

Voltaja duyarlı potasyum kanallarında genetik mutasyonlar sonucu meydana gelen hastalıkların moleküler temelini araştırılması

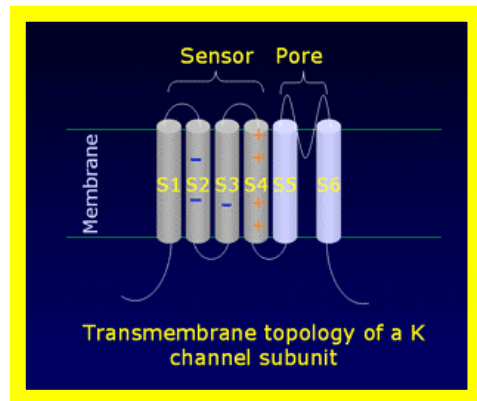
Dr. Naciye YAKTUBAY DÖNDAŞ

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., Adana

GİRİŞ

Hücre membranlarında bulunan ve protein yapısında olan iyon kanalları, hücreye iyon giriş-çıkışlarını kontrol ederek hücre fonksiyonlarını düzenlerler. Bu kanallar, kalbin çalışma hızını, sentezlenen hormonların kana salıverilmesini ve santral sinir sistemindeki sinyal iletiminde rol oynayan elektriksel stimulusların oluşumunu sağlarlar. Doku fonksiyonlarını kontrol eden bu kanalların aktiviteleri hastalık durumlarında değişebilir. Hipertansiyon, alzheimer, epilepsi, myastenia gravis, Long-QT sendromu gibi radikal tedavisi günümüzde pek mümkün olmayan bazı hastalıkların moleküler temeli son zamanlarda araştırılmaya başlanmıştır. Bu araştırmalara göre, bazı iyon kanallarında meydana gelen genetik mutasyonların kanal fonksiyonlarını olumsuz etkileyebileceği ve bunun sonucunda yukarıda belirtilen hastalıklar gibi bazı ciddi doku fonksiyon bozukluklarının oluşabileceği bildirilmiştir (1, 2, 3). İyon kanallarından potasyum kanalları, virüs'ten insana kadar hemen hemen bütün organizmalarda bulunmaları ve kalp hastalıkları gibi yaşamsal risk taşıyan bazı hastalıkların nedeninin potasyum kanallarındaki fonksiyon bozukluğundan kaynaklandığının anlaşılmasından sonra bu kanallara olan ilgi çok artmıştır. Kalp dokusu fonksiyonlarında rol oynayan potasyum kanalları daha çok voltaja duyarlı potasyum kanalları (K_v)'dır. Kalpteki K_v kanallarında herhangi bir nedenle meydana gelen fonksiyon bozukluğu ciddi kalp rahatsızlıklarına neden olabilir. Örneğin Long-QT sendromu, ölümcül ventriküler aritmilere neden olabilen bir kalp hastalığıdır. Bu sendromun, kalpteki K_v kanallarında meydana gelen genetik mutasyonlardan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (3). Bu mutasyonlar sonucu K⁺ kanalı normalden daha uzun bir süre kapalı kalır. Atrial fibrilasyon hastalığında ise KCNQ geninde meydana gelen genetik mutasyonların rolü olduğu ve bu mutasyonların K_v fonksiyonlarında artış sağladığı rapor edilmiştir (4).

K_v kanalları internal membran proteinleri olup yapısal olarak dört alt üniteden meydana gelirler ve her bir alt ünite de altı transmembranal segment (S1-S6)'ten oluşur. Bunlardan S1-S4 voltaj sensörleri gibi görev görürken S5 ve S6 'por' denilen ve K⁺ iyonunun arasından geçtiği 'kapı' kısmını oluştururlar (Şekil 1). Por ile voltaj sensör kısmının fonksiyonel olarak birbirleriyle bağıntılı olduğu sanılmaktadır; membran depolarize olduğunda sensör kısmının hareketlenerek por kısmına sinyal gönderdiği ve bunun sonucunda kanal kapısının açıldığı bildirilmiştir (5, 6). K_v kanallarındaki sinyal gönderme prosesinin mekanizmasını anlayabilmek için K_v kanal yapısı ile fonksiyonu arasındaki ilişkinin iyi bilinmesi gerekir. Bu ilişkiyi araştırmak için, K_v kanalındaki alt segmentlerde noktasal mutasyonlar oluşturulması ve bu mutasyonların neden olduğu fonksiyon değişikliklerinin elektrofizyolojik olarak ölçülmesi gerekir. Kanaldaki yapı-fonksiyon ilişkisinin bu şekilde moleküler düzeyde aydınlatılması, K_v kanallarında genetik mutasyon kaynaklı hastalıkların moleküler mekanizmasının da analiz edilmesi anlamına gelir.



Şekil 1. Voltaja duyarlı potasyum kanal (K_v) yapısı. K_v kanalı dört alt üniteden meydana gelir ve her bir alt ünite altı transmembranal segment (S1-S6)'ten oluşur. S1-S4 kanalın sensör kısmını, S5-S6 ise por kısmını oluştururlar.

Potasyum kanallarında yapı-aktivite ilişkisini aydınlatmaya yönelik yapılmış olan çalışmalar daha çok Kv kanalında poru meydana getiren S5 ve S6 segmentleri ve voltaj sensörü segmentleri (S1-S4)'nden S4 segmenti üzerinde yoğunlaşmıştır (7, 8,9,10). S4 dışındaki diğer voltaj sensör segmentleri (S1-S3)'nin kanal fonksiyonları üzerindeki direkt etkileri henüz aydınlatılmamıştır. Ayrıca, bu segmentlerin depolarizasyon sırasında hareket edip etmedikleri hala merak konusudur. Bu çalışmada, S4 segmentine en yakın olması açısından S3 segmenti ile çalışmayı uygun bulduk ve bu segmentin kanal kapısının açılıp kapanmasında direkt olarak etki gösterip göstermediği ve depolarizasyon sırasındaki pozisyonunu araştırdık.

