

Kokain ve Amfetamin ile Regüle Edilen Transcript" (CART) Peptidini Tanıyan G Protein Kenetli Reseptör
Adaylarının Tayini

Proje No: 110T717

Doç. Dr. Çağdaş D. SON

Merve Kasap

Ocak 2014

ANKARA

İçindekiler

İçindekiler	ii
Tablo ve şekil listeleri	iii
Özet	1
Abstract.....	2
Proje ana metni	3
Giriş	3
Kokain ve Amfetamin ile Regüle Edilen Transkript.....	3
1.1.1. CART Peptidi Geni	4
1.1.2. CART Peptidi Yapısı.....	4
1.1.3. Peptidin Doku Dağılımı	5
1.1.4. CART Peptidinin Biyolojik Etkileri	5
1.1.5. CART Kaynaklı Sinyal Yolakları.....	7
Genel bilgiler.....	9
Gereç ve Yöntem.....	100
2.1. Mikroarray Veri Analizi.....	10
2.2. Hücre Kültürü	20
2.3. RNA Eldesi.....	21
2.4. DNase Muamelesi	21
2.5. Toplam RNA için Agaroz Jel Elektroforez	21
2.6. cDNA sentezi	21
2.7. Primer Tasarımı.....	21
2.8. q-RT-PCR	23
Bulgular ve tartışma/sonuç	25
3.1. Mikrodizi Veri Analizi Sonuçları	25
3.2. q-RT-PCR Sonuçları	29
3.2.1. Bai 3 geni için sonuçlar.....	29
3.2.2. Seçilmiş Gen İfadelerindeki Katlı Değişim	33
Referanslar	35
Ekler	38
Proje Özet Bilgi Formu, sonuç raporunun son sayfası olarak eklenmelidir.....	48

Tablo ve şekil listeleri

Şekil 1 İnsandaki CARTPT geninin Ensembl'dan alınan intron-ekzon görünümü.....	4
Şekil 2 CART peptidi amino asit dizilimi.....	4
Şekil 3 Üç boyutlu CART yapısı.....	5
Şekil 4 Enerji Homeostasisi	6
Şekil 5 GEO GSE25901	10
Şekil 6 GEO GSE25901 veri serisinin devamı	11
Şekil 7 GEO2R'da bulunan GPL11059 Platformunun Veri Temsil Şekli.....	11
Şekil 8 BRB ArrayTools Ekran Görüntüsü	12
Şekil 9 Veri Yükleme Sekmesi.....	12
Şekil 10 BRB ArrayTools ver yüklemesi sırasında dosya sayısı	13
Şekil 11 BRB ArrayTools Kanal Tercihi	13
Şekil 12 Çift Kanallı veri için ekspresyon seçimi	13
Şekil 13 Verilerin Excel dosyasına yüklenirken kolon seçimi	14
Şekil 14 BRB ArrayTools'un Gen Tanımlayıcı Opsiyonları.....	15
Şekil 15 Spot filtre seçeneği	15
Şekil 16 Normalizasyon Seçeneği	16
Şekil 17 Gen Filtresi Seçeneği.....	17
Şekil 18 Gen İsimlendirmesi Sekmesi.....	17
Şekil 19 İlk olarak elde edilen gen prob IDleri	18
Şekil 20 Webgestalta yüklenen gen IDlerinin isimlendirilmesinin ardından elde edilen gen listesi	19
Şekil 21 q-RT-PCR için N2a örneklerinin hazırlanması.....	23
Şekil 22 GEO2R'da top 250 gen listesinden örnek	25
Şekil 23 BRB ArrayTools Veri Analizi Sonucunda Elde Edilen Ham Veri	26
Şekil 24 Serpme Çizim Grafiği.....	26
Şekil 25 KEGG yolak analizi sonucunda ortaya çıkan iki ilişkili yolak.....	28
Şekil 26 Nöroaktif ligand-reseptör etkileşimi	28
Şekil 27 Uzun süreli depresyon	29
Şekil 28 Örneklerin renk anlamları.....	30
Şekil 29 <i>Bai3</i> geninin kantitasyon grafiği	30
Şekil 30 Erime Eğrisi Grafiği	31
Şekil 31 <i>Bai3</i> genin standart eğri grafiği	31
Şekil 32 Agaroz Jel Görüntüsü	32
Şekil 33 Seçili Genlerdeki Katlı Değişim Grafiği (mean \pm SEM from N2a cell line and AtT-20 cell line per gene group, $p < 0.001$)	33

Tablo 1 N2a Hücreleri için Hazırlanan Büyüme Ortamı Bileşenleri	20
Tablo 2 AtT-20 Hücreleri için Hazırlanan Büyüme Ortamı Bileşenleri	20
Tablo 3 Primer Sekansları	22
Tablo 4 q-RT-PCR Ana Karışımının Bileşenleri	23
Tablo 5 Q -RT -PCR deneyi için 2 adımlı tepkime koşulları	24
Tablo 6 Nihai Gen Listesi	27
Tablo 7 Agaroz Jele Yüklenen Örneklerin Sırlaması.....	32

Özet

CART (Kokain ve Amfetamin ile Regüle Edilen Transkript) yeme ve ödül mekanizmalarında, ilaç bağımlılığı, stres, kardiovasküler aktiviteler ve kemik yenilenmesinde görev alan önemli nörohormon/modülatörlerden biridir. Ayrıca, nöronların koruyucu etkileri öne sürülerek nöronlarda başkalaşmayı sağlama özellikleri de gösterilmektedir. CART peptidleri beyinde, hipofizde, adrenal bezlerde, pankreasta ve bağırsakta yüksek miktarlarda sentezlenmektedir. Bu önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip olmasına rağmen CART reseptör ya da reseptörleri henüz belirlenememiştir.

CART peptidinin; CART-I (55–102) ve CART-II (62–102) olmak üzere iki aktif formu bulunmaktadır. Bu aktif peptitler pek çok nöronda c-Fos seviyelerini artırarak sinyal yollarını indükler. Hipofizden alınmış hücre hatlarında CART; büyüme faktörlerini, hormonları ve nörotransmitterleri aktive etmekten sorumlu ERK (extraselüler sinyalle regüle edilen kinaz) aktivitesini uyarmaktadır. ERK1 ve 2'nin aktifleşmesini indükleyen CART'ın etkisi; boğmaca toksini, genistein ve U0126 gibi MEK (MAPK/ERK kinaz) inhibitörleri tarafından bloke edilmekte ve MEK1 ve 2 kinazları da bu oluşuma katılmaktadır. Böylece, fosfo-ERK oluşumu engellenmesiyle, CART sinyalinin Gi/Go reseptörü katılımıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Elektrokimyasal çalışmalar sonucunda CART etkisinin G proteine bağlanan reseptörleri (GPCR) içerdiği düşünülse de, deneysel analizlerin yetersizliğinden reseptörler tam olarak tanımlanamamıştır. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda CART reseptörünün GPCR olduğu; özellikle, Gi/Go kenetli bir reseptör olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmamızda, CART peptidinin bağlandığı reseptör ya da reseptörleri tespit etmek için CART peptidine cevap veren hücre hatlarında mRNA seviyesi en yüksek olan ve henüz ligantı bulunmamış en yüksek ifadeyi 10 GPCR geni tespit edilmiştir. **Hipotezimiz CART peptidine duyarlı hücreler ile duyarlı hücreler arasında farklı ifade edilen GPCR lardan bir ya da birden fazlasının CART ile etkileşerek ERK1 ve 2 sinyal yollarını indüklemesidir.** Hipotezimizi test etmek için, çalışmamızda izleyeceğimiz iki ana yol bulunmaktadır:

1. CART'a duyarlı ve CART'a duyarlı hücre hatlarından elde edilmiş olan mikrodizi verilerinin analizi ile CART'a duyarlı hücre hatlarında farklı ifade edilen GPCR genlerinin tespiti,
2. Eş zamanlı (q-RT) PCR ile bu genlerdeki ekspresyonu iki hücre hattında karşılaştırmalı olarak incelemek.

Deneylerimizi gerçekleştirmek için, CART reseptörünü bulundurduğu bilinen fare hipofizi epitelyal tümör hücre hattı AtT-20 ile CART reseptörünü bulundurmadığı bilinen N2a (fare nöroblastoma) hücre hattı aday genlerin incelemesi için kullanılmıştır.

Sonuç olarak, mikrodizi veri analizi ile uyuşan q-RT-PCR sonuçları CART reseptörü için aradığımız uygun aday genler olarak seçilmiştir. İlerleyen çalışmalarda, bu aday genlerin N2a hücre hattına klonlanmasıyla, bu gen ürünlerinin CART reseptörü olup olmadıkları araştırılabilecektir. CART reseptörlerinin tayinine yönelik bu çalışmamız; CART fonksiyonlarının hücresel mekanizmalarına açıklık getireceği gibi CART bağlantılı fonksiyonlara yönelik ilaç geliştirme araştırmalarına ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: CART peptidi, reseptör, ERK fosforilasyonu, AtT-20 hücre hattı, N2a hücre hattı

Abstract

Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptides are neurotransmitters and endocrine factors in the nervous system and periphery. CART codes for a neuropeptide hormone with a number of biological roles which are important for the mammalian physiology such as the controlling feeding behavior, drug reward, bone remodeling, sensory processing, neuroendocrine function, stress anxiety, cardiovascular function, gastrointestinal motility and development. In hypothalamus, behavioral and drug studies showed that CART can suppress the feeding behavior. Also, they have neuroprotective properties, and promote the survival and differentiation of neurons *in vitro*, CART peptides appear early in the development of the CNS and other tissues suggesting a role in the development of specific regions of the brain, GI tract, pancreas and ovary. Although CART peptide plays very important roles and has important physiological functions, CART receptor/s has not been identified yet.

There are two forms of the CART peptide: CART-I (55–102) and CART-II (61–102). These active forms cause an increase in c-Fos levels in a variety of neurons. Because of the observed effects of CART peptide on differentiation and development, CART 55–102 effects are examined to alter the MAPK cascade and the phosphorylation state of ERK1 and 2. ERKs are known to be activated by a variety of growth factors, hormones and neurotransmitters, and it is found that CART peptide stimulation strongly regulates ERK activity in pituitary-derived cell lines. The CART effect is blocked by inhibitors such as U0126, genistein and pertussis toxin, indicating the involvement of the upstream kinases, MEK1 and 2. Therefore, the involvement of a Gi/Go coupled GPCR in CART signaling is considered as possibility. Previous electrophysiological studies suggested that the effects of CART may involve G-proteins, but concrete biochemical evidence for a G-protein-mediated pathway activated by CART has been lacking; the CART receptor is a GPCR that is been showed, and specifically one that is coupled to Gi/Go.

In this study, microarrays to measure the mRNA levels of a comprehensive profile of non-chemosensory orphan GPCRs and over a hundred GPCR signaling related gene products were used to choose top 10 candidate genes among them by analyzing the microarray data. Our hypothesis is that between the CART responsive cell lines and CART nonresponsive cell lines, one or more of differentially expressed GPCR genes induce ERK1 and 2 signaling pathways by interaction. In this project we follow two approaches in order to test our hypothesis:

1. Identifying the candidate genes by microarray data analysis of CART responsive and nonresponsive cell lines to find the differentially expressed ones.
2. Validate the expressions of candidate genes in comparison of CART responsive and nonresponsive cell lines by q-RT-PCR.

In order to carry on our experiment with CART receptor candidate genes, we used mouse pituitary epithelial-like tumor cell line AtT-20 which includes CART receptor and mouse neuroblastoma cell line N2a which is not housing the CART receptor.

The results obtained from this presented study allow us to narrow down the candidate genes for CART peptide receptor. In further studies, by cloning these candidate genes to N2a cell line, candidate gene products can be investigated if they are the receptors of CART peptide. Results of this project helped us identify CART receptor candidates and which could be used in future studies to identify unknown CART functions, CART related pathways and related drug design investigations.

Keywords: CART peptide, receptor, ERK phosphorylation, AtT-20 cell line, N2a cell line

Proje ana metni

Giriş

Kokain ve Amfetamin ile Regüle Edilen Transkript

Kokain bağımlılığı üzerinde yapılan çalışmalar sırasında, Oregon'daki bir araştırma ekibi kokainin hayvanlarda bir mRNA düzeyinde artışa neden olduğunu buldu (Douglass *et al*, 1995). Bu mRNA ürünü, "kokain ve amfetamin ile regüle olan transkript (CART)" olarak adlandırıldı. Bu mesajcı RNA hayvanlara enjekte edildiğinde kokain ve amfetamine benzer etkilere neden olmuştur. Fakat kokainle birlikte enjekte edildiğinde CART, kokain ve amfetamin etkisini bloke etmiştir.

Araştırmalar CART peptidinin, sadece beyinde değil vücutta da bol miktarda bulunduğunu göstermiştir. Bu nedenle; ilaç bağımlılığı, endokrin kontrol, besleme, stres ve daha birçok önemli yolağa etkisi olduğu düşünülmektedir. 1998 yılında, hipotalamik CART'ın anoreksijenik etkiye neden olduğunun ortaya çıkmasıyla birlikte, CART peptidi araştırmalar için güncel bir konu haline geldi.

İlerleyen çalışmalar CART'ın; beslenme davranışı kontrolü, ilaç ödül mekanizması, kemik modellenmesi, duyu algısı, stres ve anksiyete, kardiyovasküler fonksiyon, gastrointestinal motilite ve gelişim modülasyonu gibi biyolojik çeşitli mekanizmalar önemli rol oynayan önemli bir nöropeptid olduğunu göstermiştir.

Önemli bir nöropeptid olmasına rağmen, CART'ın bağlandığı reseptör ya da çalışma mekanizması tespit edilememiştir.

1.1.1. CART Peptidi Geni

İnsanda CART peptidi *CARTPT* geni tarafından kodlanır. *CARTPT* geni 5. kromozom üzerinde, yaklaşık iki kb'lık bir genomik DNA kesimi üzerinde yer alır. Transkript 900 nükleotid uzunluğundadır ve 3 farklı ekzon içermektedir (Kuhar *et al.*, 2002).

No. Exon / Intron	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence	
5' upstream sequence					cctggaacccggcgccattgacgtcaagcgccgggagcgctgectac	
1	ENSE00001306358	71,014,990	71,015,279	-	0	290	AGACGGTTGACCCGGGCCCTCCACACCCCTTCCTTCTTGGCCTCCTCCCTTTTC TGCACGGGGCTCGGGCTCACTATAAAAGGTGGGAGCGCTGTCGCCAGCAACGACGA GTTTCAGAACGATGGAGAGCTCCCGCGTGAGGCTGCTGCCCTCCTGGGCGCCCTGC TGCTGATGCTACCTCTGTTGGGTACCCGTGCCAGGAGCGCCGAGCTCCAGCCCCGAG CCCTGGACATCTACTCTGCCGTGGATGATGCCTCCACAGAGAAGGAGTG
Intron 1-2	71,015,280	71,015,706			427	gtcggattcccctcgctctcgacc.....caggctccgaagcggtgtgttcag	
2	ENSE00001083530	71,015,707	71,015,790	0	0	84	ATCGAAGCGCTGCAAGAAGTCTTGAAGAAGCTCAAGAGTAAAGCTGCCAICTATGAG AAGAAGTATGGCCAAGTCCCATG
Intron 2-3	71,015,791	71,016,334			544	gtaaggtttgtggtcactccctcc.....atgaccacacattttgtgtttcag	
3	ENSE00003474230	71,016,335	71,016,875	0	-	541	TGTGACGCGGTGAGCAGTGTGCAAGTGAAGAAAGGGCAAGGATCGGGAAGCTGTGTGAC TGTCCCGGAGAACCTCCTGCAATTCCTTCCCTGGAAGTCTTAAGAAGGGCGTCCAT TCTCTCCATACATCCCATCCCTCTACTTTCGCCAGGACCACACCTTCCCTCCGGA GTTTGGCTTAAGCAACAGATAAAGTTTTTATTTTCTCTGAAGGAAAGGGCTCTTTTC TGCTGTTCAAAAATAAAGAACACATTAGATGTTACTGTGTGAAGAATAATGCCTGTGA TGGTGTGATACGTGTGGAAGTATTCTTATTTTATTGCTGACAACTCTGTGTACC TTTGTGTAAGAAGGGAAGCTTTGTTTGAATAATTGATTTTTGTATGTCATGGCAGGAGAA TGAAAATTAGATCTAGCTAATCTCGGTAGATGTCATTACACCTGGAAAATAAATCACC TAAGTGACACAAATTGAAGCATGTACAAATTATACATAATAAAGTTTTTAATAATTGC C
3' downstream sequence						catagtgcactgctgttttcatataagtaatttaagtggaatggtgaga.....	

Şekil 1 İnsandaki CARTPT geninin Ensembl'dan alınan intron-ekzon görünümü

129 amino asit (aa) uzunluğundaki uzun form (u) peptid ve 116 aa uzunluğunda kısa form (k) olmak üzere iki formu vardır. Fare (f) ve sıçandakine (s) benzer olarak, CARTPT geni insanda ikinci ekzonun 39 nükleotidi kaybetmesiyle iki alternatif CART peptidi meydana getirir: suCART-116 aa sıçan, hayvan ve insanda bulunmakta; muCART-129 aa ki bu peptid sadece fare ve sıçan türlerinde bulunmaktadır.

