbring H**. On the Origin of the Term ‘‘Stem Cell’’ Cell Stem Cell. **2007**;71,(1):35-8

31. Pınar E. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Grafen-Nanofiber Matriks Üzerinde Nöronal Farklılaşma Potansiyelinin İncelenmesi. *Marmara Üniversitesi Uzmanlık Tezi,***2019.**

32. **Noble, D.** Conrad Waddington and the origin of epigenetics, *Journal of Experimental Biology*, **2015**; 218(6): 816–818.

33. **Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J, Zandstra P.** Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture *Stem Cells***2004**;22(3):275-82

34. **Can A**. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Akademisyen Tıp Kitabevi. Ankara. **2014**

35. **Asal M, Güven S.** Stem cells: sources, properties, and cell types. *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration***2020;** 177-196

36. **Can, A. A** concise review on the classification and nomenclature of stem cells**,** ***Turkish Journal of Hematology*, 2008;25(2): 57–59.**

37. **Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot P.** Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues.*J R Soc Interface* **2010**; 689-706.

38. **Guillot P, O'Donoghue K, Kurata H, Fisk N.** Fetal stem cells: betwixt and between. *Semin Reprod Med***2006**;24(5):340-7

39. **K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki et al.,**Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors**.** *Cell*, **2007**;5: 861–872.

40. Types of Stem Cell Erişim: (https://www.unmc.edu/stemcells/educational-resources/types.html) Erişim Tarihi: 06.09.2021

41. Gencür S.Fare Endometriyumundan Geliştirilen Organoidde implantasyon Potansiyeli *Manısa Celal Bayar Üniv. Uzmanlık Tezi***2020**.

42. **Williams, R., Hilton, D., Pease, S.** ***et al.*** Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **1988**;**336:** 684–687.

43. **Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D**. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. **1988**;336(6200):688-90.

44. **Wobus AM, Boheler KR**. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*.**2005**;2: 635-78.

45. **Zakrzewsk W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z**. Stemcells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. **2019**;10(1):68.

46. **Merrell, AJ, Stanger BZ**. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **2016**;17: 413–25.

47. **Akkoç AN, Toplu N.** Kanser Kök Hücresi. *Animal Health Prodand Hyg*. **2016**; 5(1): 416 – 422.

48. **Joffe B, Leonhardt H, Solovei I**, Differentiation and large scale spatial organization of the genome. *Curr Opin Genet Dev*. **2010**;20(5):562-9.

49. **Waddington CH**. The strategy of the genes. 1st edition, New York: Routledge, **2014**:1-24

50. **Gage FH**. Mammalian neural stem cells. *Science*. **2000**;287(5457):1433-8.

51. **Dhara SK, Stice LS**. Neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Biochem*. **2008**; 105(3): 633–640.

52. **Maden M**. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. **2007**;8(10):755-65.

53. **Grabowski, P**. Alternative splicing takes shape during neuronal development. *Curr Opin Genet Dev***2011;**21:388–394.

54. **McKee, A.E., E. Minet, C. Stern, S. Riahi, C.D. Stiles, and P.A. Silver**. A genome-wide in situ hybridization map of RNA-binding proteins reveals anatomically restricted expression in the developing mouse brain. *BMCDev. Biol.* **2005**; 5-14

55. **Kim, K.K., R.S. Adelstein, and S. Kawamoto.** Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J. Biol. Chem.* **2009;**284: 31052–31061.

56. **Kim, K, Adelstein, R, Kawamoto S.** Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem* **2009;**284:31052–31061

57. **Dredge, B. K, Jensen, K. B**. NeuN/Rbfox3 nuclear and cytoplasmic isoforms differentially regulate alternative splicing and nonsense-mediated decay of Rbfox2. *PLoS One* **2011;**6: 21585.

58. **Kim KK, Nam J, Mukouyama YS, Kawamoto S**. Rbfox3-regulated alternative splicing of Numb promotes neuronal differentiation during development. *J Cell Biol*. **2013**;200(4): 443-58.