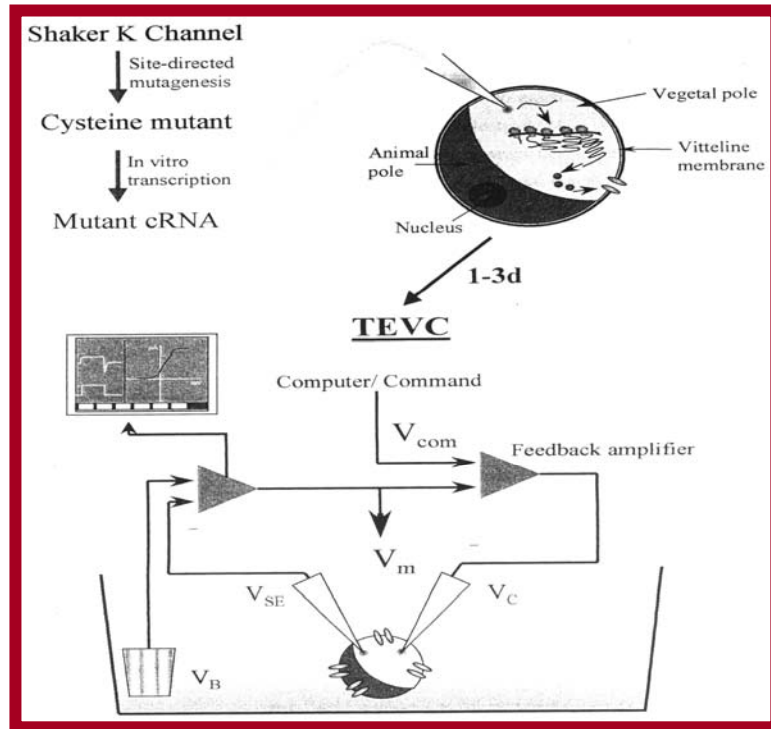
MATERYAL ve YÖNTEM

Bütün deneylerde *Shaker* B potasyum kanalı ($\Delta(N6-46)ShB1$) ile deneyler sürdürüldü. *In vitro* olarak rekombinant DNA teknikleri ile Kv1 kanalının S3 segmentinde sistein sübstitüsyonu şeklindeki noktasal mutasyonlar (L327C, C: Sistein, A328C, T329C, V330C, V331C, A332C, E333C, E334C, E335C; L: Lösin, A: Alanin, T: Treonin, V: Valin, E: Glutamat) oluşturuldu ve normal (mutasyon oluşturulmamış) kanal ile mutant kanal fonksiyonları iki elektrodlu voltaj klamp metodu ile karşılaştırıldı (Şekil 2). Deney detayları aşağıdaki gibidir:

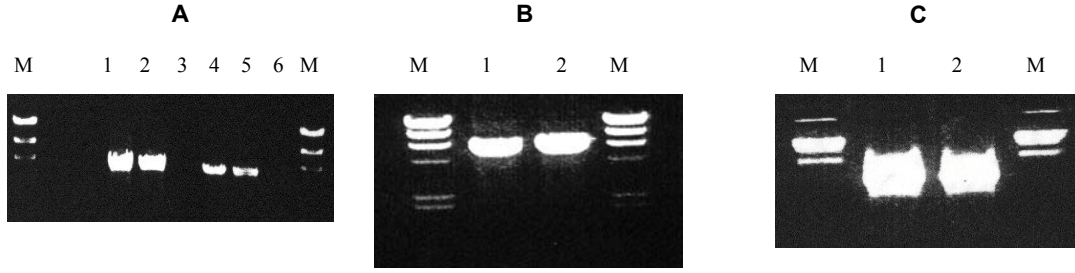
Bu çalışmada kullanılan metodlar multidisipliner olup moleküler biyoloji, mikroinjeksiyon ve elektrofizyolojik teknikleri içermektedir. Çalışmanın deneysel aşaması üç basamakta tamamlandı.

I. Basamak (Genetik Çalışmalar)

Önce, *Shaker* B potasyum kanalı ($\Delta(N6-46)ShB1$)'nda hızlı (N-tipi) inaktivasyonu engellemek için, 6-46 pozisyonundaki amino asid rezidüleri QuickChange Metodu (3) kullanılarak noktasal mutasyon ile ortadan kaldırıldı. Sonra, PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu: Uygulanan program: 95° C, 30 s; 55° C, 60 s; 68° C, 12 dk. Toplam 16 döngü tamamlandıktan sonra 72° C, 7 dk) ve Rekombinant DNA teknikleri ile mutant (noktasal mutasyon tekniği ile S3 segmentinde L327C, A328C, T329C, V330C, V331C, A332C, E333C, E334C ve E335C mutasyonları) ve mutant olmayan *Shaker* potasyum kanal komplementer DNA (cDNA)'lar elde edildi ve bunlar ayrı bir şekilde *DpnI* enzimi ile kesilip saflaştırıldıktan sonra, aynı işlemlerden geçirilmiş olan vektör (pKS Bluescript)'e kombine edildi ve *E. coli* bakterisi (XLBlue)'lerine aktarıldı (transfomasyon). Bakteri kültürü 12-15 saat 37° C'de inkübe edildikten sonra *Shaker* potasyum kanal DNA'sı bakteri kültüründen izole edildi ve saflaştırıldıktan sonra *NotI* enzimi ile linearize edilerek mutant ve mutant olmayan kanalların cRNA'ları *in vitro* olarak sentezlendi (Şekil 3).



Şekil 2. Çalışmadaki deneysel aşamaların şematik ifadesi.



Şekil 3. *Shaker* K_v kanal mutant (L327C ve T329C)'lerinin DNA ve RNA'larının agaroz jel fotoğrafları. **A.** PCR (1 ve 4 mutant olmayan DNA, 2 L327C DNA, 3 ve 6 negatif kontrol, 5 T329C DNA ve M marker'ı ifade etmektedir) **B.** Bakteriden izole edilerek saflaştırılmış plazmid DNA (1 L327 C, 2 T329C) **C.** RNA (1 L327 C, 2 T329C)'yi göstermektedir.