1.1.2. CART Peptidi Yapısı

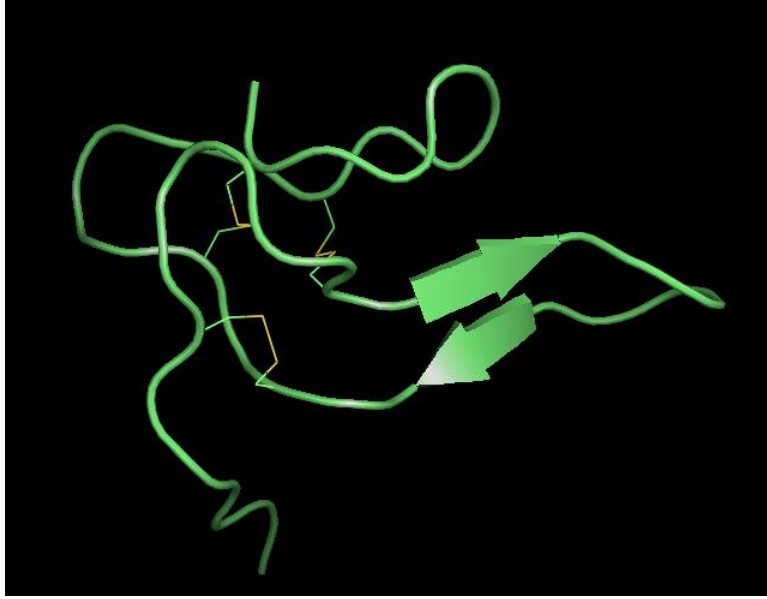
Post-translasyon sonucu CART iki aktif biyolojik peptid formuna dönüşür: CART 55-102 (**CART I**) ve CART 61-102 (**CART II**).

1Q	2Q	3Q	4Q	5Q	6Q
MESSRVRLLP	LLGAALLML	PLLGTRAQED	AELQPRALDI	YSAVDDASHE	KELIEALQEV
7Q	8Q	9Q	10Q	11Q	
LKKLKSRRVP	IYEKKGQVP	MCDAGEQCAV	RKGARIGKLC	DCPRGTSCNS	FLLKCL

Şekil 2 CART peptidi amino asit dizilimi

CART türleri içerisinde muhafaza edilir. Kodlama bölgesi, sıçan ve fare arasında % 98 benzerlik sergiler. Bu korunum peptidin üçüncül yapısının korunduğunu ve disülfür bağlarının bunu stabilize edilebildiğini göstermektedir (Thim *et al.*, 2001).

Kristalleşme çalışmaları CART'ın, iki anti-paralel β yaprağı ve üç disülfid bağına sahip olduğunu göstermektedir (**Şekil 3**).



Şekil 3 Üç boyutlu CART yapısı

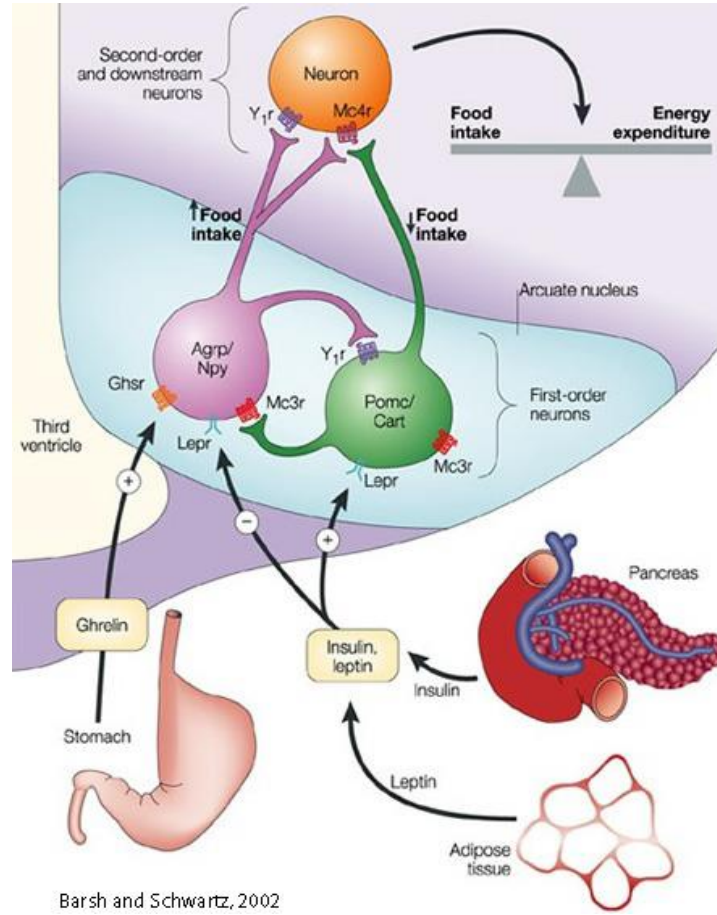
1.1.3. Peptidin Doku Dağılımı

CART; beyinde mezolimbik dopamin sistemi (VTA ve Nac), hipotalamusta, hipofizde, arka beyinde, çeşitli doku adacıklarında, sempatik pregangliyonik nöronlarda ve mide-bağırsak sisteminde, adrenal bezleri ve çeşitli miyentrik nöronların çekirdekleride sentezlenir.

1.1.4. CART Peptidinin Biyolojik Etkileri

1.1.4.1. Enerji Homeostasisindeki Yeri

Arkuat çekirdeğinde iki çeşit nöronal hücre bulunur: AgRP/NPY ve POMC/CART nöronları. AgRP, agouti ile ilişkili protein; NPY ise nöropeptiddir. Bu nöropeptitler, enerji tüketimini azaltarak gıda alımını teşvik eder. Öte yandan, proopiomelanocortin, POMC ve CART gıda alımını inhibe ederek ve enerji tüketimi arttıran nöropeptidlerdir. İnsülin ve leptin POMC/CART nöronları uyarırken, AgRP/NPY nöronlarını ise inhibe eder. Aynı şekilde, AgRP/NPY aktivasyonu daha düşük insülin ve leptin salgılanmasına neden olur. Aynı zamanda mide de salgılanan girelin de, AgRP/NPY nöronlarını aktive eden etkide bulunmaktadır. Bu nedenle, ghrelin gıda alımında bir uyarıcı (**Şekil 4**) gibi rol oynar. Plazmadaki girelin düzeyi, yemekten önce artmakta sonrasında ise sonra düşüş göstermektedir (Cummings *et al.*, 2001).



Şekil 4 Enerji Homeostasisi

Burada, Ghsr büyüme hormonu sekretagog reseptörü, lepr leptin reseptörü, Mc3r/Mc4r 3/4, melanokortin reseptörü olup, Y1r ise nöropeptid Y 1 reseptördür.

1.1.4.2. Kemik Yapısındaki Yeri

Kemik yeniden yapılanması iskelet adaptasyonun zamanla oluşmasıyla geçen süreçtir. Yetişkin bireylerde, kemik oluşturan osteoblastların ve kemik erimesi ile ilgili osteoklastlar kemiğin kütle dengesini korumak için birbirleri ile etkileşir. Bu hücrelerin düzenlemeleri oldukça karmaşıktır. Mevcut çalışmalar nöronal yolları vasıtasıyla düzenlendiğini olduğunu göstermektedir. Örneğin Leptin, sempatik yoldaki osteoblast reseptörlerine yollanan sinyaller, hipotalamus tarafından stimule edilir. Leptin enerji homeostasisinin yolları ile ilişkili olduğundan, CART ve serotoninin süngerimsi kemik oluşumunu düzenleyen beyin sapı ve hipotalamus ile etkileşimde olduğu tespit edilmiştir (Driessler & Baldock, 2010). Aynı şekilde, NPY vücut ağırlığı ve kemik kütlesi ile koordine iskelet çapındaki osteoblast aktivitesinin modüle edilmesi için hipotalamik Y2r ile etkileşimde hareket eder.

CART genel olarak hipotalamusta, pankreas ve böbrek üstü bezlerinde etki gösterdiğinden, CART nakavt farelerinde de görüldüğü gibi periferik organlardaki CART azalmaları, CART peptidinin kemik emiliminin potansiyel bir regülatörü olabileceğini düşündürmektedir. Tutarlı olarak, bu hayvanlarda kemik resorpsiyonundaki artışa bağlı olarak osteoporoz gözlenmektedir. Ayrıca, CAR- eksik farenin yabancı tip farelere kıyasla kemikteki RANKL seviyeleri daha yüksektir. Kemik üzerindeki CART etki merkezi,

CART'ın meydana getirdiği değişiklikler için yerel bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir (Driessler & Baldock, 2010).

1.1.4.3. Stres Müdahalesindeki Yeri

Organizmanın homeostasisini rahatsız eden her çeşit tehdit stres faktörü olarak adlandırılmakta ve tehditlere karşı organizma tarafından oluşturulan tepkilere tepkisi denilmektedir. Stres tepkisi nöronal ve nöroendokrin yolları oluşturur. Hipotalamo-hipofiz yolu bu yollar arasında önde gelen bir role sahiptir (Pacak & Palkovits, 2001). Ancak, hipotalamo-hipofiz kontrolünün önemli rolü yanında onu kesen HPA eksenini de stres yanıtında önemli bir role sahiptir. Bu kapsamda, HPA eksenindeki önemli miktardaki CART peptidi salgılanması bu yolağa öncülük eden önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Pogun *et al.*, 2006).

Stres tepkisi, yeme bozuklukları ve psikostimulan eylemler arasında güçlü bir ilişki vardır. Stres, uyuşturucu bağımlılığının en önemli etkenlerinden biridir. Stres-uyuşturucu ilişkisi, glukokortikoide maruz dopaminerjik nöronların artan duyarlılığından kaynaklanmaktadır (Piazza & Le Moal, 1998).

Uyuşturucu bağımlılarının normal bireylere göre daha aktif HPA ekseninin olması HPA eksenini aktivasyonu ve CRF düzeyleri arasında doğru orantılı bir ilişki olmasından kaynaklanır (Goeders, 2003).

CART gen aktivasyonu; hipotalamus, hipofiz tarafından, CART peptid sentezi ve salgılanması ise glukokortikoidler tarafından düzenlenir. Kandaki CART seviyelerindeki değişim, HPA eksenindeki etkinlik ve glukokortikoidler arasındaki etkileşimden kaynaklanabilir (Pogun *et al.*, 2006). CART moleküler yollarının mekanizması bilinmedikçe, bu açıkça anlaşılamaz.

1.1.5. CART Kaynaklı Sinyal Yolları

CART yolağı ve akış aşağıının hangi reseptör ya da reseptörler ile etkileşime geçerek başlatıldığına dair çok az bilgi bulunmaktadır (Zhang, Han ve Xu, 2012).

CART I ve II peptidlerinin pek çok nöronda c-Fos seviyelerinde artışa neden olduğu bilinmektedir. CART peptidinin, farklılaşma ve gelişim üzerinde gözlenen etkileri dolayısıyla, CART 55-102 formu bu MAPK yolağında ya da herhangi ERK 1 ve 2 fosforilasyonunda bir değişikliğe neden olup olmadığı test edilmiştir. Burada sözü geçen ERK'ler büyüme faktörleri, hormonlar ve nörotransmitterleri aktive eden proteinlerdir. Çalışmalar sonucunda CART peptidinin hipofiz kaynaklı *in vitro* hücre hatlarında in ERK aktivitesini düzenlediği tespit edilmiştir. CART etkisi; U0126 (yapay ve yüksek ölçüde seçici MAPK/ERK inhibitörü), genistein ve pertussis toksin (PTX) gibi inhibitörler tarafından bloke edilebilir. Bu inhibisyon MEK1&2 kinazlarının katılımını göstermektedir. Bu nedenle, CART sinyalinin GPCR'ların G_i/G_o alt ünitesinin uyarımıyla iletiliği düşünülmektedir.

Önceki elektrofizyolojik çalışmalar CART etkisinin G - proteinleri içerdiğini önermiştir. Bununla birlikte, yine pek çok kanıt bir G protein vasıtasıyla uyarı iletiminin gerçekleştiğini gösterse de, ayrıntılı bilgiye ulaşamamıştır. Ayrıca, CART reseptör veya reseptörlerinin spesifik olarak G_i/G_o bağlanmış biri GPCR olduğu düşünülmüştür, çünkü CART I de voltaja bağımlı hücrelerde Ca sinyalinin inhibe etmiştir (Kuhar *et al.*, 2005).

ERK ilgili yollağı ilişkiyi bulmak amacıyla, birçok hücre tipleri CART'ın yüksek düzeyde ERK fosforilasyonuna (PERK) neden olup olmadığı incelenmiştir. HEK293, PC12, N2a, ve CATH.a hücre hatları bu amaçla incelenmiştir. Sadece hipofizden türetilmiş olan AtT20 ve GH3 hücre hatları anlamlı

yanıtlar vermiştir (Dominguez, Lakatos, ve Kuhar, 2002), (Kuhar *et al.*, 2005). PERK seviyeleri zaman tutularak western blot ile test edilmiş ve sonuçlar PERK düzeylerinde önemli ölçüde artışa neden olduğunu ortaya koymuştur (Kuhar *et al.*, 2005).

Genel bilgiler

GPCRların kapsamlı profili ve ilgili gen ürünleri hakkında yapılan mikrodizi çalışmasında, mRNA seviyeleri analiz edilmiştir. CART peptidine ait olabilecek aday genler de bu çalışmadan elde edilen verinin analiziyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmada; HEK293, AtT-20, BV2 ve N18 olmak üzere dört hücre hattından elde edilen örnekler kullanılmıştır. Daha önce belirtildiği gibi, CART peptidi AtT-20, GH3 ve farklılaşmış PC12 hücre hatlarında PERK seviyelerinde bir artışa neden olurken; N2a, HEK293 gibi hücre hatlarında ise böyle bir artışa sebep olmamıştır.

Sunulan bu çalışmada hipotezimiz; CART peptidinin ona yanıt veren hücre hatlarıyla; bir etkiye neden olmadığı hücre hatları karşılaştırılarak, peptidin bir ya da daha fazla GPCR ile etkileşime geçerek PERK seviyelerinde bir artışa neden olması ve ERK1 & 2 sinyalleme yolağında artışa neden olması dolayısıyla bu hücrelerde reseptörünün bulunması, CART reseptör ya da reseptörlerinin mRNAlarının bu hücrelerde yaygın olarak bulunurken, yanıt vermeyen hücre hatlarında ise eksprese olmadığıdır. Bu GPCR gen veya genleri, CART reseptörüne ait olabilir. Bu hipotezi test etmek için, aday genler Atwood *et al.*'in çalışmasında verilen mikro-dizi verileri analiz ile belirlenmiştir. Yanıt vermeyen hücre hatlarına kıyasla CART'a yanıt veren hücre hatlarında farklı olarak eksprese edilen genler, mikro-dizi verisinden seçilmiştir. Aday genlerin ifadeleri q -RT-PCR ile doğrulanmıştır.

Farklılaşmış PC12 ve AtT-20 hücre hatları, Kuhar ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada bulunduğu üzere, ERK seviyelerini artırdığı için, AtT-20 CART cevap veren hücre hattı olarak, N2a hücre hattı da yanıt vermeyen hücre hattı olarak kullanılmıştır. Bu sunulan çalışmada elde edilen sonuçlar CART peptid reseptörü için sunulan aday genler olabilecektir.

Gereç ve Yöntem

2.1. Mikroarray Veri Analizi

Mikrodizi verilerinin analizi için web tabanlı sınırlı sayıda program bulunmaktadır. Bu programların pek çoğu ise Affymetrix gibi en yaygın olarak kullanılan mikrodizi verilerini analiz etmek için tasarlanmıştır. Günümüzde sıklıkla kullanılmakta olan 4 farklı firmaya ait mikrodizi platformu; Affymetrix, Illumina, Agilent, ve Nimblegen'dir. Bunlardan, Affymetrix, Illumina ve Agilent için yazılmış pek çok sayıda analiz programı bulunmaktadır. Bu çalışmada analizi yapılacak olan veriler Nimblegen platformuna ait olup bu platforma ait verileri analiz etmek için ücretsiz bir analiz yazılımı bulunmadığından, veri analizi için aşağıda anlatılacak olan basamaklar izlenmiştir.

Veri seti GEO (gen ekspresyon omnibus veritabanı)-NCBI web sitesinden alınmıştır. Veri setinin GEO katılım numarası GSE25901, **Şekil 5**'te gösterilmiştir.

Series GSE25901		Query DataSets for GSE25901
Status	Public on Feb 01, 2011	
Title	Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis	
Organisms	Homo sapiens ; Mus musculus	
Experiment type	Expression profiling by array	
Summary	This SuperSeries is composed of the SubSeries listed below.	
Overall design	Refer to individual Series	
Citation(s)	Atwood BK, Lopez J, Wager-Miller J, Mackie K et al. Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. <i>BMC Genomics</i> 2011 Jan 7;12:14. PMID: 21214938	
Submission date	Dec 07, 2010	
Last update date	Dec 27, 2012	
Contact name	Jacqueline Lopez	
E-mail	jacqueline.ann.lopez@gmail.com	
Phone	574-631-7875	
Organization name	University of Notre Dame	
Department	Biology	
Lab	Pfreder Laboratory	
Street address	112 Galvin Life Science Center	
City	Notre Dame	
State/province	Indiana	
ZIP/Postal code	46556	
Country	USA	

Şekil 5 GEO GSE25901

NimbleGen 4x72k için tasarlanmış platformlar GPL11059 ve GPL11289, sırasıyla *Mus musculus* ve insandan elde edilen örnekler için tasarlanmıştır. **Şekil 6**'da görülen figürün in alt kısmında gösterildiği gibi, ek içeriğe göre indirilir.