59. **Wang HY, Hsieh PF, Huang DF, Chin PS, Chou CH, Tung CC, Chen SY, Lee LJ, Gau SS, Huang HS**. RBFOX3/NeuN is Required for Hippocampal Circuit Balance and Function. *Sci Rep*. **2015**;5: 17383.

60. **Kim KK, Kim YC, Adelstein RS, Kawamoto S.** Fox-3 and PSF interact to activate neural cell-specific alternative splicing. *Nucleic Acids Res*. **2011**;39(8): 3064-78.

61. **Mullen RJ, Buck CR, Smith AM.** NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. **1992**;116(1): 201-11.

62. **Maxeiner S, Glassmann A, Kao HT, Schilling K**. The molecular basis of the specificity and cross-reactivity of the NeuN epitope of the neuron-specific splicing regulator, Rbfox3. *Histochem Cell Biol*. **2014**;141(4):457.

63. **Utami KH, Hillmer AM, Aksoy I, Chew EG, Teo AS, Zhang Z, Lee CW, Chen PJ, Seng CC, Ariyaratne PN, Rouam SL, Soo LS, Yousoof S, Prokudin I, Peters G, Collins F, Wilson M, Kakakios A, Haddad G, Menuet A, Perche O, Tay SK, Sung KW, Ruan X, Ruan Y, Liu ET, Briault S, Jamieson RV, Davila S, Cacheux V**. Detection of chromosomal breakpoints in patients with developmental delay and speech disorders. *PLoS One*. **2014**;9(6):e90852.

64. **Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, Abdel-Hamid H, Bader P, McCracken E, Niyazov D, Leppig K, Thiese H, Hummel M, Alexander N, Gorski J, Kussmann J, Shashi V, Johnson K, Rehder C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE.** A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet*. **2011**;43(9): 838-46.

65. **Lucas CH, Calvez M, Babu R, Brown A**. Altered subcellular localization of the NeuN/Rbfox3 RNA splicing factor in HIV-associated neurocognitive disorders (HAND). *Neurosci Lett*. **2014**;558: 97-102.

66. **Lal D, Reinthaler EM, Altmüller J, Toliat MR, Thiele H, Nürnberg P, Lerche H, Hahn A, Møller RS, Muhle H, Sander T, Zimprich F, Neubauer BA**. RBFOX1 and RBFOX3 mutations in rolandic epilepsy. *PLoS One*. **2013**;8(9):e73323.

67. **Zhao C, Deng W, Gage FH**. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.***2008**;132(4): 645-60.

68. **Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, Ahmari SE, Zeng H, Fenton AA, Hen R**. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron.***2013**;77(5): 955-68.

69. Kalkan Y. Sıçan Yenidoğan Ve Erişkinlerde Hippokampus Gelişiminde Nöron Sayısının Cinsiyete Ve Dönemlere Bağlı Olarak Hesaplanması (Bir Stereolojik Ve Histolojik Çalışma) *Atatürk Üniversitesi Doktora Tezi***2009**

70. **Hu S, Begum AN, Jones MR, Oh MS, Beech WK, Beech BH, Yang F, Chen P, Ubeda OJ, Kim PC, Davies P, Ma Q, Cole GM, Frautschy SA**. GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. *Neurobiol Dis*. **2009**;33(2):193-206.

71. **Embi N, Rylatt DB, Cohen P.** Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*. **1980**;107(2):519-27.

72. **MacAulay K, Doble BW, Patel S, Hansotia T, Sinclair EM, Drucker DJ, Nagy A, Woodgett JR**. Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab*. **2007**;6(4):329-37.

73. **Guha S, Cullen JP, Morrow D, Colombo A, Lally C, Walls D, Redmond EM, Cahill PA.** Glycogen synthase kinase 3 beta positively regulates Notch signaling in vascular smooth muscle cells: role in cell proliferation and survival. *Basic Res Cardiol*. **2011**;106(5):773-85.

74. **Shin S, Wolgamott L, Yu Y, Blenis J, Yoon SO.** Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2011**;108(47):E1204-13.

75. **Force T, Woodgett JR**. Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development. *J Biol Chem*. **2009**;284(15):9643-7.

