156681

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEMELİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ATP UYGULAMASI İLE OLUŞAN KUANTAL KALSİYUM SALINIMINDA SERCA'NIN ROLÜ

Figen AMBER

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç.Dr. Mehmet UĞUR

Bu tez AnkaraÜniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü Tarafından 2003-08-09-101 proje numarası ile desteklenmiştir.

2004-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyofizik Yüksek Lisans **Programı**

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/07/2004

Prof. Dr. Belma Turan
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ongun ONARAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Nuhan PURALI
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Mehmet UĞUR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Özlem UĞUR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Raportör

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
1. GİRİŞ	1
1.1. G Proteini Kenetli Reseptörler Aracılığı İle Oluşan Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Ana Hatları	1
1.1.1. Bir Hücre İçi Haberci Olarak Ca^{2+} ve Önemi	1
1.1.2. G Protein Kenetli Reseptörler ve heterotrimerik G Proteinleri	3
1.1.3. İnositol 1,4,5-trisfosfat (IP_3) ve PLC	4
1.1.4 Kalsiyumun IP_3 Reseptörleri Üzerinde Aktive ve İnhibe Edici Etkisi	7
1.2. Kuantal Kalsiyum Salınımı	8
2. GEREÇ VE YÖNTEM	11
2.1. Kültür Hücrelerinin Büyütülmesi	11
2.2. Hücrelerin Fura-2 ile Yüklenmesi	11
2.3. Hücre İçi Ca^{2+} Derişiminin Ölçülmesi	12
3. BULGULAR	16
4. TARTIŞMA	35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
ÖZET	42
SUMMARY	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	46

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı. Öğretim Üyeleri ile Araştırma Görevlilerine, ayrıca Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Teknolojileri AR-GE Birimine ve Sevgili Aileme teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
ATP	Adenozin trifosfat
CCDI	Charge Coupled Device Intensifying (Yük Çiftlenim Şiddetlendiricisi)
CICR	Calcium Induce Calcium Release (Kalsiyum İndüklü Kalsiyum Salınımı)
CPA	Siklopiazonik Asit
DAG	Diaçilgliserol
ER	Endoplazmik Retikulum
FCS	Fetal Kalf Serum
GDP	Guanozin difosfat
GPCR	G-Protein Kenetli Reseptörleri
GTP	Guanozin trifosfat
IP_3	İnositol 1,4,5-trisfosfat
PIP_2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PKC	Protein Kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
PMCA	Plazma Membran Ca^{2+} ATPaz
RYR	Ryanodin Reseptörü
ROI	Region of Interest (Ölçüm için işaretlenen bölgeler)
SERCA	Sarkoplazmik-Endoplazmik Retikulum Ca^{2+} ATPaz
UTP	Uridin Trifosfat
$[Ca^{2+}]_i$	Sitoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonu
7-TM	7-Trans Membran

1. GİRİŞ

1.1. G PROTEİNİ KENETLİ RESEPTÖRLER ARACILIĞI İLE OLUŞAN HÜCRE İÇİ KALSİYUM SİNYALİNİN ANA HATLARI

1.1.1. Bir Hücre İçi Haberci Olarak Ca^{2+} ve Önemi

Hücre dışından gelen sinyallerin bir çoğu hücre içinde, sitoplazmik serbest Ca^{2+} derişiminin ($[Ca^{2+}]_i$) artışına neden olur. Ca^{2+}'un sitozoldeki konsantrasyonunun oldukça düşük ($\approx 10^{-7}$M), hücre dışı sıvıdaki ($\approx 10^{-3}$M) ve endoplazmik retikulumdaki (ER) konsantrasyonunun ise yüksek olmasından dolayı, bir çok hücrede Ca^{2+} bir hücre içi sinyal molekülü olarak kullanılır. Ca^{2+}'u, plazma ve ER membranlarından sitozole doğru iten büyük bir elektro-kimyasal gradiyent nedeni ile plazma ve ER membranlarında bulunan Ca^{2+} kanallarının geçici olarak açılmasını sağlayacak bir sinyal, Ca^{2+}un hızla sitozole akmasına ve sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunun 10-20 kat artmasına neden olur. Böylece hücre içinde bulunan Ca^{2+}'a duyarlı proteinlerin aktive olması ve hücrenin belli bir fonksiyonu yerine getirmesi sağlanır. Örneğin kas hücrelerinde kasılma, salgı ve sinir hücrelerinde degranülasyon gibi olayların tetiklenmesinde Ca^{2+} kilit rol oynamaktadır.