Platforms (2) [GPL11059](#) NimbleGen Mus musculus MM8 Expression Array (4x72k)
[GPL11289](#) Nimblegen Homo sapiens HG18 Expression Array 4x72k (All Probes)

Samples (16) [GSM635464](#) AtT20 1
[More...](#) [GSM635465](#) AtT20 2
[GSM635466](#) AtT20 3

This SuperSeries is composed of the following SubSeries:
[GSE25886](#) Analysis of mRNA levels of GPCR and GPCR-related signaling proteins in 3 mouse cell lines: AtT20, BV2 and N18
[GSE25894](#) Analysis of mRNA levels of GPCR and GPCR-related signaling proteins in the HEK293 cell line

Relations
 BioProject [PRJNA135767](#)

Analyze with GEO2R	
Download family	Format
SOFT formatted family file(s)	SOFT ?
MINiML formatted family file(s)	MINiML ?
Series Matrix File(s)	TXT ?

Supplementary file	Size	Download	File type/resource
GSE25901_RAW.tar	74.6 Mb	(http)(custom)	TAR (of PAIR)

Şekil 6 GEO GSE25901 veri serisinin devamı

Veri serisi “.gz” uzantılı olduğundan, dosyaları görüntülemek için NCBI sunucusunun altında bulunan GEO2R programı kullanılmıştır. 12 örnek grup bulunmaktadır. ilgilendiğimiz AtT-20 hücre hattındaki örnekler mavi, N2a hücre hattına ait örnekler ise pembe ile işaretlenmiştir.

GEO accession Set Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis

Platform

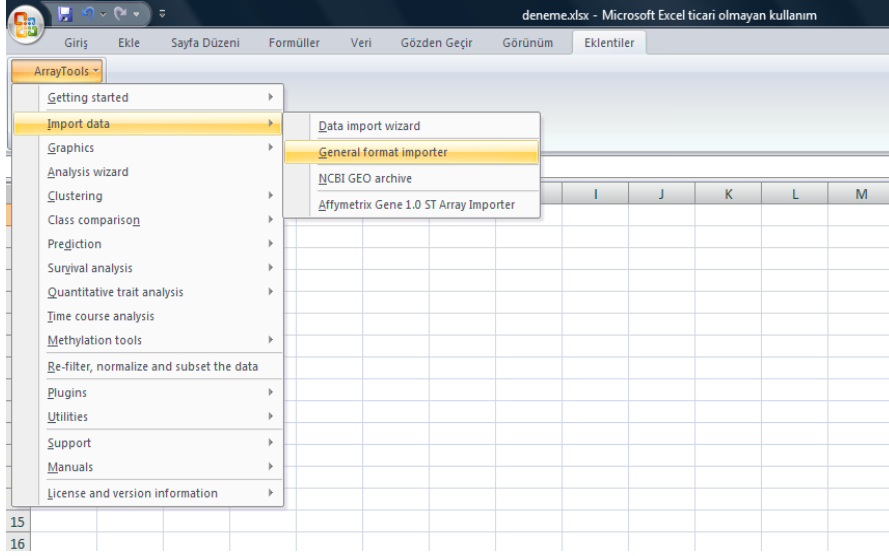
▼ Samples Define groups Selected 8 out of 12 samples

Group	Accession	Title	Source name	Cell line	Cell type
att20	GSM635464	AtT20 1	Immortalized cell line AtT20	AtT20	normal
att20	GSM635465	AtT20 2	Immortalized cell line AtT20	AtT20	normal
att20	GSM635466	AtT20 3	Immortalized cell line AtT20	AtT20	normal
att20	GSM635467	AtT20 4	Immortalized cell line AtT20	AtT20	normal
-	GSM635468	BV2 1	Immortalized cell line BV2	BV2	normal
-	GSM635469	BV2 2	Immortalized cell line BV2	BV2	normal
-	GSM635470	BV2 3	Immortalized cell line BV2	BV2	normal
-	GSM635471	BV2 4	Immortalized cell line BV2	BV2	normal
n2a	GSM635472	N18 1	Immortalized cell line N18	N18	normal
n2a	GSM635473	N18 2	Immortalized cell line N18	N18	normal
n2a	GSM635474	N18 3	Immortalized cell line N18	N18	normal
n2a	GSM635475	N18 4	Immortalized cell line N18	N18	normal

Şekil 7 GEO2R'da bulunan GPL11059 Platformunun Veri Temsil Şekli

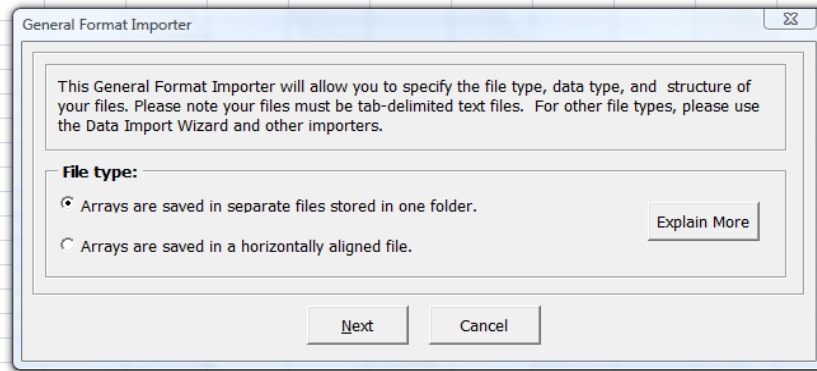
Mikroarray verileri, Ulusal Kanser Enstitüsü Biyometrik Araştırma Şubesi tarafından geliştirilen bir analiz programı olan "BRB ArrayTools Versiyon 4.3.0" ile analiz edilmiştir.

Veriyi yüklemek için Excel dosyasında görünen “ArrayTools” sekmesinin “genel kullanım” fonksiyonu kullanılmıştır. BRB ArrayTools kurulumundan sonra Excel içinde bir eklenti olarak görünür. Bu program, mükemmel bir biçimde GDS dosyaları analiz eder. GDS veri setleri kürate edilmiş veriler olduğundan, GDS dosyalarından her türlü bilgiye ulaşılabilmektedir. Ancak, GSE veri setleri kullanıcılar tarafından gönderilen veri setleri olduğundan veriyi analiz edecek yeterli bilgi dosyaya eklenmemiştir. Bu nedenle, "genel biçim aktarımı" Şekil 13'te olduğu gibi kullanılır:



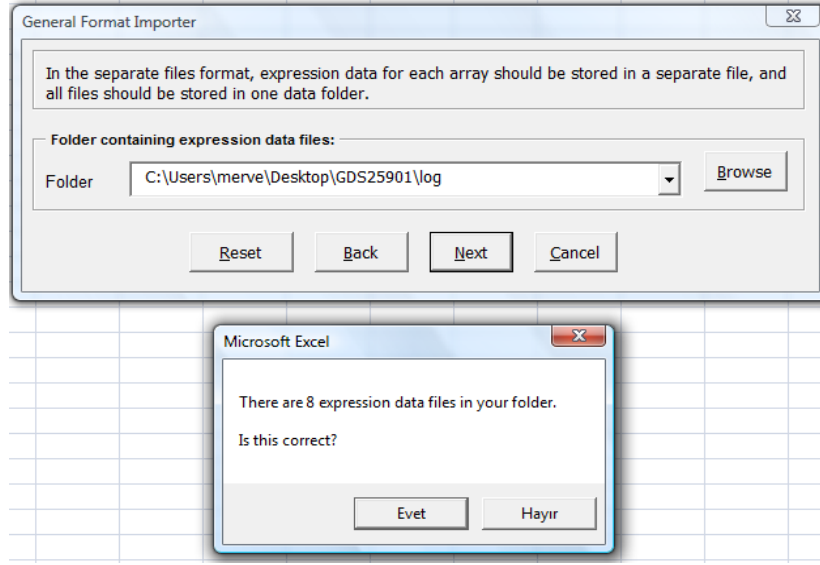
Şekil 8 BRB ArrayTools Ekran Görüntüsü

NCBI GEO ile parçalar halinde indirilen dosyalar Şekil 9'da görülebileceği gibi yüklenmiştir.

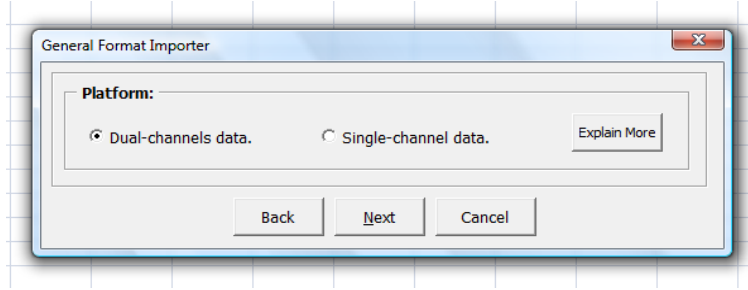


Şekil 9 Veri Yükleme Sekmesi

Şekil 10'da görüleceği üzere AtT-20 hücre hattından gelen dört set ve N2a hücre hattından gelen 4 setle birlikte 8 grup yüklenmiştir. Şekil 11'de görüldüğü üzere bu örneklere ait log₂ verileri seçilmiştir.

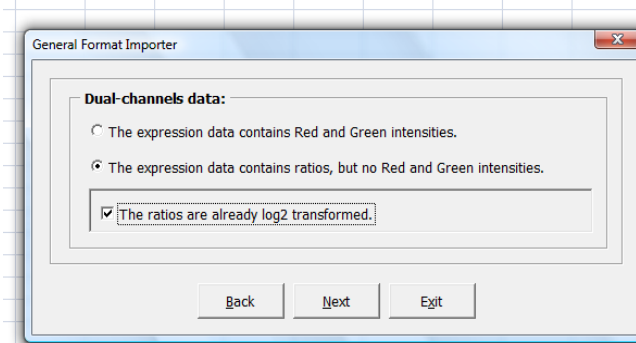


Şekil 10 BRB ArrayTools ver yüklemesi sırasında dosya sayısı



Şekil 11 BRB ArrayTools Kanal Tercihi

Şekil 11'de görüldüğü üzere NimbleGen dizi platformu bilgilerinden doğru platform özelliğini seçmek için "Çift - kanal veri" sini tercih ettik.

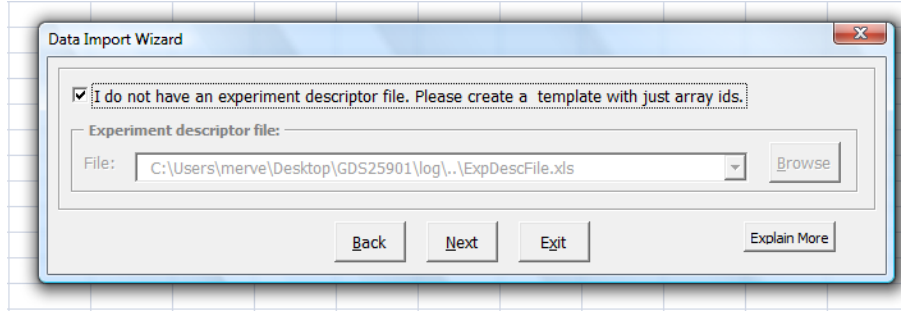


Şekil 12 Çift Kanallı veri için ekspresyon seçimi

Şekil 12'deki çift kanal veri bilgilerinde görüldüğü üzere, "log2 dönüşümü yapılmıştır" seçeneği ile devam edilir, çünkü GEO2R'dan alınan veriler zaten log2 transformasyonu yapılmış verilerdir.

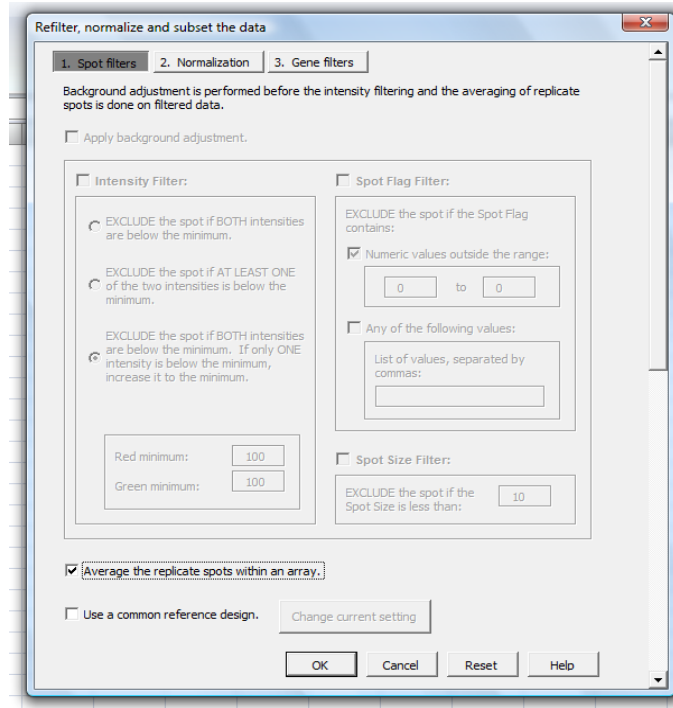
Şekil 13 Verilerin Excel dosyasına yüklenirken kolon seçimi

Başlık satırı sekmesi gösteren sütun kimliği olarak seçilmiştir. İlk olarak veri hattı ikinci satırdaki hat olarak ayarlanır, çünkü başlık satırı ikinci sırada görünür. Sonra, log-oranı “Log2 değerleri” (Şekil 13) olarak ayarlanmıştır.



Şekil 14 BRB ArrayTools'un Gen Tanımlayıcı Opsiyonları

Daha sonra, gen tanımlayıcılar ayarlanır. Sağlanan veriler, RefSeq gen kimlikleri kullanılarak, tasarlanmış kimliklerine ait prob isimleriyle eşleşirler. Burada, **Şekil 14**, başka bir seçenek bulunmadığından Prob kimlikleri sütunlardan "EnterezID" olarak ayarlanır. Yine verilerin kürate edilmemiş olmaması, gen isimlerinin ID olarak kalmasına neden olmuştur. Bu yüzden verilerin ek açıklaması sonra sağlanacaktır. Açıklama elle yapılamayacağından program dizinin kimlikleri ile bir şablon oluşturulmuştur (**Şekil 15**) .

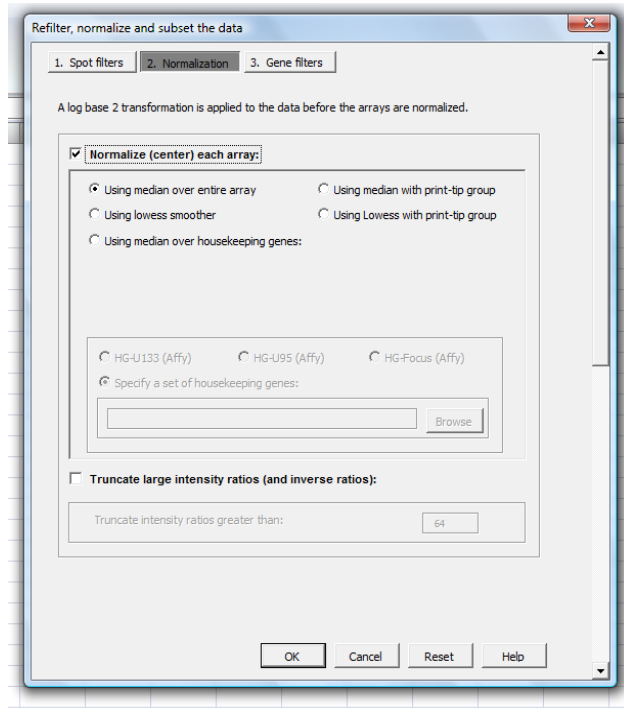


Şekil 15 Spot filtre seçeneği

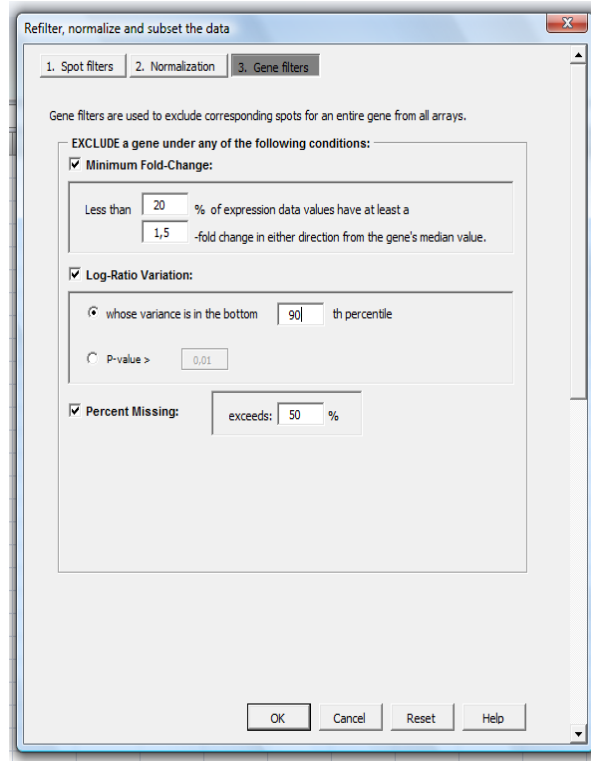
Veriler BRB ArrayTools ile NCBI'nın internet sitesi üzerinden doğrulandıktan sonra, verilerin normalleştirilmesi, harmanlanması ve sıraya koyulması ardından da istatistiksel önemine göre filtreden geçirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, istenen gen filtrelerini uygulamak ve verileri normalleştirmek için **Şekil 16** ve **17**'deki adımlar izlenmiştir.