II. Basamak (Mikroinjeksiyon Çalışmaları)

Mikroinjeksiyon yöntemleri ile cRNA'ların kurbağa (*Xenopus laevis*) oositlerine injekte edilerek *Shaker* potasyum kanal proteinlerinin eksprese edilmesi. Olgun dişi *Xenopus laevis* kurbağaları (30-40 g) 3-aminobenzoik asit etil ester (%0.2; Sigma) ihtiva eden su içerisinde anestezi edildikten sonra servikal dislokasyon ile öldürüldü ve abdominal kısımda bulunan ovarian loblar izole edildi. İnce penset ile önce mekanik diseksiyon oluşturulduktan sonra kollogenaz enzimi (1 mg/ml, Tip 1A; Sigma) ile 90 dakika muamele edilerek oositlerin teca ve kollojen yapıları uzaklaştırıldı. Deneyde kullanılan oositler olgun olmayan dönemin V. veya VI. gelişim evresinde olanlardan seçildi (Kurbağa yumurtalarının 3 ana gelişim dönemi vardır: Olgun olmayan, olgun ve fertilizasyon dönemleri. Olgun olmayan dönemin ise 6 gelişim evresi vardır. İyon kanalı ekspresyon çalışmaları daha çok V. veya VI. Gelişim evresinde olan yumurtalar üzerinde yapılır). *Xenopus laevis* oositlerine *Shaker* potasyum kanal cRNA (mutant veya mutant olmayan)'sının injeksiyonu mikroskop altında 15-25 ng'a karşılık gelen 50 nl hacimde yapıldı. Daha sonra oositler modifiye ND96 solüsyonu (mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 0.1 ditiotritol ve 5 HEPES, pH 7.4, koruyucu olarak: penisilin (10 ü/ml), gentamisin (50 µg/ml) ve streptomisin (0.1 mg/ml)) içerisinde 18°C'de 2-3 gün inkübe edildi.

III. Basamak (Elektrofizyolojik Çalışmalar)

Mikroelektrot tekniklerinden 'İki Elektrotlu Voltaj Klamp' metodu ile, *Xenopus laevis* yumurtalarında eksprese edilen mutant ve mutant olmayan *Shaker* potasyum kanal fonksiyonlarının analiz edilmesi ve sonuçların birbirleri ile

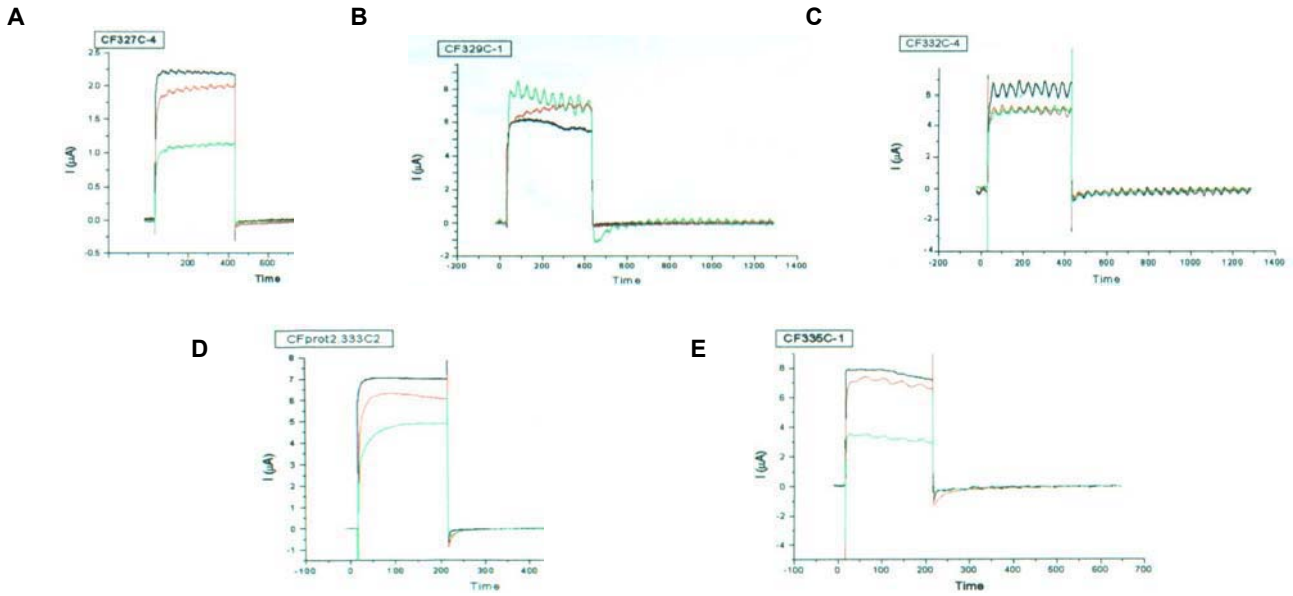
karşılaştırılması. *Shaker* potasyum kanalının fonksiyonları iki elektrotlu voltaj klamp (Two Electrode Voltage Clamp) metodu ile Geneclamp 500 (Axon Instruments) cihazı kullanılarak 22-25 °C'de incelendi. *Xenopus laevis* oositleri kurbağa Ringeri (mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, pH 7.2) solüsyonu ile sürekli perfüze (2 ml/dk) olan banyo (50 µl) ortamına yerleştirildi ve borosilikat camdan yapılmış olan mikroelektrotlar 3 M KCl ile dolduruldu ve rezistansları voltaj ve akım elektrotları için sırasıyla 1-3 MΩ ve 1-1.5 MΩ arasına ayarlandıktan sonra banyodaki kurbağa yumurtasına dikkatlice ve yüzeysel olacak şekilde hafifçe batırıldı. *Shaker* kanalındaki akım-voltaj (I-V) ilişkisini analiz etmek için, oositler -80 mV'da tutuldu ve 10 s intervallerle 10 mV artışlar (0.1 Hz) şeklinde 200 ms'lik depolarizasyonlar uygulandı. Veriler Geneclamp (2 kHz)'de ve daha sonra CED ve CED 1401 (4 kHz)'de filtre edildi. S3 segmentinin hareketini analiz etmek için pCMBS (parakloromerküribenzensülfonat; 100 µM) ve DTT (ditiotritol; 1 mM) kullanıldı.

BULGULAR

Bu çalışmada *Shaker* potasyum kanalının S3 segmentinde sistein süstitüsyonları ile 327-335 pozisyonlarında noktasal mutasyonlar (L327C, A328C, T329C, V330C, V331C, A332C, E333C, E334C ve E335C) oluşturuldu ve bu mutant kanalların fonksiyonları elektrofizyolojik yöntemlerle analiz edildi. Mutant kanalların voltaj-akım ilişkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi. Başka bir deyişle, S3 segmentinde 327-335 pozisyonlarında süstitüe edilen sistein rezidüleri *Shaker* K_v kanalının voltaja bağımlı fonksiyonlarında anlamlı bir değişiklik oluşturmadılar.