76. **Watcharasit P, Bijur GN, Song L, Zhu J, Chen X, Jope RS**. Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. *J Biol Chem*. **2003**;278(49):48872-9.

77. **Kim WY, Wang X, Wu Y, Doble BW, Patel S, Woodgett JR, Snider WD.** GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nat Neurosci*. **2009**;12(11):1390-7.

78. **Ahn J, Jang J, Choi J, Lee J, Oh SH, Lee J, Yoon K, Kim S.** GSK3β, but not GSK3α, inhibits the neuronal differentiation of neural progenitor cells as a downstream target of mammalian target of rapamycin complex1. *Stem Cells Dev*. **2014**;23(10):1121-33.

79. **Wei J, Liu W, Yan Z.** Regulation of AMPA receptor trafficking and function by glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem*. **2010**;285(34):26369-76.

80. **Golpich M, Amini E, Hemmati F, Ibrahim NM, Rahmani B, Mohamed Z, Raymond AA, Dargahi L, Ghasemi R, Ahmadiani A.** Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3β) signaling: Implications for Parkinson's disease. *Pharmacol Res*. **2015**;97:16-26.

81. **Lauretti E, Dincer O, Praticò D**. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. **2020**;1867(5):118664.

82. **Soutar MP, Kim WY, Williamson R, Peggie M, Hastie CJ, McLauchlan H, Snider WD, Gordon-Weeks PR, Sutherland C.** Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. *J Neurochem*. **2010**;115(4):974-83.

83. **Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR**. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*. **2000**;406(6791):86-90.

84. **Kaidanovich-Beilin O, Lipina TV, Takao K, van Eede M, Hattori S, Laliberté C, Khan M, Okamoto K, Chambers JW, Fletcher PJ, MacAulay K, Doble BW, Henkelman M, Miyakawa T, Roder J, Woodgett JR.** Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3alpha mutant mice. *Mol Brain*. **2009**;2:35.

85. **Mao Y, Ge X, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, Tassa C, Berry EM, Soda T, Singh KK, Biechele T, Petryshen TL, Moon RT, Haggarty SJ, Tsai LH.** Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell.***2009**;136(6):1017-31.

86. **Hur EM, Zhou FQ.** GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci*. **2010**;11(8):539-51.

87. **Hernandez F, Lucas JJ, Avila J**. GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. **2013**;33 Suppl 1:S141-4.

88. **Matsushita M, Nakatake Y, Arai I, Ibata K, Kohda K, Goparaju SK, Murakami M, Sakota M, Chikazawa-Nohtomi N, Ko SBH, Kanai T, Yuzaki M, Ko MSH.** Neural differentiation of human embryonic stem cells induced by the transgene-mediated overexpression of single transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. **2017**;490(2):296-301.

89. **Takano-Maruyama M, Chen Y, Gaufo GO**. Differential contribution of Neurog1 and Neurog2 on the formation of cranial ganglia along the anterior-posterior axis. *Dev Dyn*. **2012**;241(2):229-41.

90. **Sommer L, Ma Q, Anderson DJ**. Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci*. **1996**;8(4):221-41.

91. **Jones S**. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol*. **2004**;5(6):226.

92. **Seo S, Lim JW, Yellajoshyula D, Chang LW, Kroll KL**. Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers. *EMBO J*. **2007**;26(24):5093-108.

93. **Yang N, Ng YH, Pang ZP, Südhof TC, Wernig M**. Induced neuronal cells: how to make and define a neuron. *Cell Stem Cell*.**2011**;9(6):517-25.

94. **Thoma EC, Wischmeyer E, Offen N, Maurus K, Sirén AL, Schartl M, Wagner TU.** Ectopic expression of neurogenin 2 alone is sufficient to induce differentiation of embryonic stem cells into mature neurons. *PLoS One*. **2012**;7(6):e38651.

95. **Yan RT, Ma WX, Wang SZ.** Neurogenin2 elicits the genesis of retinal neurons from cultures of nonneural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001**;98(26):15014-9.

96. **Heng JI, Nguyen L, Castro DS, Zimmer C, Wildner H, Armant O, Skowronska-Krawczyk D, Bedogni F, Matter JM, Hevner R, Guillemot F.** Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature*. **2008**;455(7209):114-8.