Verileri sağlayan deneyi yapan ekip tarafından yoğunluk optimizasyonu yapıldığından, bu seçenek için bir herhangi bir seçeneği işaretlemek gerekmemektedir. Veriyi normalleştirmek amacıyla günlüğü **Şekil 16**'daki tüm dizideki verileri kullanarak medyan hesaplaması seçeneği işaretlenmiştir.

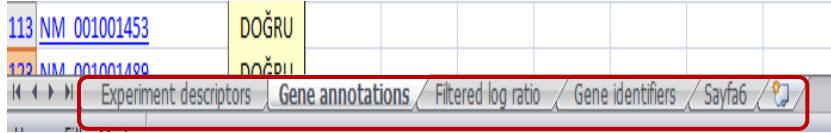
İstatistiksel önemini artırmak amacıyla "Gen Filtresi" seçeneğine gelindiğinde, logaritma oranı varyasyonu **Şekil 17**'de görüldüğü gibi % 90 üzerine çekilmiştir.



Şekil 16 Normalizasyon Seçeneği



Şekil 17 Gen Filtresi Seçeneği



Şekil 18 Gen İsimlendirmesi Sekmesi

Analiz tamamlandıktan sonra, şekil 18'de görüldüğü üzere Excel dosyasında 4 sayfa belirir: "Deney tanımlayıcılar", "Gen isimlendirmesi", "Filtrelenmiş logaritma oranı", ve "Gen tanımlayıcılar". İlk veri sayfasında, deney tanımlayıcıları vardır. Filtre uygulanmadan önce veri setinde yaklaşık 72000 gen bulunmaktaydı. İstatiksel öneme göre verilerin filtrelemesinden sonra, 1512 gen mevcut veri seti olarak elde edilmiştir. Genlerin isimlendirilmesiyle ilgili olarak, veri dosyası ilk elde edildiğinde **Şekil 19**'daki gibi sadece prob ID'leri ve sekans bilgileri vardı. Gen isimlendirmesi yapabilmek amacıyla **Şekil 20**'de görüldüğü üzere, WEBGESTALT (WEB-tabanlı gen seti analiz aracı) web sayfası gen isimlerine erişmek için kullanıldı.

```
#ID = PROBE_ID from .ndf file
#DESIGN_ID =
#PROBE DESIGN ID =
#GB_ACC = GenBank Accession number; NimbleGen SEQ_ID
#SEQUENCE = probe sequence
ID      DESIGN_ID    PROBE DESIGN ID GB_ACC SEQUENCE
XM_892799P00106 5045 5045_0135_0003 XM_892799 TCTCTGGGAGACAGAATAACCATCACTTGCCAGGCAACTCAAGACATTGTTAAGAATTTA
NM_146837P00579 5045 5045_0137_0003 NM_146837 GGCCCTGTGGAGATACTTCAATACACAGAGTTGTCTGTCTACTTAGTAGCTATGCTGTTTGT
NM_028835P02890 5045 5045_0139_0003 NM_028835 AACACAGATGCTGCAACAAGCGGCCCTACCATCTGTGCAAGGCTCCCCACAAGTAGCCAG
NM_008323P00170 5045 5045_0141_0003 NM_008323 AACCAATTCCCTCCATCTGCTAAGTATGGTGGGCGGCATACAGTGAATGATATGATCCAGGGG
NM_016799P02836 5045 5045_0143_0003 NM_016799 ARGGGACAGCACAGGGCCCTTTTGCTGTATGTAGATTGGSCAATGTATGCTACCCTGAGC
NM_177799P00877 5045 5045_0145_0003 NM_177799 CTTTCCCGGTGCCTGCTGATAATCCCTGACACTGTTTGGAGGAATGGCTCACTTTCTCAA
NM_026685P01286 5045 5045_0147_0003 NM_026685 TAGAAATTTCCCTGCACGGCGCTGAACCTTCGGCAGCAGAGTGAATTTATCTAGCAACT
NM_001033527P00303 5045 5045_0149_0003 NM_001033527 GGAACCGGTGCGGCCTCAAGTTAACTCGAACACAGCCTGCAAACTTCTGGGCTGCAGC
NM_001033769P00120 5045 5045_0151_0003 NM_001033769 TGAGAATTTCTGGATTCTTGACTCTGCTTCCATCCAGCTATTGCGGAATAAAGTTCAACT
NM_019951P01025 5045 5045_0153_0003 NM_019951 TCGTTCCTCCTTACAGTAGGAATGGCAGATATTGAGGCGATCATAAGTCTTAACTTTTCA
XM_975703P00001 5045 5045_0155_0003 XM_975703 ATGGAGTCAGGAATCCAGTTCGTGGATGAGTCGGAATGGCAGTGTCTGCGAGAACTCC
NM_177236P03755 5045 5045_0157_0003 NM_177236 TGGAGAAACCAGAATCCAAGAGTTGCATCCATAACTTCATGGCAACACCCGAGTTTTTGA
NM_145580P01149 5045 5045_0159_0003 NM_145580 AGGTGCTATCTAAACTTGGCTGAGTCAGAGTTTGTGGGGCTTACTACTCCATCAATAAA
NM_025605P00449 5045 5045_0161_0003 NM_025605 TCTCTGACTTGCAGCAGGCTCCAGGATAGTGCATATGCCTATAGTGCACCTTCTCAGA
XM_894787P00291 5045 5045_0163_0003 XM_894787 AAGCATTTGGAATAATGATACTACTACAACCCATCTTTGAAGACCGCGCTCACAATCTC
NM_007760P04123 5045 5045_0165_0003 NM_007760 GTTTTTGACAGTAGCACAGACCAGACATAGCGGCATAGCTATGTACCAGAGTTACCAGA
XM_001003382P00151 5045 5045_0167_0003 XM_001003382 ATTCCTTAAATATCAGATCCCAAGCGCACCATTTGCTCAGGATTAATGGAGTCTTAAAGCT
NM_146891P00001 5045 5045_0169_0003 NM_146891 ATGAACAACCAGAGCTGTGTCACTGAGTTTCATATTCCTGGGACTTTCACAGAACTCAAAA
NM_011070P00090 5045 5045_0171_0003 NM_011070 TAAATTTGCTGSCITTAATCGCCCTTCGGCAGGAACAGAGGGCTTGGCTTCCAAAGCAGCTG
XM_135479P04329 5045 5045_0173_0003 XM_135479 GAGACTGCATATCTAGGCTCTTAGGCAGATGAAAAATTTACGTAGTACAGATATTGTAAG
NM_183149P01867 5045 5045_0175_0003 NM_183149 AGCAAAGCTGAAGTGCAGTAACCATCGTTGTCAATGGACATTCCGAAGGCTCAGCCCTG
XM_985551P00495 5045 5045_0177_0003 XM_985551 TGTGAAAGTGGCTTGCAAAATACGAGCAATGTTGCCCTGCTCGGGTATCAGTAGTTTTG
NM_023119P01058 5045 5045_0179_0003 NM_023119 AGTGACCAACCCTAAGCGGATTGCCAAGGCTGCGAGCGGAAGTCCCTGCAACTGCCTCTT
NM_199422P00655 5045 5045_0181_0003 NM_199422 TGGGCAGAGACATGGCTCCTGCCCTTCAGTGATACCTTGTCTGAATACCGGGGGGAATAC
NM_011480P04062 5045 5045_0183_0003 NM_011480 TGTGCACCAGCATAGGCGAAGGATCAGGGCCCATTTAGTGTAGTAGCTGGAAACCTGTGTT
NM_028357P00134 5045 5045_0185_0003 NM_028357 AGGCAGACTGGGATGCCACATTTAGCTCATCCCAAAGCTTTGGATACTATGAGAAGTTG
NM_133355P02559 5045 5045_0187_0003 NM_133355 TGTGTTGGCCATGGGTAACCTATCTCAACGATGGACAGCCCAAGCCAAACAGACCCTGG
NM_023440P00066 5045 5045_0189_0003 NM_023440 TTATCAGCAAGTGCCAGACAAGAGCAGGCCTTGCCTGAGCCCTGTTATCAGCCCAGAGT
```

Şekil 19 İlk olarak elde edilen gen prob IDleri

WebGestalt 2005 yılından beri sıkça kullanılan internet tabanlı yazılım araçlarından biridir. Büyük ölçekli genetik transkriptomik ve proteomik çalışmalardan elde edilen gen listeleri için, WebGestalt'ın son sürümünde 8 organizma ve bu 8 organizmaya ait 201 alt gen tanımlayıcı setiyle pek çok çeşitte veri tabanı ve farklı teknoloji platformunu anlamlandırma fırsatı sunulmaktadır (Zhan *et al.*, 2013). Verilerin açıklanmasında BRB ArrayTools kullanılmadığı için, WebGestalt web sitesi kullanılmış ve gen adlandırılması işlemi tamamlanmıştır. Şekil 19'da görülen ndf uzantılı dosya eski sürüm bir dosya olduğundan BRB ArrayTools tarafından işlenememiştir. Gen listesinin txt formatı halindeki dosyası weggestalt'a yüklenmiş ve Şekil 20'deki dosya elde edilmiştir.

User ID information table

Mapped User IDs back				
NM_001001881	72190	ENSMUSG00000043391	Z510009E07Rik	RIKEN cDNA 2510009E07 gene
NM_001001179	232400	ENSMUSG00000047228	BC048546	cDNA sequence BC048546
NM_001001882	269400	ENSMUSG00000038685	Rtel1	regulator of telomere elongation helicase 1
NM_001001714	227631	ENSMUSG00000059625	Sohlh1	spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1
NM_001001490	239283	ENSMUSG00000044819	Oxgr1	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) receptor 1
NM_001001446	226143	ENSMUSG00000025197	Cyp2c44	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 44
NM_001001804	384214	ENSMUSG00000033805	Ephx4	epoxide hydrolase 4
NM_001001737	414758	NA	Zfp826	zinc finger protein 826
NM_001001152	238690	ENSMUSG00000055480	Zfp458	zinc finger protein 458
NM_001001187	408068	ENSMUSG00000048280	Zfp738	zinc finger protein 738
NM_001001452	387514	ENSMUSG00000046652	Tas2r143	taste receptor, type 2, member 143
NM_001001318	209380	NA	Gm4759	GTPase, very large interferon inducible 1 pseudogene
NM_001001320	109575	ENSMUSG00000037477	Tbx10	T-box 10
NM_001001803	408198	ENSMUSG00000060201	Spink7	serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (putative)
NM_001001489	215928	ENSMUSG00000038528	BC021785	cDNA sequence BC021785
NM_001001444	75400	ENSMUSG00000044249	Defb29	defensin beta 29
NM_001001805	258248	NA	OlfR576	olfactory receptor 576
NM_001001332	100038854	ENSMUSG00000079594	BC117090	cDNA sequence BC1179090
NM_001001321	70484	ENSMUSG00000033114	Slc35d2	solute carrier family 35, member D2
NM_001001496	414089	ENSMUSG00000055691	Gja6	gap junction protein, alpha 6
NM_001001183	407831	ENSMUSG00000024168	Tmem204	transmembrane protein 204
NM_001001883	329152	ENSMUSG00000042807	Hecw2	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
NM_001001326	76954	ENSMUSG00000031024	St5	suppression of tumorigenicity 5
NM_001001451	387513	ENSMUSG00000058250	Tas2r138	taste receptor, type 2, member 138
NM_001001334	381350	ENSMUSG00000037708	BC061194	cDNA sequence BC061194
NM_001001322	279028	ENSMUSG00000014852	Adams13	la disintegrin-like and metallopeptidase (repolyisin type) with thrombospondin type 1 motif, 13
NM_001001453	387515	ENSMUSG00000051917	Tas2r144	taste receptor, type 2, member 144
NM_001001559	384701	ENSMUSG00000057321	Dub2a	deubiquitinating enzyme 2a
NM_001001807	258502	ENSMUSG00000054036	OlfR279	olfactory receptor 279
NM_001001499	414105	NA	4732465J04Rik	RIKEN cDNA 4732465J04 gene
NM_001001495	414084	ENSMUSG00000044162	Trip3	TNFAIP3 interacting protein 3
NM_001001449	380878	NA	AF067063	cDNA sequence AF067063

Şekil 20 Webgestalta yüklenen gen IDlerinin isimlendirilmesinin ardından elde edilen gen listesi

2.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada, iki tür hücre hattı kullanılmıştır: Neuro 2a (N2a) ve AtT-20

N2a hücre hattı, *Mus musculus* beyin hücrelerinden türetilmiştir. Bu hücreler yapışkan nöron hücreleridir. Bu hücre hattının kültüründe, “Dulbeco Modifiye Eagle Ortamı” (DMEM), fetal sıgır serumu (FBS) ve penisilin/streptomisin için Tablo 1 'deki bileşen oranlarına göre hazırlanıp hücrelerin büyütülmesi esasında kullanılmıştır.

Kültür Medyası için Kullanılan Malzemeler	Final Derişimi
FBS	10 %
Pen/Strep	1 %
DMEM	q.s.p.

Tablo 1 N2a Hücreleri için Hazırlanan Büyüme Ortamı Bileşenleri

Hücreler 37 °C' de, % 5 CO₂ ve % 95 havadan oluşan bir atmosfer ortamında çoğaltılmıştır.

Alt kültür işlemi için, % 0.25 (a/h) tripsin - 0.53 mM EDTA çözeltisi hücreleri çıkarmak için kullanılmıştır. Hücreler 1:6 oranında bir diğer ortama taşınmıştır.

Kullanılan ikinci hücre hattı AtT-20 ise, *Mus musculus* hipofizinden türetilmiş melanom hücrelerdir. Bunlar küçük yuvarlak ancak gevşek ve yapışık yapıda hücrelerdir. AtT-20 hücre hattı, F-12K seçici ortamı, at serumu, FBS ve penisilin/streptomisin'in Tablo 2'de tarif edildiği üzere birleştirilmesiyle oluşturulan medyayla beslenmiştir.

Kültür Medyası için Kullanılan Malzemeler	Final Derişimi
Horse Serum	15 %
FBS	2.5 %
Pen/Strep	1 %
F-12K Selective Media	q.s.p.

Tablo 2 AtT-20 Hücreleri için Hazırlanan Büyüme Ortamı Bileşenleri

Alt kültür işlemi AtT-20 hücre kümeleri büyüme ortamı ile dolu başka bir petriye aktarılmasıyla sağlanmıştır. Bu nedenle, belirli bir alt kültür oranı mevcut değildir. Hücreler kümeler halinde yaşamlarını sürdürülebilmektedir.

% 5 CO₂ ve % 95 havadan oluşan atmosferik ortam, 37 °C sıcaklıkta AtT-20 hücrelerinin büyümesi için gerekli koşullardır.

2.3. RNA Eldesi

Hücre hatlarından RNA elde etmek amacıyla, İtron Biyoteknoloji'den alınan "RNA - spin™ Toplam RNA özütleme kiti [Hücre / Doku için] (Kat. No: 17211)" kullanılmıştır. N2a hücre hattı için, T- 75 flasklarında aşırı kültürlenmiş hücreden, 0.5 mL'lik 4 tüp elde edilir. Öte yandan, AtT-20 hücre hattının RNA eldesi için, T-75 flaskından elde edilen hücreler sadece bir tüpte toplanır. Daha sonra kit içeriğinde yer alan protokol takip edilir.

2.4. DNase Muamelesi

RNA içindeki genomik DNA'yı kaldırmak amacıyla "Invitrogen Ambion DNA-free™ (Kat. No: AM1906)" Kit ile yukarıda elde edilen toplam RNA'ya DNase muamelesi uygulanır. Kit içindeki protokol takip edilmiştir.

2.5. Toplam RNA için Agaroz Jel Elektroforez

Toplam RNA'lar DNase muamelesinden sonra, % 1'lik agaroz jel içinde yürütülerek bantlar görüntülenmiştir.

2.6. cDNA sentezi

Q-RT-PCR deneylerinin en önemli adımı olan cDNA sentezi için Thermo Scientific's'in "RevertAid First Strand Synthesis Kit (Cat. No: K1622)"i kullanılmıştır. Kit içinde bulunan "random hexamer" primerleri tüm RNA moleküllerine çarpar hepsinin çoğalmasını sağlayabildiği için rastgele prime edilmiş bu heksamerler tercih edilmiştir. Kitin içindeki protokol takip edilmiştir.

2.7. Primer Tasarımı

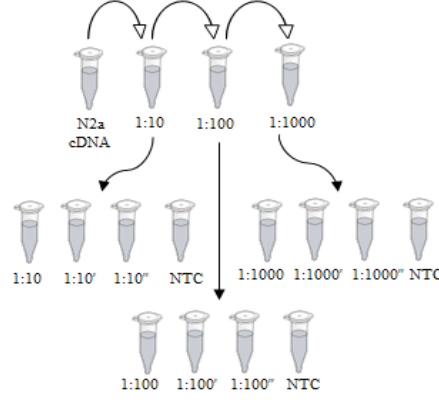
Her iki hücre hattında da fare türünden türetilmiş olduğu için primerler, *Mus musculus* genomu referans alınarak tasarlanmıştır. Kullanılan primerlerin sekansları **Tablo 3**'te belirtilmiştir.