S3 segmentindeki hareketliliği araştırmaya yönelik yapılmış deneylerde, pCMBS (100 μ M) T329C dışındaki mutant kanalların voltaja bağlı cevaplarında inhibisyon oluşturdu. Ancak inhi-

bisyon derecesi her mutantta aynı değildi (Şekil 5). DTT ise pCMBS'in oluşturduğu inhibitör etkiyi T329C ve A332C mutant kanalları dışındaki mutantlarda tersine çevirdi (Şekil 4, 5).



Şekil 5. PCMBS (100 μ M) ve DTT (1 mM)'nin *Shaker* K_v kanal mutantları üzerindeki etkisi. **A.** L327C mutantı (üstteki eğri kontrol, ortadaki DTT, alttaki ise pCMBS uygulamasını göstermektedir). **B.** T329C mutantı (üstteki eğri pCMBS, ortadaki DTT, alttaki ise kontrol uygulamasını göstermektedir). **C.** A332C mutantı (üstteki eğri kontrol, altta birbiri üzerinde örtüşen iki eğri DTT ve pCMBS uygulamalarını göstermektedir). **D.** E333C mutantı (üstteki eğri kontrol, ortadaki DTT, alttaki ise pCMBS uygulamasını göstermektedir). **E.** E335C mutantı (üstteki eğri kontrol, ortadaki DTT, alttaki ise pCMBS uygulamasını göstermektedir).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, S3 segmentindeki 327-335 pozisyonlarında bulunan toplam 9 aminoasit rezidüsü üzerinde noktasal mutasyon oluşturuldu ve mutant kanalların fonksiyonları elektrofizyolojik yöntemlerle ölçülerek kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Diğer bir deney grubunda, *Shaker* potasyum kanalındaki S3 segmentinin membran depolarizasyonu sırasındaki pozisyonu araştırıldı.

Süstitüe sistein rezidüleri *Shaker* K_v kanalının voltaja bağlı cevaplarında anlamlı bir değişiklik oluşturmadılar. Bu bulgu, S3 segmentindeki 327-335 pozisyonlarındaki aminoasit rezidülerinin kanal kapısının açılıp kapanması üzerinde direkt bir etkileri olmadığını telkin etmektedir. Sistein aminoasidi nötral bir aminoasittir, 333-335 pozisyonlarındaki glutamik asit rezidüleri ise negatif yüklüdürler. Sistein ile süstitüe edilen diğer aminoasit rezidüleri olan lösin, alanin, treonin ve valin aminoasitleri nötral aminoasitlerdir. Bunların sistein gibi yine nötral bir aminoasitle süstitüe edilmesi yük bakımından bir farklılık yaratmayacaktır. Ancak glutamik

asit negatif yüklü bir aminoasit olduğundan sistein süstitüsüyonu sonucu S3 segmentindeki negatif yük azalır. Bu yük değişimine bağlı olarak kanal fonksiyonunda bir değişikliğin olması beklenen bir etkiydi, çünkü Wang ve ark. K_v kanalının S4 segmentinde oluşturdukları noktasal mutasyonlar ile bazı aminoasit rezidülerini nötralize etmeleri sonucu kanal fonksiyonunda değişiklik oluştuğunu gözlemlemişlerdir (8). Çalışmamızda, benzer sonucun olmamasının nedeni, S4 segmentinin S3'den farklı olarak, normalde pozitif yüklü ve kanal poru ile direkt olarak etkileşebilen bir segment (10) olmasından kaynaklanmış olabilir.

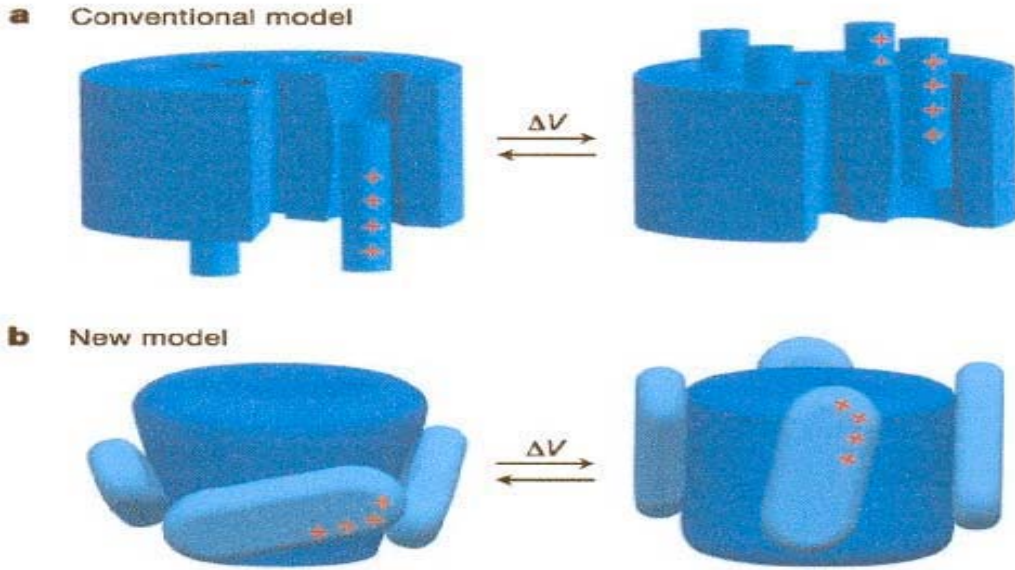
Bulgularımız, S3 segmentinin kanal kapısının açılıp kapanma fonksiyonu üzerinde direkt bir etki oluşturmadığını düşündürmektedir.