Hücre içinde sitoplazmik serbest Ca^{2+} derişiminin kontrolünde esas rol oynayan üç oyuncudan bahsetmek mümkündür.

I- Ca^{2+} Kanalları

Bu iyon kanalları Ca^{2+} un plazma ve ER membranlardan geçişini sağlarlar ve esas olarak üç tipe ayrılabilirler:

1. **Voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları.** Plazma membranında bulunurlar. Membranın depolarizasyonu ile açılarak Ca^{2+} girişini sağlarlar. Ca^{2+}'a

seçicilik gösteren bu kanallar örneğin sinir son ucundan nörotransmitter salınmasında çok önemli bir rol alırlar.

2. **IP_3 ve Ryanodin Reseptörleri.** Bu reseptörler ER membranında yerleşmiş multimerik proteinlerdir ve yapıca birbirlerine akraba iki protein ailesi oluştururlar. İnositol 1,4,5-trisfosfat (IP_3) ER membranında yerleşmiş olan IP_3 reseptörlerine (IP_3R) bağlanır ve bu reseptörün bir parçası olan iyon kanalını aktive eder. Bunun sonucunda ER'den sitoplazmaya Ca^{2+} çıkışı gerçekleşir. Ryanodin Reseptörleri (RYR) ise ya plazma membran potansiyelindeki değişimden voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları aracılığı ile etkilenerek (iskelet kasında olduğu gibi), ya da sitoplazmik tarafa bakan bölgelerine bağlanan Ca^{2+}'un aktive etmesi sonucu açılırlar ve ER'den Ca^{2+} salınmasını sağlarlar. Bu kanallar bir alkaloid olan ryanodin tarafından önce aktive daha sonra ise bloke edilebildikleri için bu ismi almışlardır.

3. **Katyon kanalları.** Bu kanallar kendilerine bağlanan bir ligand ile doğrudan aktive olabildikleri gibi (Nikotinik ACh reseptörleri) transmembran potansiyel değişimleri gibi başka uyarılarla da aktive olabilirler. Bu kanallar Ca^{2+} iyonlarının yanı sıra diğer katyonlara da geçirgendirler.

II- Hücre İçi Ca^{2+} Depoları

Tüm ökaryotik hücrelerdeki ortak hücre içi kompartımanlardan biri olan ER, hücre alanının neredeyse yarısını kaplayarak, hücre içini tübüller ve keseciklerle bir ağ benzeri labirent gibi kaplar. ER membranı bu tübüller ve kesecikleri çevreleyerek ER lümenini sitozolden ayırır, seçici geçirgenlik gösteren bir bariyer oluşturur. ER Ca^{2+} iyonları için bir depo görevi görür. Bununla birlikte ER hücredeki lipit ve protein biyosentezinde de önemli bir rol oynar. ER, Ca^{2+}'u bağlayarak bu iyonun intraluminal konsantrasyonunu azaltan ve böylece Ca depolama kapasitesini arttıran kalsekestrin ve kalretikulin gibi Ca^{2+} bağlayan proteinler de içerir.

III- Ca^{2+} Taşıyan Pompa ve Değiş-tokuşçular

Bu başlık altında, salınan Ca^{2+}'u depoya geri alan ER membranında yerleşmiş Ca^{2+}ATPaz (SERCA; Sarkoplazmik/Endoplazmik Retikulum Ca^{2+}ATPaz), sitoplazmik Ca^{2+}'u hücre dışına taşıyan, plazma membranında yerleşmiş Ca^{2+}ATPaz (PMCA; Plasma Membrane Ca^{2+}ATPase) ve yine plazma membranında yerleşmiş bulunan Na^{+}-Ca^{2+} değiş-tokuşçusu sayılabilir.