Tablo 3 Primer Sekansları

Gene Name	Direction	Primer Sequence	Product size
<i>Bai1</i>	F 5'→ 3'	CCCAGCTCATGACCGACTTT	192
	R 5'→ 3'	TGGACACATTAGCTGGCAGG	
<i>Bai3</i>	F 5'→ 3'	CTGCCTGGCCTTGATAACTC	164
	R 5'→ 3'	TCGTGCAGATGCTCTTATTGTG	
<i>Casr</i>	F 5'→ 3'	TTGCCTTGTGATCCTCTTTCCA	199
	R 5'→ 3'	TCATGTAGAGACTGCCCGAGA	
<i>Crhr1</i>	F 5'→ 3'	GAGTGTTAGCGATGCCTTGG	156
	R 5'→ 3'	GTGCCACAGTGCTGATGAAA	
<i>Fzd10</i>	F 5'→ 3'	AAGAGAGTCACTTCCCCAGC	159
	R 5'→ 3'	TGTTTTGCTAGGGAGAGGGG	
<i>Glp1r</i>	F 5'→ 3'	ATGTCAGCTGCCCCTGGTA	329
	R 5'→ 3'	AGGTGGATGTAGTTCCTGGT	
<i>Glp2r</i>	F 5'→ 3'	GCTGGTTTCCATCAAGCAAG	268
	R 5'→ 3'	GTGTCTGTAGGCCCTTCCTG	
<i>Gpr113</i>	F 5'→ 3'	ATTTGTCCCCACAGCCCAAT	97
	R 5'→ 3'	GACCAGCACTGATTCCCCTT	
<i>Gpr116</i>	F 5'→ 3'	CTCCCGATTGTCTGTGAGGT	262
	R 5'→ 3'	TGGAGAATTGAAGGTTGAACAATGG	
<i>Gpr133</i>	F 5'→ 3'	ACCTACTGCTTTCAGGCACC	232
	R 5'→ 3'	TGAGTGCTACACACCTGGAC	
<i>Grm1</i>	F 5'→ 3'	TCACTACCTGCTTCGCAGTG	233
	R 5'→ 3'	GCCGTTAGAATTGGCGTTCC	
<i>Sctr</i>	F 5'→ 3'	CTTCGGATGGGGTTCTCCAG	106
	R 5'→ 3'	CCAGATGGAAGCGTTGGAGT	
GAPDH	F 5'→ 3'	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	496
	R 5'→ 3'	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	

2.8. q-RT-PCR

cDNA'lardan 1:10, 1:100 ve 1:1000 oranında elde edilen üç farklı derişim numunelere bağı RNA varlığını doğru hesaplamak adına, her iki hücre hattından elde edilen örnekler için de aynı şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen RNA'nın yaklaşık % 20'si ters transkriptaz reaksiyonu sırasında cDNA'ya dönüştürülür. **Şekil 21**'deki gibi, her örnek derişimi bir boş şablon kontrol örneği (NTC) ile birlikte hazırlanmıştır.



Şekil 21 q-RT-PCR için N2a örneklerinin hazırlanması

Ana bileşenlerin olduğu karışımı hazırlamak için, Roche marka FastStart Evrensel SYBR Green Mix (Kat. No: 04 913 850 001) kullanılmıştır. Ana karışımının bileşenleri Tablo 4 görüldüğü üzere hazırlanmıştır.

Tablo 4 q-RT-PCR Ana Karışımının Bileşenleri

Bileşenler	Bir Tüp İçin Kullanılan Miktar
SYBR green mix	9.7 µL
Nuclease free water	11.3 µL
Forward primer	0.5 µL
Reverse primer	0.5 µL
Total	22 µL

22 µL olarak hazırlanan ana karışıma 3 µL cDNA ilave edildikten sonra, 25 µL içeren reaksiyon tüpleri QIAGEN cihaza yerleştirilir. Bunun için iki aşamalı reaksiyon **Tablo 5**'teki gibi tasarlanmıştır:

Tablo 5 Q -RT -PCR deneyi için 2 adımlı tepkime koşulları

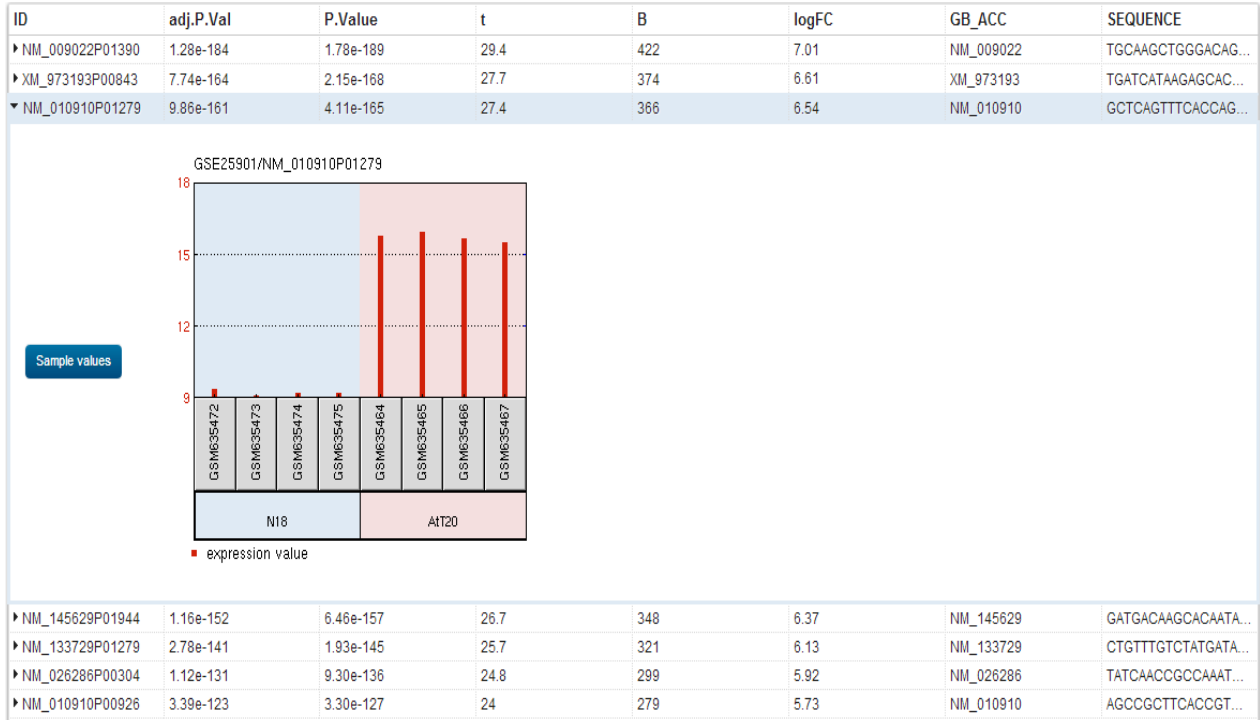
95 °C	10 min		Hold
95 °C	15 sec	40 cycles	Annealing
60 °C	45 sec		
50 °C – 99 °C			Melting

Bulgular ve tartışma/sonuç

3.1. Mikrodizi Veri Analizi Sonuçları

GEO2R'dan alınan en yüksek ekspresyona sahip 250 gen incelemesinde N18 ve At- T20 hücre hatlarına ait veri setlerinin karşılaştırılmasıyla elde edilen ilk analiz sonucunda, **Şekil 22**'de görülen gen profili elde edilebilmektedir. Ancak GEO2R yazılımı yeni olduğundan bu genler arasında seçim yapabilmeyi ya da analiz sonucunda elde edilen genler arasında seçim yapabilmeye olanağı sağlamamaktadır. "XM_" koduyla başlayan genler yapay olarak oluşturulmuş gen kodlarıdır. Yüksek kırmızı barlar AtT-20 hücre hattında eksprese edilen dört ayrı numunedeki geni göstermektedir. Ancak, bu çalışmada hipotez edilen aday genler için detaylı analiz BRB Dizi Araçları analizinden sonra ayrıntılı olarak ortaya konmuştur.

Şekil 23'te görülen mikro-dizi analizi ham sonucu daha sonra Microsoft Excel'in düşeyara işlevini kullanarak, genler önem sırasına göre seçilip **Tablo 7**'de olduğu gibi belirlenmiştir.

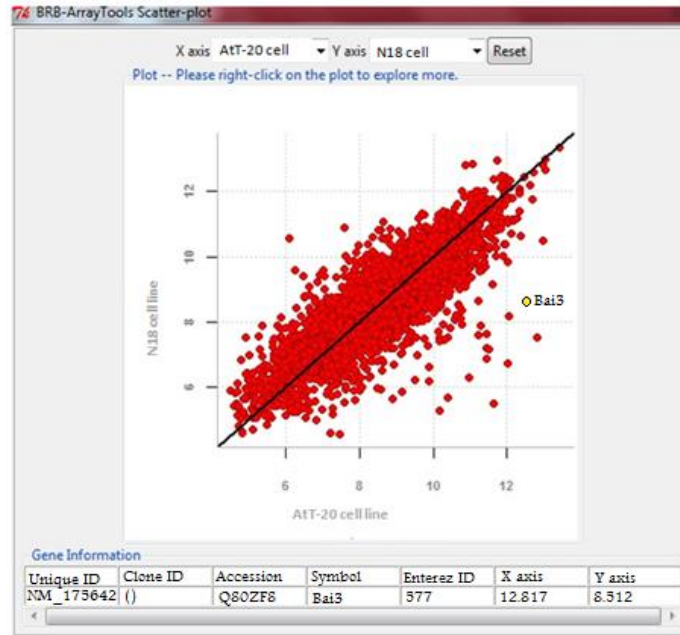


Şekil 22 GEO2R'da top 250 gen listesinden örnek

	Display the data	GSM635464	GSM6354	GSM6354	GSM6354	GSM6354	Rank	Mean	T-test	Fold Change
1	UniqueID	250443A01	65_25044	66_25044	67_25044	72_25044				
2	NM_175642.4	515733888	5.21E+08	-1.1E+09	4.96E+08	3.81E+08	1	4.55125	8.50250E-19	4.5513
3	XM_134865P01843	515643136	4.95E+08	4.45E+08	5.1E+08	2.49E+08	2	4.15125	8.50250E-19	4.1513
4	XM_138109P00228	515633536	5.06E+08	4.22E+08	4.92E+08	1.95E+08	3	3.234854	8.50250E-19	3.2349
5	NM_177218P01390	515515392	5.17E+08	-9.9E+08	4.91E+08	-1.2E+09	4	2.334854	8.12325E-19	2.3349
6	NM_030024P00173	515461248	4.87E+08	-9.9E+08	4.68E+08	2.66E+08	5	2.231258	4.40700E-19	2.2313
7	NM_001029837P03556	515438848	-9.2E+08	4.54E+08	5.13E+08	3.65E+08	6	2.134112	4.11820E-19	2.1341
8	NM_011475P00397	515366656	5.13E+08	-9.9E+08	5.16E+08	-1E+09	7	2.030975	6.41347E-19	2.0310
9	XM_901559P01106	515143808	4.91E+08	-9.9E+08	5.09E+08	-1.1E+09	8	1.994854	6.34789E-19	1.9949
10	NM_009026P00742	515123456	5.04E+08	4.25E+08	-1.1E+09	1.8E+08	9	1.994854	4.50250E-20	1.9949
11	NM_013654P00285	515075968	5.21E+08	4.49E+08	-9.2E+08	3.56E+08	10	1.936755	4.50250E-19	1.9368
12	NM_007812P01723	515038464	5.21E+08	4.54E+08	-9.2E+08	-1.1E+09	11	1.934854	7.50250E-19	1.9349
13	XM_129479P04733	514510336	4.99E+08	4.54E+08	5.02E+08	2.65E+08	12	1.932485	6.50250E-19	1.9325
14	NM_029849P02447	514276352	5.15E+08	4.54E+08	5.13E+08	-1.6E+08	13	1.916792	5.04570E-19	1.9168
15	XM_899399P00424	514115072	5.19E+08	4.39E+08	4.01E+08	-1.2E+08	14	1.911585	2.50250E-19	1.9116
16	XM_205276P04133	514074624	-9.2E+08	4.53E+08	-9.3E+08	2.71E+08	15	1.903877	2.50250E-19	1.9039
17	NM_053217P02356	514068224	5.21E+08	4.54E+08	5.19E+08	3.87E+08	16	1.900877	2.50250E-19	1.9009
18	NM_199422P00470	513745408	5.21E+08	4.54E+08	5.14E+08	3.89E+08	17	1.894854	2.50250E-19	1.8949
19	XM_488314P00296	513670784	5.17E+08	4.54E+08	5.19E+08	3.89E+08	18	1.890695	2.50250E-19	1.8907
20	NM_175485P06491	513590016	5.1E+08	4.23E+08	5.16E+08	3.26E+08	19	1.890129	2.50250E-19	1.8901
21	XM_486268P05198	513438976	5.03E+08	4.19E+08	4.61E+08	2.9E+08	20	1.884854	2.50250E-19	1.8849
22	NM_023814P01904	513396736	5.21E+08	4.54E+08	5.12E+08	-1.1E+09	21	1.881345	2.50250E-19	1.8813
23	NM_007988P09016	513310720	5.21E+08	4.54E+08	5.19E+08	3.54E+08	22	1.880347	2.50250E-19	1.8803
24	XM_148862P00054	513168384	5.02E+08	4.13E+08	5.07E+08	3.42E+08	23	1.880046	2.50250E-19	1.8800
25	NM_172454P01022	512394112	5.21E+08	4.51E+08	5.15E+08	-1.1E+09	24	1.879835	2.50250E-19	1.8798

Şekil 23 BRB ArrayTools Veri Analizi Sonucunda Elde Edilen Ham Veri

Şekil 24'te, N18 hücre hattıyla kıyaslandığında farklı olarak eksprese edilen genler, orta diyagonalin altında kalan AtT-20 hücre hattı tarafında olduğu görülmektedir. BRB ArrayTools analizi neticesinde oluşturulan dağılım çizim grafiği detaylı sonuçlar vermiştir. Her bir nokta bir geni temsil etmektedir. Yine **Şekil 24**'teki örnekte görülebileceği üzere bu noktaların üzeri tıklandığında genlerin bilgilerine ulaşılabilmektedir. Mikrodizi veri analizi tamamlandıktan sonra seçilen genler aşağıdaki gibidir:



Şekil 24 Serpme Çizim Grafiği

Tablo 6 Nihai Gen Listesi

Bai3	ENSMUSG00000033569	Brain-specific angiogenesis inhibitor 3
Glp2r	ENSMUSG00000049928	Glucagon-like peptide 2 receptor
Fzd10	ENSMUSG00000081683	Frizzled homolog 10 (Drosophila)
Gpr116	ENSMUSG00000056492	G protein-coupled receptor 116
Bai1	ENSMUSG00000034730	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1
Gpr133	ENSMUSG00000044017	G protein-coupled receptor 133
Gpr113	ENSMUSG00000067642	G protein-coupled receptor 113
Glp1r	ENSMUSG00000024027	Glucagon-like peptide 1 receptor
Sctr	ENSMUSG00000026387	Secretin receptor
Casr	ENSMUSG00000051980	Calcium-sensing receptor
Crhr1	ENSMUSG00000018634	Corticotropin releasing hormone receptor 1
Grm1	ENSMUSG00000019828	Glutamate receptor, metabotropic 1

Mikrodizi analizinin son aşaması olarak elde edilen genlerin hangi yollarla ilişki olduğunu tespit etmek amacıyla yine web tabanlı bir yazılım olan KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Yolak Analizi kullanılmıştır. **Şekil 25'**de görüleceği üzere iki ilişkili yolak bulunmuştur:

- Nöroaktif ligand-reseptör etkileşimi (**Şekil 26**)
- Uzun süreli depresyon (**Şekil 27**)

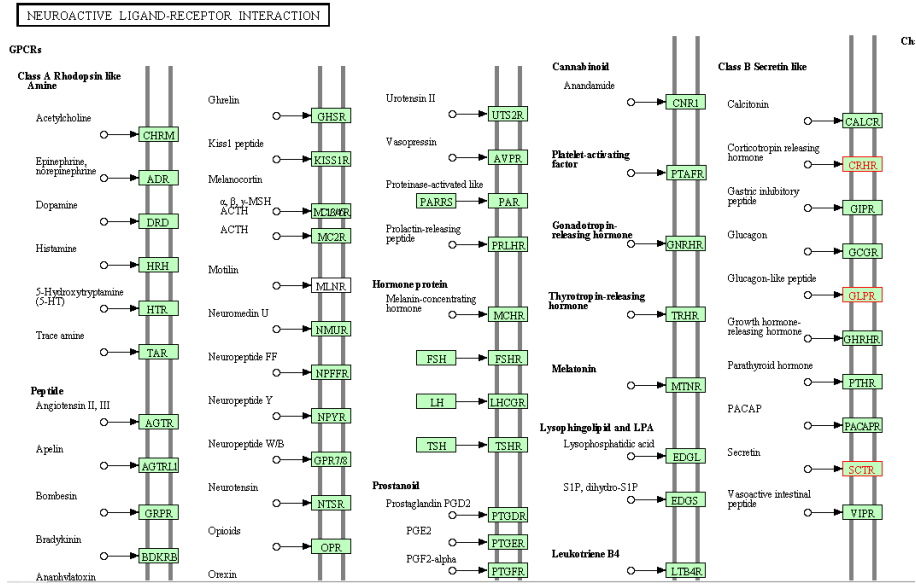
bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/htdocs/final_KEGG_file_1376927252.html

User data and parameters: User data: textAreaUpload.txt, Organism: mmusculus, Id Type: gene_symbol, Ref Set: entrezgene, Significance Level: Top10, Statistics Test: Hypergeometric, Minimum: 2

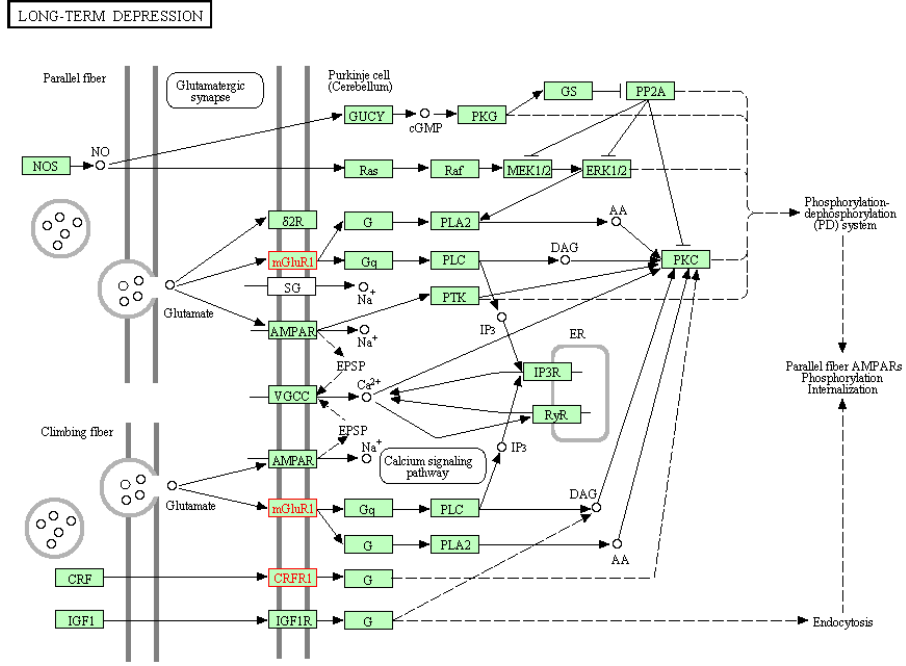
This table lists the enriched KEGG pathways, number of Entrez IDs in your user data set for the pathway, the corresponding Entrez IDs, and the statistics for the enrichment of the pathway. The first column lists the number of reference genes in the category (C), number of genes in the gene set and also in the category (O), expected number in the category (E), Ratio of enrichment value from hypergeometric test (rawP), and p value adjusted by the multiple test adjustment (adjP). Finally, the pathway name is linked to KEGG where the user ids are highlighted, the number of genes is linked to a table with information about the user ids, and the Entrez IDs are linked to Entrez Gene.