S3 segmentinin membran depolarizasyonu sırasında hareketli olup olmadığını kontrol etmek için bazı deney gruplarında pCMBS kullanıldı. Bu ajanın bazı mutant kanal akımlarında inhibisyon oluşturduğu ve bu inhibisyonun DTT (ditiotritol) ile tersine çevrildiği gözlemlendi (Şekil 4). pCMBS, sistein ile reaksiyona

girerek sisteini daha büyük hacimde ve negatif yüklü merkürbenzen-sülfonat-sistein konjüгатına dönüştürür (7). Bunun sonucunda sistein rezidüsünün mikroçevresini hem volüm hem de elektrostatik olarak etkilemesi beklenir. Çalışmamızda T329C dışındaki mutant kanalların voltaja bağlı akımları pCMBS ile inhibe oldu. Bu etkinin DTT (1 mM) tarafından tersine döndürülmesi, etkinin spesifik olduğunu ve irreversible yapı bozukluğuna neden olmadığını ve S3 segmentinin depolarizasyon sırasında ekstraselüler aralığa doğru hareket ettiğini göstermektedir (Şekil 4). Ancak, pCMBS'in neden olduğu inhibisyon dereceleri birbirinden farklıydı. Kabul gören geleneksel düşünceye göre, membrana daha yakın pozisyonda bulunan aminoasit rezidülerinin pCMBS ile daha kuvvetli bir şekilde tutulması ve dolayısı ile kanal akımını daha fazla inhibe etmesi beklenir. Ancak bu beklentiye zıt olarak çalışmamızda pozisyon olarak membranın dış yüzeyine daha uzak olan

bazı süstitüe sistein rezidülerinin daha yakın olanlara göre pCMBS ile daha fazla inhibe olduğu gözlemlendi. Örneğin L327C mutant kanalındaki akımlar T329C ve A332C'ye göre pCMBS ile daha fazla inhibe oldu (Şekil 5). Bunun nedeni muhtemelen; sanıldığı gibi aksine bu hareketliliğin düz iniş-çıkışlar şeklinde değil rotasyonel hareketler şeklinde olması büyük bir ihtimaldir. Benzer düşünceler, *Shaker* potasyum kanalının S4 segmentine yönelik yapılan çalışmalar sonucu Neale ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür (10). Bulgularımız ayrıca Jiang ve arkadaşları tarafından savunulan K_v kanalındaki segmentlerin hareketine yönelik olan hipotezi destekler niteliktedir (11; Şekil 6).

Bu çalışmada elde edilen bulguların *Shaker* K_v kanallarına yönelik planlanan, yeni ilaçların geliştirilmesi işlemlerine katkı sağlayabileceğine inanılmaktadır.



Şekil 6. Voltaja duyarlı potasyum kanallarında depolarizasyon sırasında kanal segmentlerindeki hareketlere yönelik hipotezlerin şematik ifadeleri. a) Geleneksel model. b) Yeni model (Kaynak No: 11).

Teşekkür

Yurt dışında çalışma yapmam konusunda bana her türlü desteği sağlayan merhum hocam Prof. Dr. Atilla Dikmen'e ve bölüm hocalarıma çok teşekkür ederim. Yurt dışında, Moleküler Farmakoloji ve Elektrofizyoloji alanında altyapı oluşturmamda bana her türlü ortam ve destek sağlayan başta bölüm başkanı Christopher Bowmer ve research director Asipu Sivaprasadarao olmak üzere Leeds Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Grubu'na çok teşekkür ederim.

Destek

Wellcome Trust (U.K.), British Heart Foundation, Nuffield Hastanesi (U.K.), TÜBİTAK-ESEP (Royal Society-U.K.), Çukurova Üniversitesi.

KAYNAKLAR

1. Felix R. Channelopathies: ion channel defects linked to heritable clinical disorders. *J. Med. Genet.* 2000; 37(10):729-40.
2. Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S, Berkovic SF. Channelopathies as a genetic cause of epilepsy. *Curr Opin Neurol.* 2003; 16(2):171-6.
3. Chiang CE, Roden DM. The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36(1):1-12.
4. Wedekind H, Schwarz M, Hauenschild S, Djonlagic H, Haverkamp W, Breithardt G, Wulfig T, Pongs O, Isbrandt D, Schulze-Bahr E. Effective long-term control of cardiac events with beta-blockers in a family with a common LQT1 mutation. *Clin. Genet.* 2004;65(3):233-241.
5. Yellen G. (1998) The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev. Biophys.* 1998; 31:239-295.
6. Bezanilla F. The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. *Physiol. Rev.* 2000; 80:555-592.
7. Yusaf SP, Wray D, Sivaprasadarao A. Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel. *Pflugers Arch.*, 1996;433(1-2):91-7.
8. Wang MH, Yusaf SP, Elliott DJ, Wray D, Sivaprasadarao A. Effect of cysteine substitutions on the topology of the S4 segment of the Shaker potassium channel: implications for molecular models of gating. *J Physiol.* 1999; 1(521-2):315-26.
9. Quadeer H, Aziz, Christopher J, Partridge, Tim S, Munsey, and Asipu Sivaprasadarao. Depolarization Induces Intersubunit Cross-linking in a S4 Cysteine Mutant of the Shaker Potassium Channel. *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, Issue 45, 42719-42725, November 8, 2002.
10. Neale EJ, Elliott DJ, Hunter M, Sivaprasadarao A. Evidence for intersubunit interactions between S4 and S5 transmembrane segments of the Shaker potassium channel. *J Biol Chem.*, 2003; 278(31): 29079-85.
11. Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature.* 2003 May 1; 423(6935):33-41.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Naciye YAKTUBAY DÖNDAŞ
Doğum Yeri : Adana
Doğum Tarihi : 01.05.1968
Adres : Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 01330 Balcılı / Adana
Tel. (iş) : (0322) 338 60 60 / 3239
GSM : (0542) 266 19 60
Fax : (0322) 338 65 72
E-mail : yakdas25@cu.edu.tr

Eğitim Durumu

Gazi Ü. Eczacılık Fak., Lisans, 1985-1989.
Çukurova Ü. Tıp Fak., Y. Lisans, 1990-1994.
Çukurova Ü. Tıp Fak., Doktora, 1995-2000.

İngilizce Hazırlık : Çukurova Ü. Yabancı Diller Eğt. Merk., 1990 (1 yıl).
ÜDS Başarı Notu: 90

Yurtdışı Araştırma

1. Visiting Researcher: Leeds Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Bölümü (1996-1997), Leeds-İngiltere.
2. Visiting Scientist: Leeds Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biomedical Sciences (2001), Leeds-İngiltere.
3. Visiting Scientist Fellow: Leeds Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biomedical Sciences. (2003), Leeds-İngiltere.