97. **Bolós M, Hu Y, Young KM, Foa L, Small DH**. Neurogenin 2 mediates amyloid-β precursor protein-stimulated neurogenesis. *J Biol Chem*. **2014**;289(45):31253-61.

98. **Li S, Mattar P, Zinyk D, Singh K, Chaturvedi CP, Kovach C, Dixit R, Kurrasch DM, Ma YC, Chan JA, Wallace V, Dilworth FJ, Brand M, Schuurmans C.** GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex. *J Neurosci*. **2012**;32(23):7791-805.

99. Neurogenın 2; Neurog2 Erişim: (https://omim.org/entry/606624) Erişim Tarihi: 09.08.2021.

100. **Walther C, Gruss P.** Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*. **1991**;113(4):1435-49.

101. **Kikkawa T, Casingal CR, Chun SH, Shinohara H, Hiraoka K, Osumi N.** The role of Pax6 in brain development and its impact on pathogenesis of autism spectrum disorder. *Brain Res*. **2019**;1705:95-103.

102. **Halder G, Callaerts P, Gehring WJ**. New perspectives on eye evolution. *Curr Opin Genet Dev*. **1995**;5(5):602-9.

103. **Georgala PA, Carr CB, Price DJ.** The role of Pax6 in forebrain development. *Dev Neurobiol.***2011**;71(8):690-709.

104. **Hiraoka K, Sumiyoshi A, Nonaka H, Kikkawa T, Kawashima R, Osumi N**. Regional Volume Decreases in the Brain of Pax6 Heterozygous Mutant Rats: MRI Deformation-Based Morphometry. *PLoS One*. **2016**;11(6):e0158153.

105. **Manuel MN, Mi D, Mason JO, Price DJ**. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front Cell Neurosci*. **2015**;9:70.

106. **Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M.** Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells*. **2008**;26(7):1663-72.

107. **Yamamoto T, Togawa M, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Okamoto N**. Narrowing of the responsible region for severe developmental delay and autistic behaviors in WAGR syndrome down to 1.6 Mb including PAX6, WT1, and PRRG4. *Am J Med Genet A*. **2014**;164A(3):634-8.

108. **Zipursky A**. The Genetics of Childhood Disease and Development. *Pediatr Res* **2003;**53**:** 3.

109. **Barkovich J.** Complication begets clarification in classification. *Brain*. **2013**;136(Pt 2):368-73.

110. **Romaniello R, Arrigoni F, Fry AE, Bassi MT, Rees MI, Borgatti R, Pilz DT, Cushion TD.** Tubulin genes and malformations of cortical development. *Eur J Med Genet*. **2018**;61(12):744-754.

111. **Sekino Y, Han X, Babasaki T, Miyamoto S, Kobatake K, Kitano H, Ikeda K, Goto K, Inoue S, Hayashi T, Teishima J, Shiota M, Takeshima Y, Yasui W, Matsubara A**. TUBB3 is associated with PTEN, neuroendocrine differentiation, and castration resistance in prostate cancer. *Urol Oncol*. **2021**;39(6):368.e1-368.e9.

112. **Fukumura S, Kato M, Kawamura K, Tsuzuki A, Tsutsumi H.** A Mutation in the Tubulin-Encoding *TUBB3* Gene Causes Complex Cortical Malformations and Unilateral Hypohidrosis. *Child Neurol Open*. **2016**;3:2329048X16665758.

113. **Ediger K, Hasan SU, Synnes A, Shah J, Creighton D, Isayama T, Shah PS, Lodha A;** Canadian Neonatal Network; Canadian Neonatal Follow-Up Network. Maternal smoking and neurodevelopmental outcomes in infants <29 weeks gestation: a multicenter cohort study. *J Perinatol*. **2019**;39(6):791-799

114. **Wang Y, Wang L, Zhu Y, Qin J.** Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure**.***Lab Chip***. 2018**;18(6):851-860.