Pathway	C	O	E	RawP	AdjP
Neuroactive ligand-receptor interaction	5	14816 12921 14652 319229 93896	C=277;O=5;E=0.06;R=87.04;rawP=1.87e-09;adjP=3.74e-09		
Long-term depression	2	14816 12921	C=72;O=2;E=0.01;R=133.94;rawP=1.00e-04;adjP=1.00e-04		

Şekil 25 KEGG yolak analizi sonucunda ortaya çıkan iki ilişkili yolak



Şekil 26 Nöroaktif ligand-reseptör etkileşimi



Şekil 27 Uzun süreli depresyon

3.2. q-RT-PCR Sonuçları

q-RT-PCR deneylerinin verimlilik hesapları Rotor-Gene Q Serisi Yazılımı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Standart eğri üzerinde ifade edilen R^2 bir q-RT-PCR reaksiyonundaki değişkenlik oranını tarif eder. R^2 değeri 1 ulaştığında, reaksiyon değişkenleri azalır ve bu daha iyi bir reaksiyon elde edildiği anlamına gelir.

Ct değeri döngüdeki eşik değeridir, floresan miktarındaki tespit edilebilir artıştır.

Erime eğrileri olarak, Tm değerleri, oluşturulan DNA örneğinin uzunluğuna bağlıdır. Farklı sıcaklıklardaki farklı grafik zirveleri, farklı DNA örneklerini göstermektedir.

Livak ve Schmittgen çalışmasında tarif edildiği gibi; nispi değişikliklerin hesaplamak amacıyla, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılır (2001).

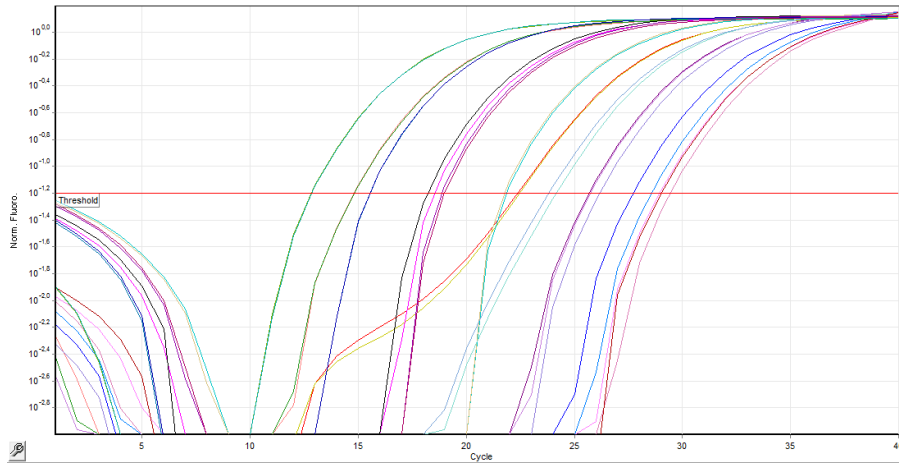
3.2.1. Bai 3 geni için sonuçlar

Şekil 28'deki numuneler, Bai3 geni için kantitasyon grafiği ve erime eğrisi renk temsil edilmektedir.

C	ID	Name	Type
	1	n2a-bai3	Standard
	2	n2a-bai3	Standard
	3	n2a-bai3	Standard
	4	n2a-bai3	Standard
	5	n2a-bai3	Standard
	6	n2a-bai3	Standard
	7	ntc	NTC
	8	n2a-gapdh	Standard
	9	n2a-gapdh	Standard
	10	n2a-gapdh	Standard
	11	n2a-gapdh	Standard
	12	n2a-gapdh	Standard
	13	n2a-gapdh	Standard
	14	ntc	NTC
	15	att20-bai3	Standard
	16	att20-bai3	Standard
	17	att20-bai3	Standard
	18	att20-bai3	Standard
	19	att20-bai3	Standard
	20	att20-bai3	Standard
	21	ntc	NTC
	22	att20-gapdh	Standard
	23	att20-gapdh	Standard
	24	att20-gapdh	Standard
	25	att20-gapdh	Standard
	26	att20-gapdh	Standard
	27	att20-gapdh	Standard
	28	ntc	NTC

Şekil 28 Örneklerin renk anlamları

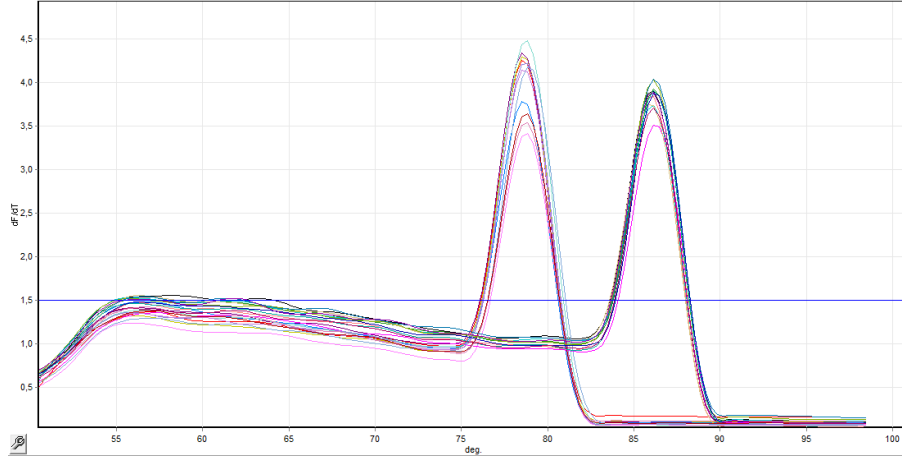
N2a hücre hattından alınan örnekler ve NTC örneklerinden gelen florasın miktarı sinyalleri 10 siklus içinde sıfıra ulaşırken, AtT-20 hücre hattından alınan örneklerdeki florasın miktarı sinyalleri bir noktaya kadar artış göstermiş ve sabitlenmiştir (Şekil 29).



Şekil 29 Bai3 geninin kantitasyon grafiği

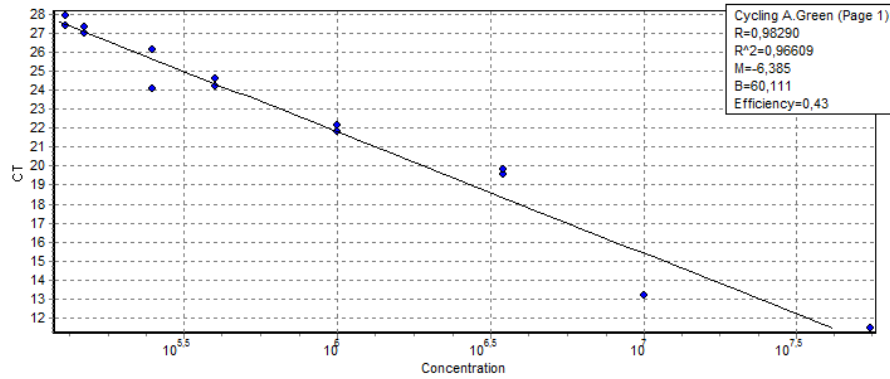
Şekil 30'da görülen Bai3 geninin erime eğrisinde, iki adet tepe noktası gözlenmiştir. İlk zirve 78° etrafında, AtT-20 Bai3 numunelerine aittir. Bu tek benzersiz tepe vardır tüm AtT-20 örneklerinden orantılı olarak üretilmiş Bai3'e ait bir ürün olduğu anlamına gelmektedir. N2a ve AtT-20 hücre dizilerinin her ikisinden de

elde edilen tüm numuneler 87° civarında ikinci bir tepeye ulaşmıştır. GAPDH geni, bu tek benzersiz ürün için uygun sıcaklıktır ve yine tepenin tek olması ürünün tek bir tane olduğu anlamına gelmektedir.



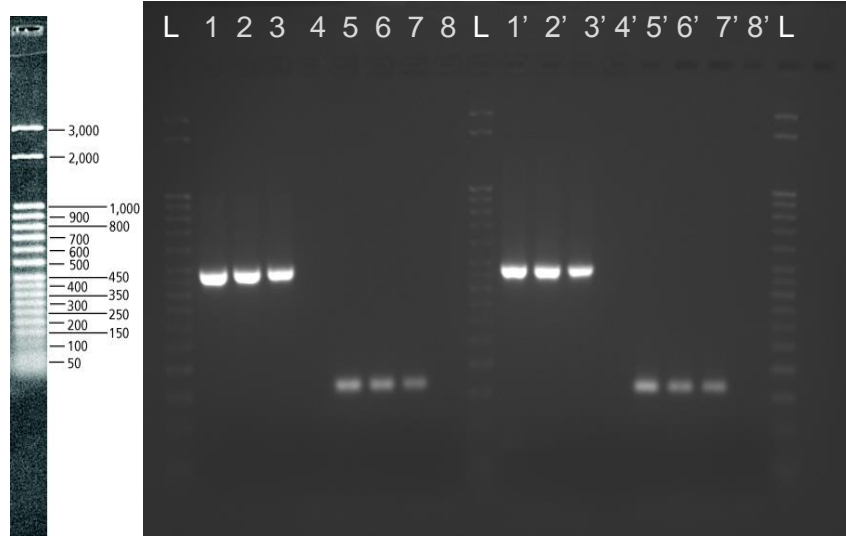
Şekil 30 Erime Eğrisi Grafiği

Bai3 gen için standart eğri örnek çiftleri, konsantrasyonlar vasıtasıyla birbirine yakın olduğunu göstermektedir. **Şekil 31**'de görüleceği üzere, konsantrasyon seyreltileri başarılı bir R değeri vermiştir. Bu değer, Pearson katsayısı, verilerin bir çizgi üzerinde ne kadar iyi dağıldığını veya eğrinin ne kadar iyi dağıldığını gösteren değerdir. Değeri 1'e yaklaştıkça, veriler eğriye daha iyi oturmuş demektir. Burada, R değeri 0,9778290 olduğunu görüyoruz. Bu seyreltmelerin başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir. Bu q-RT-PCR çalıştırmalarının için etkili söylemek amacıyla, verim değeri eğimi (-3,6, -3,3) aralığında olmalıdır, (% 90-100). Verim mükemmel vadede % 100 ise, 10 kat seyreltme durumunda, CT değerleri nedeniyle her değişim için 2-kat değişime gösterecek ve eğim 3,3 değerle birbirinden ayrılacaktır. Eğim -3,6 altında ise, o PCR deneyinin zayıf etkinliğe sahip olduğu düşünülebilir. Bu deneyde eğim -6,35 çıkmıştır, yani standart eğrinin eğimi bu q-RT-PCR çalışması için verimliliğin düşük olduğu anlamına gelir. Aynı zamanda, 0,43 yani E değeri olarak da belirtilir. Bu verimliliğin % 43 olduğu anlamına gelmektedir. Bu hassasiyet gösteren durumlarda, oldukça yüksek miktarda çoğaltan kopyaların kalitesinin düşmesi nedeniyle olabilir. Muhtemelen sapmaya neden olan bir alt uç değer bulunmaktadır. Eğer bu değer göz ardı edilirse, daha verimli standart eğri elde edilebilir.



Şekil 31 Bai3 genin standart eğri grafiği

Şekil 32'de, agaroz jel elektroforezi sonucunda Bai3 gen ürünleri görülmektedir. Numunelerin yükleme bilgileri Tablo 8 bulunmaktadır. Agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre, iki ayrı bantları görmekteyiz. Düşük kütleye sahip bant 150 çizgisi üzerinde ve büyük kütleye sahip ürün ise 500bp çizgisi civarındadır. Bai3 159bp-ürün verirken, GAPDH geni için tasarlanan primerler 496bp-ürün vermelidir. Sonuçlar teorik bilgiyle mükemmel olarak örtüşmektedir.



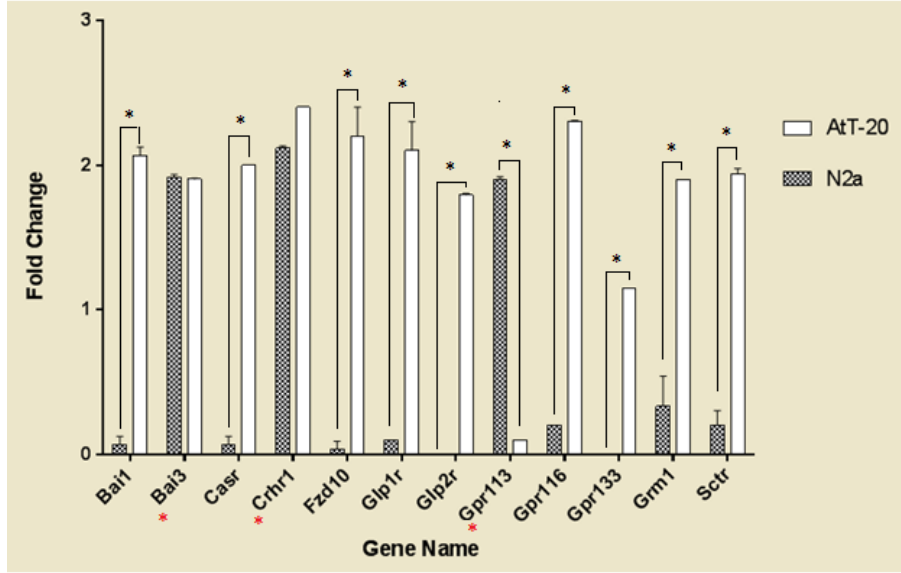
Şekil 32 Agaroz Jel Görüntüsü

Tablo 7 Agaroz Jele Yüklenen Örneklerin Sırlaması

Sample Number	Sample Name	Product Length (bp)
1	1:10 dilution AtT-20 GAPDH product	~ 500
2	1:100 dilution AtT-20 GAPDH product	~ 500
3	1:1000 dilution AtT-20 GAPDH product	~ 500
4	NTC of AtT-20 GAPDH product	-
5	1:10 dilution AtT-20 Bai3 product	~150
6	1:100 dilution AtT-20 Bai3 product	~150
7	1:1000 dilution AtT-20 Bai3 product	~150
8	NTC of AtT-20 Bai3 product	-
1'	1:10 dilution N2a GAPDH product	~ 500
2'	1:100 dilution N2a GAPDH product	~ 500
3'	1:1000 dilution N2a GAPDH product	~ 500
4'	NTC of N2a GAPDH product	-
5'	1:10 dilution N2a Bai3 product	~150
6'	1:100 dilution N2a Bai3 product	~150
7'	1:1000 dilution N2a Bai3 product	~150
8'	NTC of N2a Bai3 product	-

3.2.2. Seçilmiş Gen İfadelerindeki Katlı Değişim

Katlı değişim grafiği "GraphPad Version 6.02" üzerinden yapılandırılmıştır. GAPDH geni göreceli gen ekspresyonu hesaplamalar için kullanılmıştır. 12 genin katlı değişimi karşılaştırıldığında; Bai1, CaSR, Fzd10, Glp1r, Glp2r, Gpr116, Gpr133, Grm1 ve Sctr genlerinin mikrodizi veri analizine uygun olarak AtT-20 hücre hattında farklı olarak ifade edildiği gözlenmiştir. **Şekil 33**'de kırmızı yıldızla vurgulanan genlerden *Bai3*, *Crhr1* ve *Gpr113* beklendiği gibi sonuçlar vermemiştir. Bai3 ve *Crhr1* genleri N2a ve AtT-20 hücre hatlarının her ikisinde de eksprese edilmiştir. Öte yandan, *Gpr113*, ilginç bir şekilde N2a hücre hattında ifade edilirken, AtT-20 hücre hattında eksprese edilmemiştir.