Burslar

1. Leeds Üniversitesi (İngiltere), 1996, 1997, 2001.
2. Nuffield Health Institute (İngiltere), 1996, 1997, 2001.
3. TÜBİTAK-ESEP (Royal Society-İngiltere), 2003.
4. Leeds Üniversitesi (İngiltere), 2003.

Ödüller

1. TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (1997).
2. TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (1999).
3. Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü tarafından takdir belgesi (2000).
4. Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü tarafından plaket (2002).
5. Üçüncülük Ödülü (Poster yarışması, 2003).
6. TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (2003).
7. TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (2003).
8. İkincilik Ödülü (Sözlü bildiri yarışması, 2004).

Yayın Listesi

I. Araştırma Projeleri

Yurtdışı Projeler

1. Production of Antibodies to the Adenosine A_{2a} Receptor C-Terminus via Recombinant DNA Techniques and PCR (Polymerase Chain Reaction), University of Leeds, Faculty of Medicine, Pharmacology Department, Leeds, UK, 1996.
2. Effect of Dietary Sodium chloride on Renal Adenosine A₁ Receptors. University of Leeds, Faculty of Medicine, Pharmacology Department, Leeds, UK, 1997.
3. Molecular Mechanism of Action of the Cardiac Delayed Rectifier Potassium Channel. University of Leeds, Faculty of Medicine, School of Biomedical Sciences, Leeds, UK, 2001.
4. K⁺ of Escherichia coli conducts potassium ions and is gated by osmolarity as well as sodium. University of Leeds, Faculty of Medicine, School of Biomedical Sciences, Leeds, UK, 2001.
5. The activity of K⁺ is regulated by osmolarity. University of Leeds, Faculty of Medicine, School of Biomedical Sciences, Leeds, UK, 2003
6. Molecular and cellular basis of diseases caused by genetic mutations in potassium channels (K_v).

University of Leeds, Faculty of Medicine, School of Biomedical Sciences, Leeds, UK, 2003.

- Investigation the movement of the voltage sensor in eukaryotic Kv channel, University of Leeds, Faculty of Medicine, School of Biomedical Sciences, Leeds, UK, 2003.
- How voltage-operated ion channels work in higher organisms at the molecular level. University of Leeds, Faculty of Medicine, School of Biomedical Sciences, Leeds, UK, 2003.

Yurtiçi Projeler

Proje Destekleri

- TÜBİTAK
- Çukurova Üniversitesi

- Kurbağa alt özofagus dairevi segmentlerinde bazı spazmolitik cisimlerin değerlendirilmesi ile ilgili bir çalışma (1992).
- İzole fare mide fundus şeritlerinin beta adrenoseptörlerinin muhtemel tabiatı üzerine bir analiz (1993).
- Kalsiyumsuz ortamda Na₂EDTA ile izole kurbağa rectus abdominis kasında oluşturulan twitch'ler üzerinde kinin ve kinidin'in etkileri (1995).
- İzole kurbağa ventrikül şeritleri üzerinde dobutamin ve izoprenalin etkileri ile ilgili bir çalışma (1995).
- Dış ortam sodyum içeriği ve kalsiyumsuz, Na₂EDTA'lı ringer ortamında gelişen kontraktür ve fazik kasılmalar (1995).
- Fare mide fundusunda ultraviyole ışığı tarafından indüklenen fotogeşmelerin ve nitrik oksidin muhtemel katkısının bazı özellikleri (1996).
- Eritromisin A'nın yeni oksim eter türevlerinin sentezi ve antibakteriyel tayinleri (1996).
- Oksim ve O-benzil eter yapılarından sentezlenen N-heterosiklik bileşiklerin sentezi ve antibakteriyel tayinleri (1997).
9. Kurbağa rektus abdominis kasındaki sodyum kanallarının twitch oluşumu üzerindeki etkileri (1997).
- Fare gastrik fundusunda nitrik oksid'in Na⁺-K⁺-ATPaz üzerindeki muhtemel etkileri (1999).
- Fare duodenumunda nitrik oksid donörlerinin nitrejik sistem üzerindeki etkileri (2001).
- Kurbağa abdominal iskelet kasında neomisin kalsiyum kanalları üzerindeki etkisi (2001).
- Fare özofagusu ile kurbağa rektus abdominis kasılmalarının karşılaştırılması (2002).
- Fare korpus kovernosumunda bakteriyel lipopolisakkarit tarafından oluşturulan nörojenik ve endotelial gevşeme bozukluklarında melatonin'in etkisi (2002).
- Fare duodenumundaki spontan kasılmalar üzerinde nitrik oksid'in muhtemel etkileri (2002).
- Fare mesane detrusor kasında bazı metal iyonların ve bazı sülfüdril bileşiklerin ryanodin reseptörleri üzerindeki etkisi (2002).
- Farelerde alkol bağımlılığında görülen hiperalejide glutamaterjik ve opioiterjik sistemlerin muhtemel rolü (2003).
- Sıçan torasik aortasındaki glutatyon peroksidaz üzerinde homosistein'in muhtemel etkileri (2003).

- Fare gastrik fundusunda ultraviyole ışığı ile oluşturulan gevşemelerin karakterize edilmesi (2003).