115. **Shivange AV, Borden PM, Muthusamy AK, Nichols AL, Bera K, Bao H, Bishara I, Jeon J, Mulcahy MJ, Cohen B, O'Riordan SL, Kim C, Dougherty DA, Chapman ER, Marvin JS, Looger LL, Lester HA.** Determining the pharmacokinetics of nicotinic drugs in the endoplasmic reticulum using biosensors. *J Gen Physiol*. **2019**;151(6):738-757.

116. **Fuemmeler BF, Dozmorov MG, Do EK, Zhang JJ, Grenier C, Huang Z, Maguire RL, Kollins SH, Hoyo C, Murphy SK**. DNA Methylation in Babies Born to Nonsmoking Mothers Exposed to Secondhand Smoke during Pregnancy**:***An Epigenome-Wide Association Study*. *Environ Health Perspect*. **2021**;129(5):57010

117. **Dani JA**. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int Rev Neurobiol*. **2015**;124:3-19. doi: 10.1016/bs.irn.2015.07.001. Epub 2015 Aug 21

118. **Chen J, Bacanu SA, Yu H, Zhao Z, Jia P, Kendler KS, Kranzler HR, Gelernter J, Farrer L, Minica C, Pool R, Milaneschi Y, Boomsma DI, Penninx BW, Tyndale RF, Ware JJ, Vink JM, Kaprio J, Munafò M, Chen X**; Cotinine meta-analysis group; FTND meta-analysis group. Genetic Relationship between Schizophrenia and Nicotine *Dependence. Sci Rep*. **2016**;6:25671

119. **Umur N, Vatansever Hs, Umur Aş, Türköz E, Özbilgin K**. The Differentiation of Neuronal Cells from Mouse Embryonic Stem Cells. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. **2014;**20 (5): 711-718

EKLER

EK-1. STO Hücre Kültürü İçin Besiyeri İçeriği

STO için medyum,High Glucose DMEM içinde aşağıda verilen içerik ve konsantrasyonlarda olacak hazırlanmıştır.

FBS	%10
L-Glutamin	%1
Penicilin-Streptomisin	%1

EK-2. Embriyonik Kök hücreler İçin Besiyeri İçeriği

Embriyonik kök hücreler için medyum, High Glucose DMEM içinde aşağıda verilen içerik ve konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanmıştır.

FBS	%15
Non Essential Aminoasit (NEAA)	0,1mM
SodyumPirüvat	1mM
β-Mercaptoetanol	10^{-6} M
L-Glutamin	2mM
Penicilin-Streptomisin	%,1
LIF	1000iu/ml

EK-3.Embriyonik Cisimler İçin Hazırlanan Besiyeri İçeriği

Embriyonik cisimer için medyum, High Glucose DMEM içinde aşağıda verilen içerik ve konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanmıştır.

FBS	%15
Non Essential Aminoasit (NEAA)	0,1mM
SodyumPirüvat	1mM
β-Mercaptoetanol	10^{-6} M
L-Glutamin	2mM
Penicilin-Streptomisin	%,1

EK-4. Farklılaşma İçin Hazırlanan Nikotinsiz Besiyeri İçeriği

Farklılaşma için medyum, High Glucose DMEM içinde aşağıda verilen içerik ve konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanmıştır.

FBS	%15
Non Essential Aminoasit (NEAA)	0,1mM
SodyumPirüvat	1mM
β-Mercaptoetanol	10^{-6} M
L-Glutamin	2mM
Penicilin-Streptomisin	%,1
N_2 Max	%1
FGF	%0,1

EK-5. Farklılaşma İçin Hazırlanan Nikotinli Besiyeri İçeriği

Farklılaşma için nikotinli medyum, High Glucose DMEM içinde aşağıda verilen içerik ve konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanmıştır.

FBS	%15
Non Essential Aminoasit (NEAA)	0,1mM
SodyumPirüvat	1mM
β-Mercaptoetanol	10^{-6} M
L-Glutamin	2mM
Penicilin-Streptomisin	%,1
N_2 Max	%1
FGF	%0,1
Nikotin	25ng/ml

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adana'da doğdu. İlköğretimini ve Ortaöğretimini burada tamamladı. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümününden mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına başladı. Şu anda Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Doktora programına devam etmektedir.