Şekil 33 Seçili Genlerdeki Katlı Değişim Grafiği (mean \pm SEM from N2a cell line and AtT-20 cell line per gene group, $p < 0.001$)

Mikrodizi verileri ilk alındığında veri setinde yaklaşık olarak 72000 GPCR ve GPCR ilgili ilişkili gen bulunmaktaydı. Mikrodizi verileri kati deliller olarak kabul edilemeyeceğinden, sağlama q-RT-PCR deneyleriyle gerçekleştirilmiştir.

Mikro-dizi çalışmada kullanılan hücre hattı olan N18 fare nöroblastom ve sıçan glioma melez bir hücre hattıdır. Ancak, çalışmalarda ortaya konduğu üzere CART yanıt vermeyen hücre hattı N2a ve HEK293 hücre hatlarıdır. Ancak hücrelerin yine fare genomu içermesi durumu olumlu kılmıştır. Bu çalışmayı gerçekleştirmek ve hücre hatları arasında bir karşılaştırma yapabilmek için, elde edilen mRNA'ların bir organizmadan elde edilmiş olması gerekmektedir. Bu nedenle, *Mus musculus* N2a ve AtT-20 hücre hatları türetilmesi nedeniyle kullanılmıştır. HEK293 hücre hattı, CART'a yanıt vermeyen hücre hattı olmakla beraber, insandan türetilmiştir. Bu nedenle, uygun bir karşılaştırma için AtT-20 hücre hattına uygun değildi.

Sonuç olarak, mikrodizi verilerinden farklı sonuçlar verdiği belirlenen üç gen Bai3, *Crhr1* ve *Gpr113* CART'ın reseptör adayı olmak için uygun değildir. Fakat kalan 9 gen CART reseptörü adayı olmaya

devam etmektedir. Ayrıca, bu aday genler yolak analizinde CART ile ilişkili yollarda bulunmaktadır. Bu da CART reseptörü olma ihtimallerini güçlendirmektedir.

Referanslar

- Alexander-Thomas, H., Chemical probes: Sharpen your epigenetic tools, *Nat Chem Biol*, 7, 499-500, (2011).
- Atwood, B., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K., & Straiker, A., Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis, *BMC Genomics*, 1-14, (2011).
- Bouvier, M., Unraveling the structural basis of GPCR activation and inactivation, *Nature Structure Molecular Biology*, 539-41, (2013)
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., ve arkadaşları, Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data, *Nature Genetics*, 29, 365 - 371, (2001).
- Bruno, A., Costantino, G., Fabritiis, G., Pastor, M., & Selent, J., Membrane-Sensitive Conformational States of Helix 8 in the Metabotropic Glu2 Receptor, a Class C GPCR, *PLoS One*, 7(8), 1-9, (2012).
- Chang, G. W., Proteolytic cleavage of the EMR2 receptor requires both the extracellular stalk and the GPS motif, *FEBS Lett.*, 547, 145–150, (2003).
- Dominguez, G., Lakatos, A., & Kuhar, M., Characterization of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide gene promoter and its activation by a cyclic AMP-dependent signaling pathway in GH3 cells, *Journal of Neurochemistry*, 80, 885-893, (2002).
- Driessler, F., & Baldock, P. A., Hypothalamic Regulation of Bone, *Journal of Molecular Endocrinology*, 45, 175-181, (2010).
- Eleftheriou, F., Ahn JD, J., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., ve arkadaşları, Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART, *Nature*, 434, 514–520, (2005).
- Filipek, S. S., G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus, *Annual Reviews Physiology*, 65, 851–879, (2003).
- Filmore, D., It's a GPCR world, *American Chemical Society Modern Drug Discovery*, 24-28, (2004).
- Foord, S. M., Jupe, S., & Holbrook, J., Bioinformatics and type II G-protein-coupled receptors, *Biochemical Society Transactions*, 30 (4), 473-479, (2002).
- Gether, U., Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors, *Endocrinology Revision*, 2, 90-113, (2000).
- International HapMap Project. (n.d.). *Bead Arrays*. Retrieved August 16, 2013, from NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechBeadArray.shtml>
- Jones, D., Lakatos, A., & Vicentic, A., The CART receptors: Background and recent advances. *Peptides*, 27, 1934-1937, (2006).

Kim, J. H., Glutamate residues in the second extracellular loop of the human A2a adenosine receptor are required for ligand recognition, *Molecular Pharmacology*, 49, 683– 691, (1996).

Kobe, B., The leucine-rich repeat as a protein recognition motif, *Current Opinion in Structural Biology*, 725–732, (2001, Aralık).

Kolakowski, J. L., GCRDb: a G protein-coupled receptor database. *Recept Channel*, 2, 1–7, (1994).

Koylu, E., Balkan, B., Kuhar, M., & Pogun, S., Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and the stress response. *Peptides*, 27, 1956-1969, (2006).

Kristiansen, K., Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function, *Science Direct - Pharmacology & Therapeutics*, 103, 21– 80, (2004).

Kroeze, W. K., Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level, *Top Med Chem*, 2, 507– 528, (2002).

Kuemmerle, J. F., Coupling of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase to Gi2 in human intestinal smooth muscle: Gbetagamma-dependent mitogen-activated protein kinase activation and growth, *J Biol Chem*, 276, 7187–7194, (2001).

Kuhar, M., Adams, G., Dominguez, J., Jaworski, J., & Balkan, B., CART peptides, *Neuropeptides*, 36, 1-8, (2002).

Kuhar, M., Lakatos, A., Prinster, S., Vicentic, A., & Hall, R., Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors, *Neuroscience Letters*, 384, 198–202, (2005).

Lane, J., & Canals, M., Sequential conformational rearrangements dictate the dynamics of class C GPCR activation, *Science Signalling*, (2012, Kasım).

Langer, I. V., Lysine 195 and aspartate 196 in the first extracellular loop of the PAC1 receptor are essential for high affinity binding of agonists but not of antagonists, *Neuropharmacology*, 44, 125–131, (2003).

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method, *Methods*, 25, 402–408, (2001).

Macfarlane, S. R., Proteinase-activated receptors, *Pharmacology Review*, 53, 245–282, (2001).

Oikawa, M. S., Effects of protease-activated receptors (PARs) on intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands, *Histochemistry and Cell Biology*, DOI 10.1007/s00418-013-1082-0, (2013).

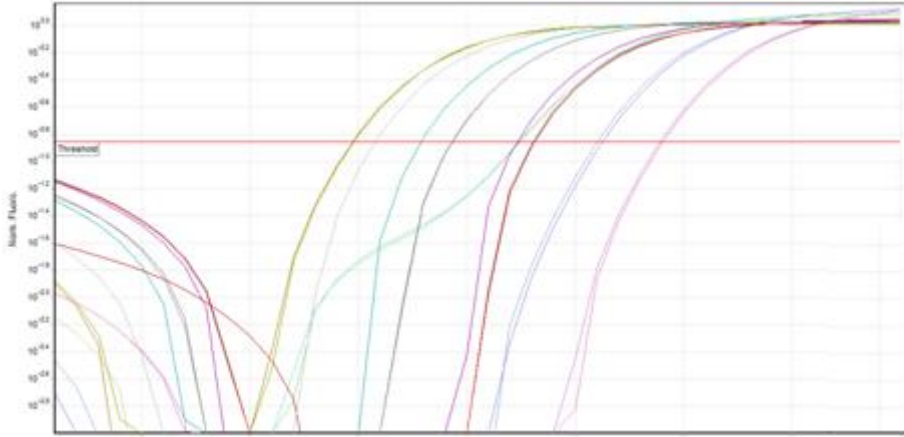
Okada, T. F., Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 5982– 5987, (2002).

Pantages, E., & Dulac, C., A novel family of candidate pheromone receptors in mammals, *Neuron*, 28(3), 835–845, (2000).

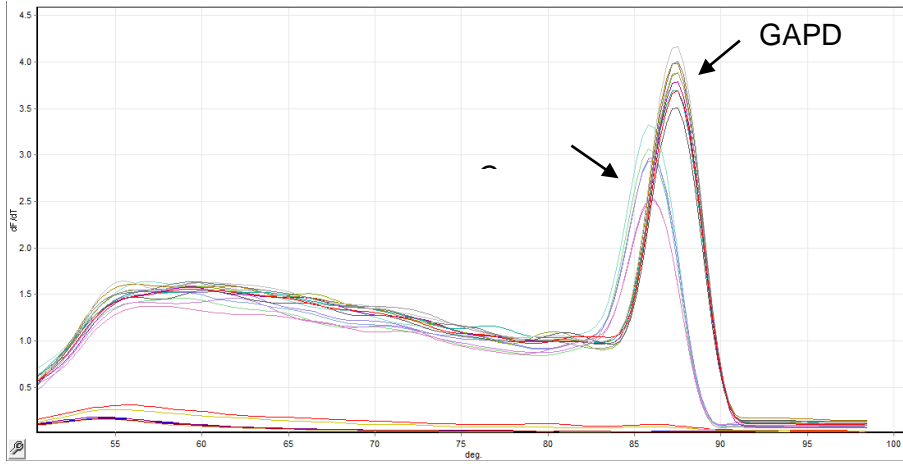
Pfaffl, M., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR, *Oxford Journals Nucleic Acids Research*, 29(9), 45, (2001).

- Pierce, K. L., Seven-transmembrane Receptors, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 639–650, (2002).
- Roth, C., & Yarmush, M., Nucleic acid biotechnology, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1, 265-297, (1999).
- Sakmar, P. T., Clicking class B GPCR ligands, *Nature Chemical Biology*, 7, 500-502, (2011).
- Tang, X. W., Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets, *Acta Pharmacologica Sinica*, 33, 363–371, (2012).
- Thim, L., Kristensen, P., Wulff, B., & Clausen, J., Tissue Specific Processing of Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript Peptides in Rat, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2722-2727, (1999).
- Vischer, H. F., Ligand selectivity of gonadotropin receptors, *Role. Biol Chem*, 278, 15505– 15513, (2003).
- Zhang, M., Han, L., & Xu, Y., Roles of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the central nervous system, *Clinical and Experimental Pharmacology Physiology*, 39(6), 586-592, (2012).

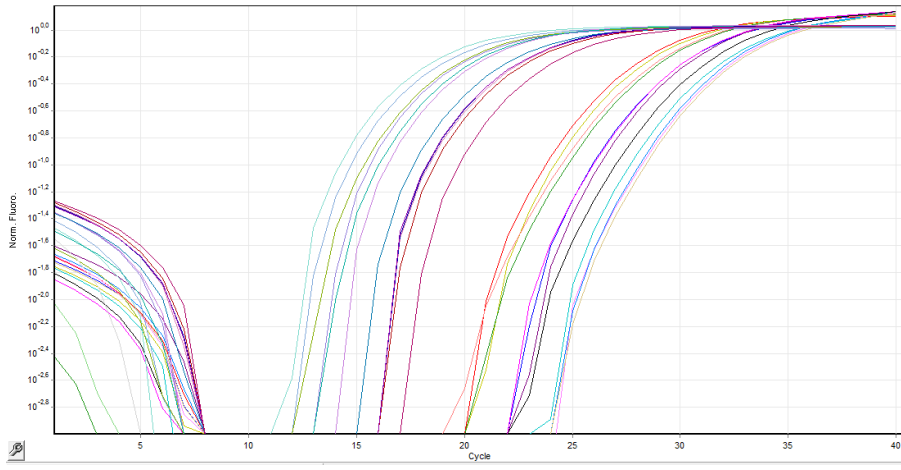
Ekler



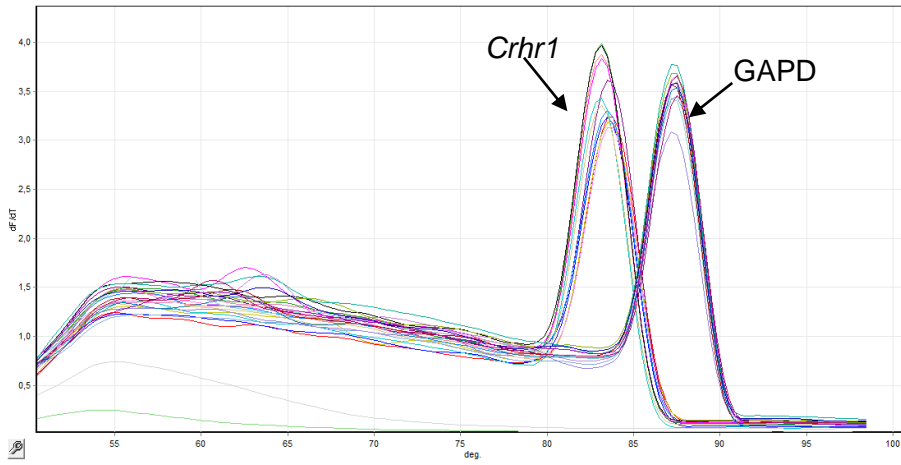
Şekil E1 Casr geninin kantitasyon grafiği



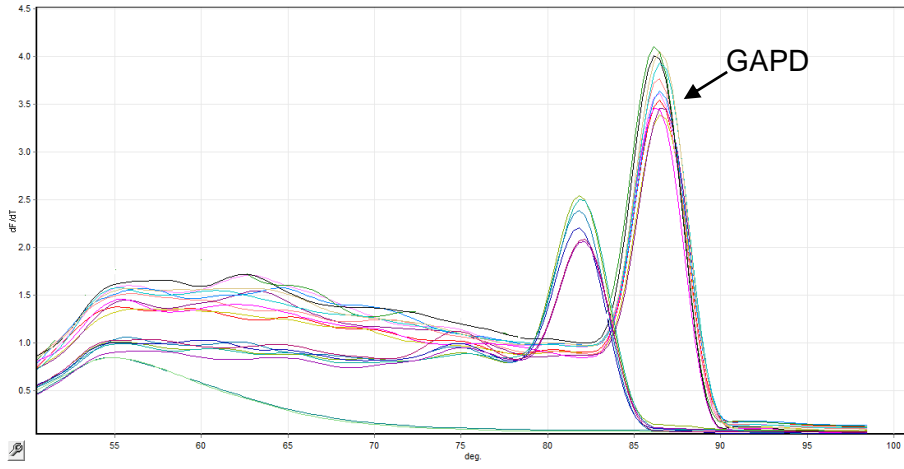
Şekil E2 Erime Eğrisi Grafiği Casr



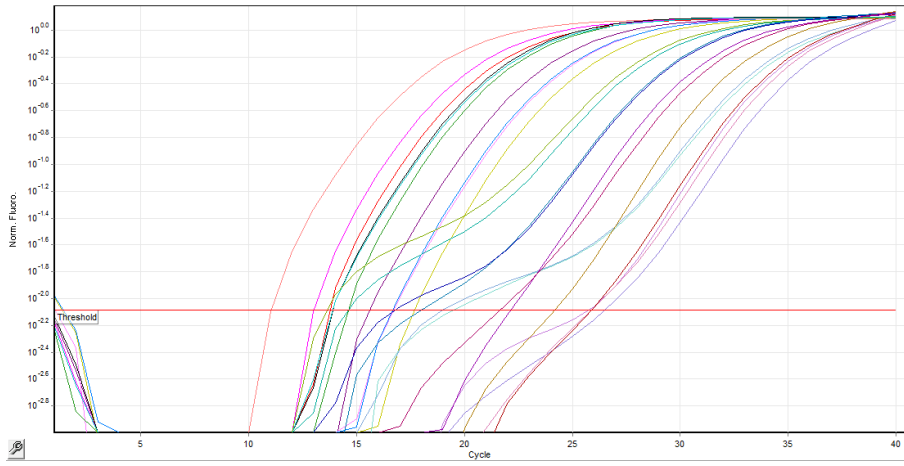
Şekil E3 *Crhr1* geninin kantitasyon grafiği



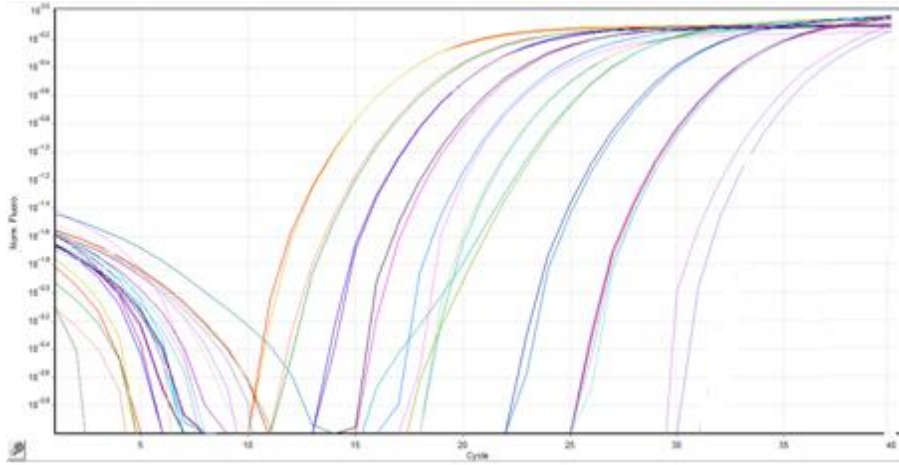
Şekil E4 Erime Eğrisi Grafiği *Crhr1*



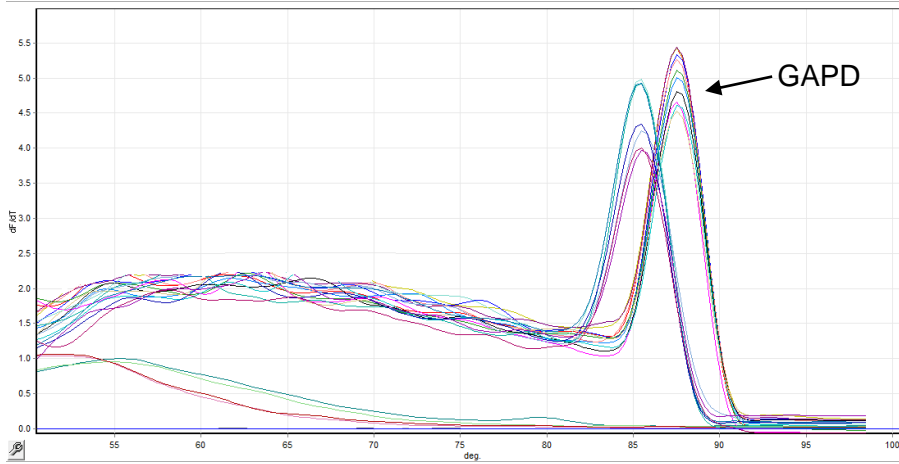
Şekil E5 *Fzd10* geninin kantitasyon grafiği