II. Araştırma Makaleleri

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- Öğülener N., Yaktubay N., Büyükaşar K., Dikmen A. and Baysal F. Some Properties of The Photorelaxation Induced by UV Light and Possible Contribution of Nitric Oxide in The Isolated Mouse Gastric Fundal Smooth Muscle. *Asia Pac. J. Pharmacol.*, 11, 109-120 (1996).
- Seçilmiş A., Atçı Ş., Yaktubay N., Karataş N., Göçmen C., Şingirik E., Dikmen A. and Baysal F. The Role of Na⁺ Channels in Twitch Generation During Exposure of The Frog Rectus Abdominis to Ca-Free Ringer Solution with Na₂EDTA. *Acta Med. Okayama*, 51(3), 115-120 (1997).
- Yaktubay N., Öğülener N., Önder S. and Baysal F. Possible Stimulation of Na⁺-K⁺-ATPase by NO Produced from Sodium Nitrite by Ultraviolet Light in Mouse Gastric Fundal Strip. *Gen. Pharmacol.*, 32(1), 159-162 (1999).
- Smith J.A., Whitaker E.M., Yaktubay N., Morton M.J., Bowmer C.J. and Yates M.S. Regulation of Renal Adenosine A₁ Receptors: Effect of Dietary Sodium Chloride. *Eur. J. Pharmacol.*, 384, 71-79 (1999).
- Öğülener N., Ergün Y., Döndaş N. and Dikmen A. The Influence of Nitric Oxide Donors on The Responses To Nitrenergic Nerve Stimulation in The Mouse Duodenum. *Eur. J. Pharmacol.*, 421, 121-131 (2001).
- Döndaş H.A. and Yaktubay N. Synthesis of Two and Antibacterial Activity of One Novel Oxime Ether Derivatives of Erythromycin A. *Il Farmaco*, 58, 1011-1015, (2003).
- Döndaş HA, Yaktubay N. N-Heterocycles from Oxime and O-Benzyl Ethers via Electrophile Induced-Ring Formation. Route to Cyclic and Bicyclic Amine and Hydroxylamine. *Heterocyc. Commun.*, 9(4), 337-344, (2003).
- Döndaş N., Karataş Y. and Dikmen A. Characterization of Nicotinic Cholinergic Receptors. *Indian J Pharmacol*, Baskıda (2004).
- Döndaş N., Karataş Y., Kumcu E., and Dikmen A. Possible Interactions Between Neomycin and Calcium Channels in Abdominal Skeletal Muscle, *Asia Pac. J. Pharmacol.*, Baskıda (2004).
- Dondas N. A Semi-Quantitative Method For The Estimation of Adenosine A₁ Receptor mRNA Levels in Rat Kidney. *Indian J Pharmacol*, Baskıda (2004).
- Eda Karabal Kumcu, H.Sinem Göktürk Büyüknacar, Olcay Ergürhan Kiroğlu, Cemil Göçmen, Naciye Yaktubay Döndaş and Atilla Dikmen. Effect of melatonin on impaired neurogenic and endothelial relaxations by bacterial lipopolysaccharide in the mouse corpus cavernosum. *Pharmacol.*, Baskıda (2004).
- Dondas N. Adenosine A_{2a} Receptors: Determination of the Optimal Conditions for Amplification, Cloning and Protein Expression. *Indian J Pharmacol*, Revize edildi (2004).

13. Munsey T.S., Döndaş N., Aziz Q.H. and Sivaprasadarao A. The Activity of Kch, an Escherichia coli Homologue of Eukaryotic Potassium Channels, is Regulated by Osmolarity. Mol. Memb. Biol., Revize edildi (2004).
14. Döndaş N. Adanosine and its receptors. Indian J. Pharmacol., Revize edildi (2004).

Ulusal Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Dikmen A., Şingirik E., Önder S., Yaktubay N., Erden F. ve Baysal F. Kurbağa Alt Özofagus Dairevi Segmentlerinde Bazı Spazmolitik Cisimlerin Değerlendirilmesi ile İlgili Bir Çalışma. Ç. Ü. Sağlık Bil. Derg., 7(1,2,3), 109-119 (1992).
2. Büyükafşar K, Göçmen C, Yaktubay N, Şingirik E., Önder S., Dikmen A. ve Baysal F. İzole Fare Mide Fundus Şeritlerinin Beta Adrenoseptörlerinin Muhtemel Tabiatı Üzerine Bir Analiz. Ç. Ü. Sağlık Bil. Derg., 8(1,2,3), 53-73 (1993).
3. Dikmen A., Yaktubay N., Baysal F., Karataş Y., Şingirik E. ve Önder S. Kalsiyumsuz Ortamda Na₂edta ile İzole Kurbağa Rectus Abdominis Kasında Oluşturulan Twitch'ler Üzerinde Kinin Ve Kinidin'in Etkileri. Ç. Ü. Tıp Fak. Derg., 20, 199-206 (1995).
4. Göçmen C, Yaktubay N, Dikmen A., Şingirik E., Önder S. ve Baysal F. İzole Kurbağa Ventrikül Şeritleri Üzerinde Dobutamin Ve İzoprenalin Etkileri ile İlgili Bir Çalışma. Ç. Ü. Tıp Fak. Derg., 20, 207-213 (1995).
5. Göçmen C., Yaktubay N, Dikmen A. and Baysal F. Dış Ortam Sodyum İçeriği ve Kalsiyumsuz, Na₂edta'lı Ringer Ortamında Gelişen Kontraktür ve Fazık Kasılmalar. Ç. Ü. Tıp Fak. Derg., 20, 249-256 (1995).
6. Döndaş N. Adenozin Reseptörleri ve Rekombinant DNA Teknikleri. (Arşiv dergisi, Baskıda), 2004.

III. Bildiriler

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. J.A. Smith, N. Yaktubay, M.J. Morton, C.J. Bowmer, A. Sivaprasadarao and M.S. Yates The Effect of Dietary Sodium on Renal Adenosine A₁ Receptors in The Rat. International Coverage of All Aspects of Pharmacology, London, British Journal of Pharmacology, Vol. 123, 285P, 1998.
2. N. Ögülener, N. (Yaktubay) Döndaş, and A. Dikmen. Effects of Nitric Oxide-Releasing Substances on Nitrgergic Relaxations Induced by Electrical Stimulation And Acidified NaNO₂ In Mouse Duodenum. International Conference, Nitric Oxide: Peripheral & Central Actions, Antalya, P04, 1998.
3. H.A. Döndaş, R. Grigg, N. Yaktubay, S. Yıldız And F.Gümüş. Synthesis and in vitro Antibacterial Activity of An Oxime Ether Derivate of Erythromycin A. Second International Meeting on Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, Istanbul, 122, 1998.
4. N. Ögülener, Yaktubay N and Dikmen A. Inhibition By Nitroglycerin and Sodium Nitroprusside of Nerve-Mediated Nitrgergic Relaxation In The Mouse Duodenum. 2nd European Congress of