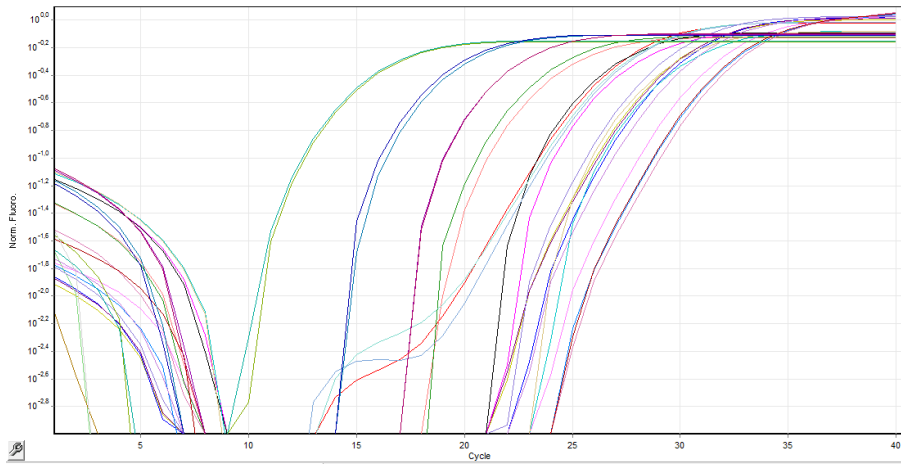
Şekil E6 Erime Eğrisi Grafiği *Fzd10*



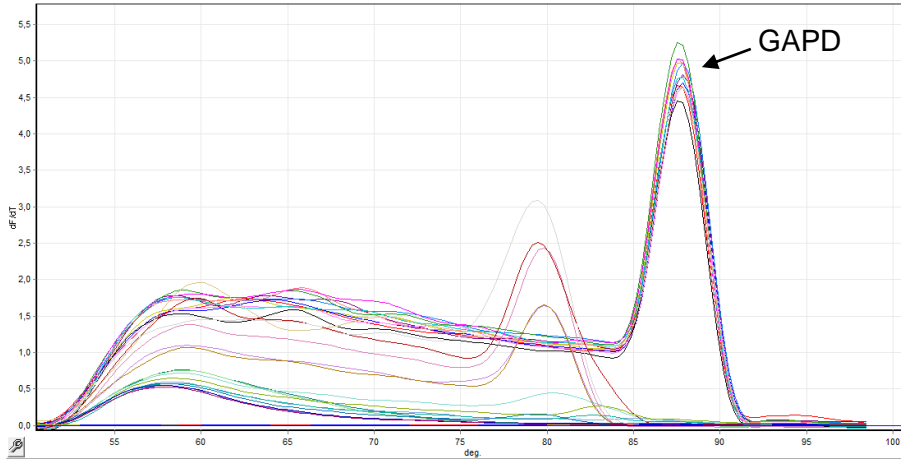
Şekil E7 *Gp1r* geninin kantitasyon grafiği



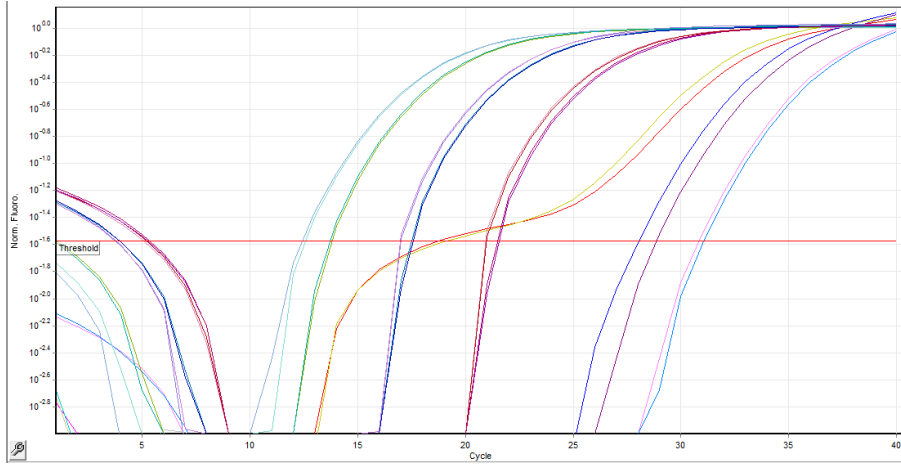
Şekil E8 Erime Eğrisi Grafiği *Gp1r*



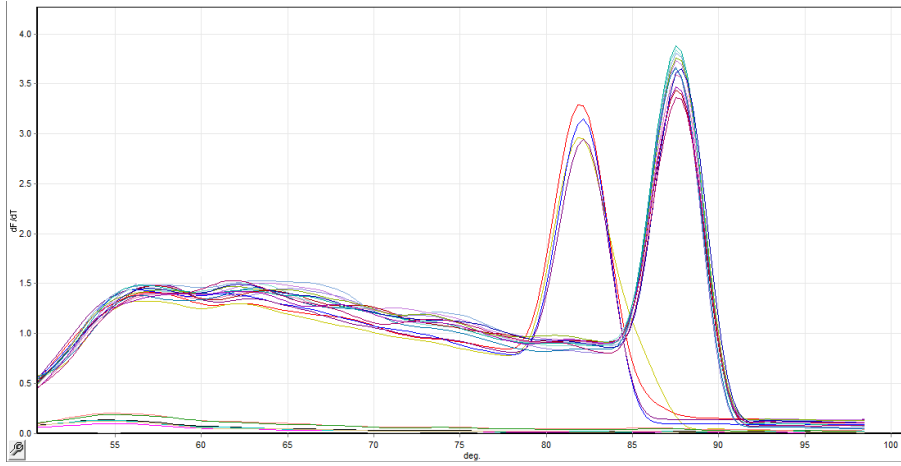
Şekil E9 *Glp2r* geninin kantitasyon grafiği



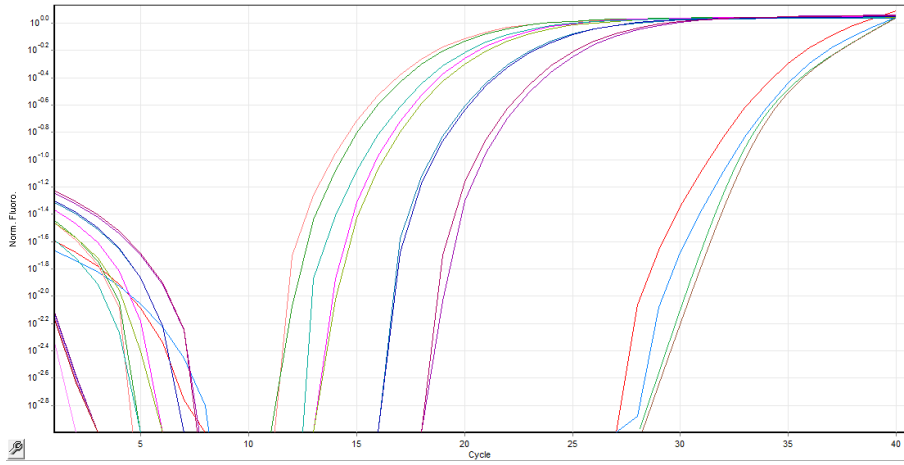
Şekil E10 Erime Eğrisi Grafiği *Glp2r*



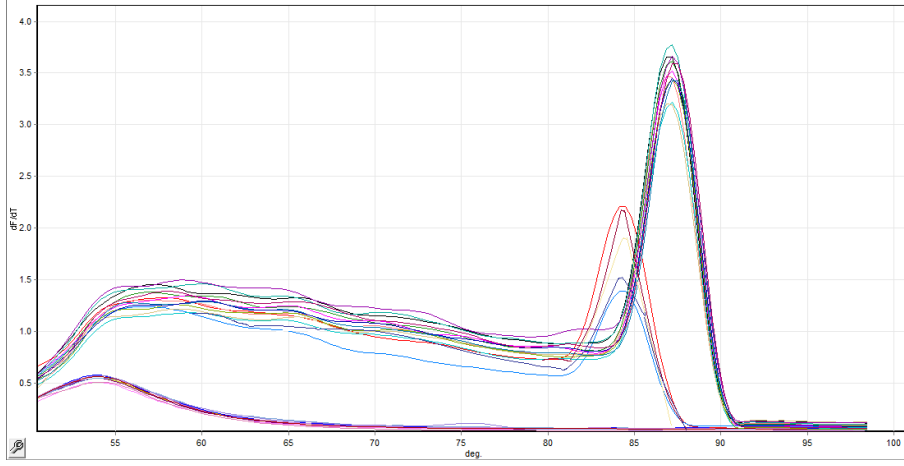
Şekil E11 *Gpr13* geninin kantitasyon grafiği



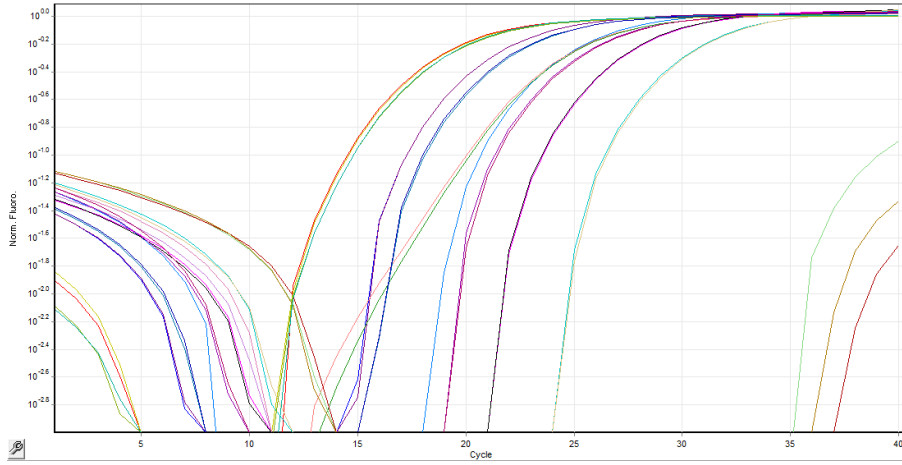
Şekil E12 Erime Eğrisi Grafiği *Gpr13*



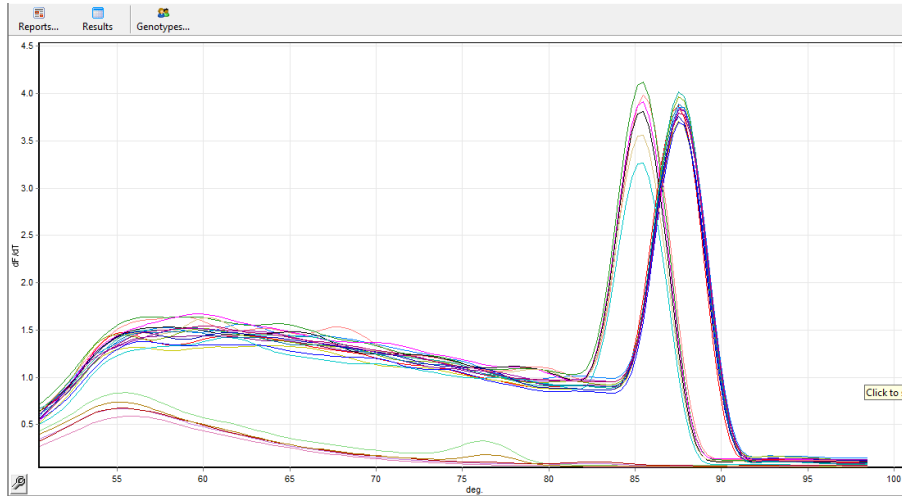
Şekil E13 *Gpr116* geninin kantitasyon grafiği



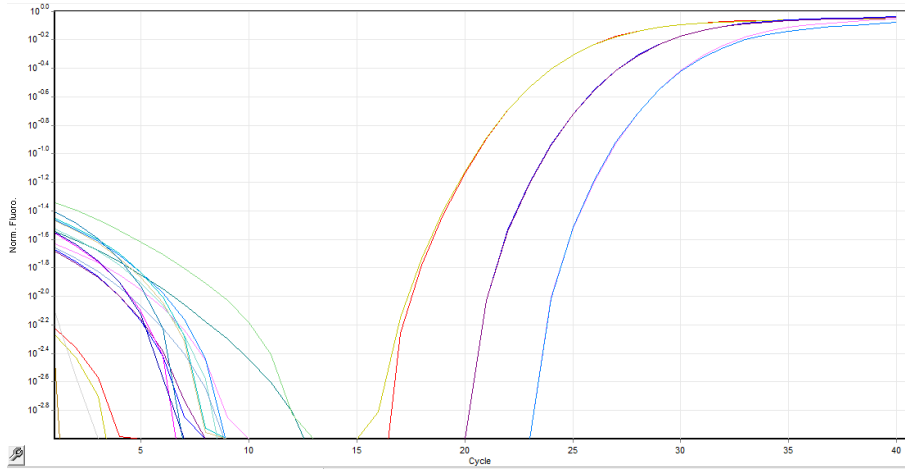
Şekil E14 Erime Eğrisi Grafiği *Gpr116*



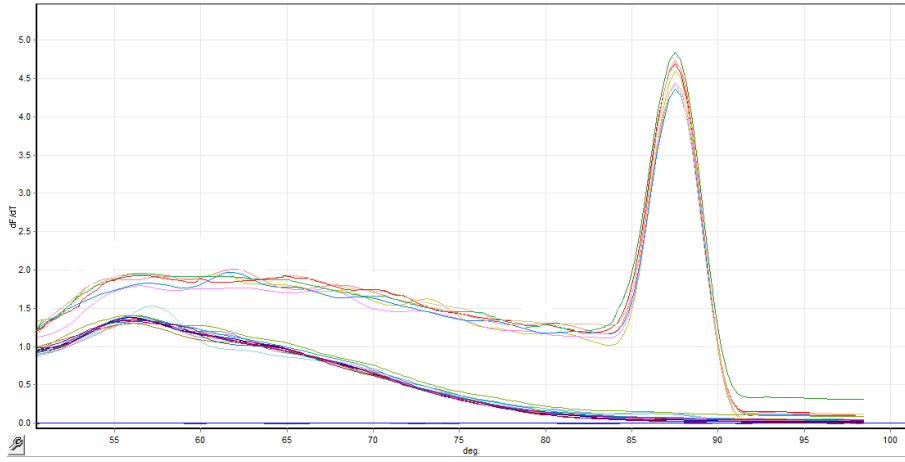
Şekil E15 *Gpr133* geninin kantitasyon grafiği



Şekil E16 Erime Eğrisi Grafiği *Gpr133*



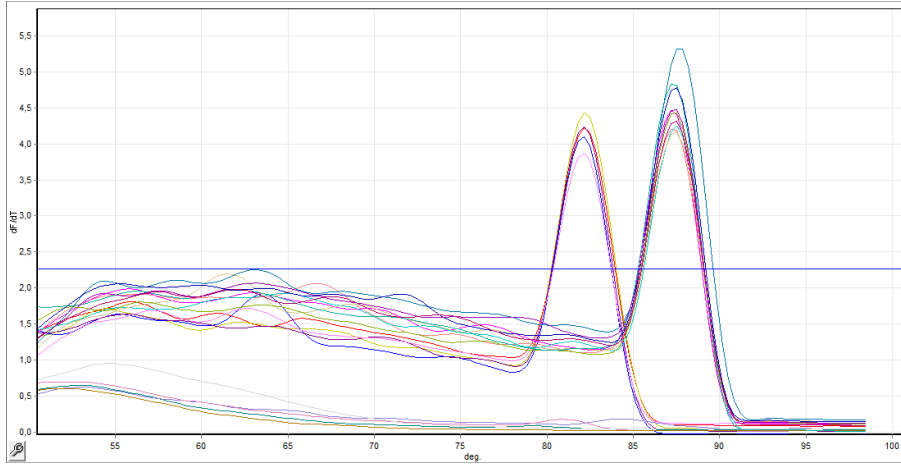
Şekil E17 *Grm1* geninin kantitasyon grafiği



Şekil E18 Erime Eğrisi Grafiği *Grm1*



Şekil E19 *Sctr* geninin kantitasyon grafiği



Şekil E20 Erime Eğrisi Grafiği *Sctr*

Proje Özet Bilgi Formu, sonuç raporunun son sayfası olarak eklenmelidir.