- Pharmacology, Budapest, Fundamental & Clinical Pharmacology, Vol. 13(1), Pt150, 1999.
5. Munsey T.S., Aziz Q, Dondas N., Sivaprasadarao A. The E. Coli Potassium Channel, Kch, Is Activated by Hypo-Osmolarity. 3rd FEPS (Federation of European Physiological Societies) Congress. Nice / France, P12-05, 2003.
6. N. Yaktubay Döndaş, N. Ögülener. Possible Effects of Nitric Oxide on Spontaneous Contractions in Isolated Mouse Duodenum. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of the Turkish & Dutch Pharmacological Societies, P39, Antalya, (2003).
7. N. Ögülener, N. Yaktubay Döndaş. Influence of Superoxide Anion Generators and Antioxidants on Nitrgergic, Ultraviolet Light and NO-Induced Relaxation in Mouse Gastric Fundus. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of the Turkish & Dutch Pharmacological Societies, P41, Antalya, (2003).
8. F. Aksu, İ. Yalçın, N. Yaktubay, S.Y. İnan. Possible Contribution of Glutamergeric and Opiatergeric Systems on Hyperalgesia Induced by Chronic Ethanol Consumption. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of the Turkish & Dutch Pharmacological Societies, P139, Antalya, (2003).
9. Ögülener N., Döndaş N. Photodegradable NO-yielding Store Might Localize at Prejunctional Site. European Congress of Pharmacology, (EPHAR), Oporto/Portugal, 2004 (Abstract gönderildi).
10. Yaktubay Döndaş N., Ögülener N. Effect of Nitric Oxide on Mouse Duodenal Motility
11. European Congress of Pharmacology, (EPHAR), Oporto/Portugal, 2004 (Abstract gönderildi).
12. Yaktubay Döndaş N., Karataş Y., Dikmen A. Effects of Neuromuscular Blocking Agents in Two Different Tissues and Species. European Congress of Pharmacology, (EPHAR), Oporto/Portugal, 2004 (Abstract gönderildi).

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. N. Ögülener, N. Yaktubay, K. Büyükafşar, A. Dikmen, F. Baysal. İzole Fare Mide Fundus Preparatında Ultraviyole Işığı ile Oluşan Gevşemelerde Nitrik Oksid'in Muhtemel Katkısı. XIII. Ulusal Farmakoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), N06, Antalya (1996).
2. N. Yaktubay, N. Ögülener, S. Önder, F Baysal. İzole Fare Gastrik Fundal Striplerinde Ultraviyole Işığı Tarafından Salınan NO ile Na⁺-K⁺-ATPaz'ın Stimülasyonu. XIV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 100, Antalya, (1997).
3. S. Gökürk, N. (Yaktubay) Döndaş, C. Göçmen, P. (Uçar) Ertuğ, S. Önder. İzole Fare Korpus Kavernozum Dokusunda Nitrerjik Gevşemelerde Selektif Cu(1) Şelatörü olan Neocuproine'nin Etkisi. XV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, P04-03, Antalya, (1999).
4. O. Ergürhan Kiroğlu, E. Karabal Kumcu, S. Büyüknacar, C. Göçmen, S. Polat, N. Yaktubay

Döndaş, M. Kaya, A. Dikmen. Fare Korpus Kavernozumunda Bakteriyel Lipopolisakkaridle Azalan Nörojenik ve Endotelial Gevşeme Üzerine Melatoninin Etkisi. 2. Ulusal Deneysel Cerrahi Kongresi, P01, Ankara, (2003) (Bu çalışma poster yarışmasında üçüncülük ödülü aldı).

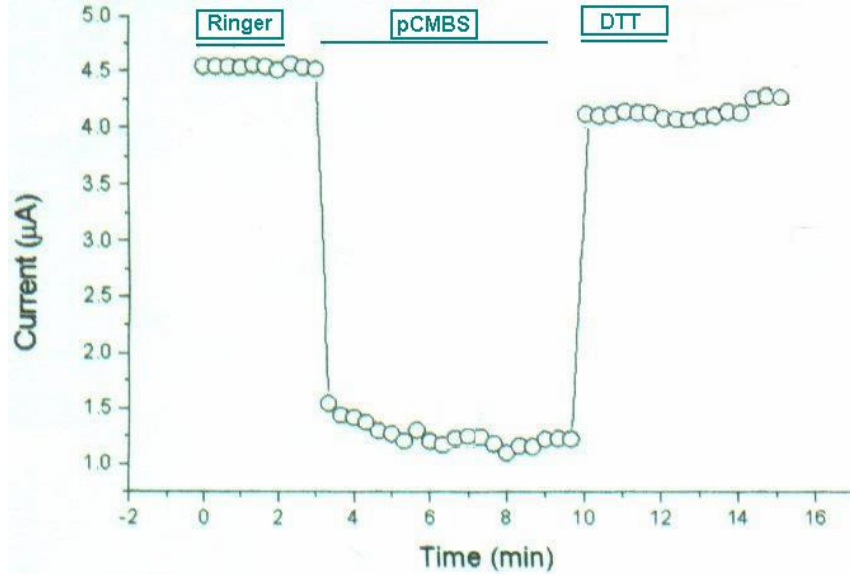
Ulusal Kongrelerde Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Sözlü Bildiriler

1. N. Yaktubay Döndaş, Y. Karataş, A. Dikmen. Fare Özofagus ve Kurbağa Rektus Abdominis Kaslarındaki Nikotinik Kolinergic Reseptörlerin Karşılaştırılması. II. Ulusal Tıp Mezunları Kongresi. B13, Adana, (2004)
2. N. Yaktubay Döndaş, C.J. Bowmer. Sıçan Böbreğinde Adenozin A₁ Reseptör mRNA

Seviyesinin Ölçülmesine Yönelik Yeni Bir Metod. II. Ulusal Tıp Mezunları Kongresi. B16, Adana, (2004) (Bu çalışma, sözlü bildiri yarışmasında ikincilik ödülü aldı).

Diğer Bilimsel Aktiviteler

1. Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Sempozyumu. (Katılım), Kayseri, (1998).
2. I. Ulusal Tıp Mezunları Kongresi ve Uygulamalı Temel Yaşam Desteği Kursu. (Katılım), Adana, (2002).
3. Avrupa Birliği Araştırma ve Teknolojik Gelişme için Altıncı Çerçeve Programı (European Research-FP6)'na sunulan projelerin hazırlanmasına katkı sağlamak (2003, 2004).



Şekil 4. Mutant (E333C) *Shaker* K_v kanalının aktivasyonu üzerinde pCMBS (100 µM) ve DTT (1 mM)'nin etkileri. pCMBS: parakloromerküribenzen sülfonat. DTT: Ditiotreitol.