Hücrede $[Ca^{2+}]_i$ regülasyonu kabaca şu şekilde gerçekleşir; IP_3 yapımında bir artış yada plazma membranı yoluyla sitoplazmaya Ca^{2+} girişine neden olan bir uyarı, IP_3 ya da ryanodin reseptörlerini uyararak ER dan sitoplazmaya Ca^{2+} salınmasına yol açar. Bunun sonucunda $[Ca^{2+}]_i$ artar, sitoplazmadaki Ca^{2+}, SERCA, PMCA ve Na^{+}-Ca^{2+} değiş-tokuşçusu aktivitesi ile hücre dışına ve ER'ye taşınır ve bu sayede $[Ca^{2+}]_i$ tekrar dinlenim durumuna döner (Şekil 1.1).

IP_3 ve ryanodin duyarlı Ca^{2+} depolarının dağılımları hücreden hücreye değişim gösterirler. Bazı hücrelerde yalnızca ryanodin duyarlı depolar (iskelet kası) veya yalnızca IP_3 duyarlı depolar (*Xenopus* oositleri) bulunurken, bazı hücrelerde her ikisine de duyarlı depolar bulunmaktadır (atriyal hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, nöronlar ve kromaffin hücreler gibi).

1.1.2 G Protein Kenetli Reseptörler ve Heterotrimerik G Proteinleri

Hücre yüzeyinde bulunan reseptör ailesinin en geniş üyelerini G protein kenetli reseptörler (GPCR) oluşturur. Bu reseptörler tüm ökaryotlarda bulunurlar. Yalnızca memelilerde binlercesi tanımlanmıştır; örneğin farenin yalnızca koku duyusu ile ilgili yaklaşık 1000 tane GPCR bulunmaktadır. G protein kenetli reseptörler, hormon, nörotransmitter ve lokal mediatörleri kapsayan çok çeşitli sinyal molekülünün yanıtlarına aracılık eder. Aynı ligand farklı reseptör ailelerinin üyelerini aktive edebilir; örneğin adrenalin en az 9 ayrı tip GPCR aktive ederken, asetilkolin 5, bir diğer nörotransmitter olan serotonin ise en az 15 farklı GPCR aktive edebilir.

Kendilerine bağlanan sinyal molekülünün kimyasal ve fonksiyonel farklılıklarına rağmen, tüm G protein kenetli reseptörlerin temel yapıları birbirlerine benzer: Tek bir polipeptit zincirinin, lipit çift tabakayı bir iplik gibi ileri geri yedi defa geçmesinden dolayı yedi transmembran bölgeli (7-TM) reseptörler olarak da adlandırılırlar. GPCR'lerin, hormon vd. ligandların bağlandığı, bir hücre dışı bölgesi ve G-proteinleri ile ilişkiyi sağlayan bir intraselüler bölgesi vardır.

GPCR'ye hücre dışından gelen sinyal molekülü bağlandığında reseptör yapısal bir değişikliğe uğrar ve **trimerik GTP-bağlayan proteinlerini (G proteinleri)** aktive eder. G proteinleri, plazma membranının sitoplazmik yüzüne tutunmuş proteinler olup GPCR ile aktive ettiği enzimlere veya iyon kanallarına kenetlenmesini sağlayan bir röle gibi davranırlar. Tüm G proteinleri benzer yapıdadırlar ve benzer şekillerde çalışırlar. Ancak her biri reseptörüne ve hedef proteinlerine göre özelleşmiş çok çeşitli tipte G proteini bulunur.

G Proteinleri; α, β ve γ olmak üzere üç protein alt ünitesinden oluşur. Uyarılmamış durumda α alt ünitesine GDP bağlıdır ve G proteini inaktif durumdadır. Reseptör aktivasyonu ile uyarıldığında α alt ünitesi kendisine bağlı halde bulunan GDP'yi salarak, yerine GTP'nin bağlanmasını sağlar. Bu değişim, trimerin aktive olmuş α alt ünitesi ve βγ kompleksinden oluşan iki parçaya ayrılmasını sağlar. Trimerik G proteininin ayrılan iki parçası farklı farklı hedef proteinleri aktive edebilirler (Alberts ve ark., 2002).

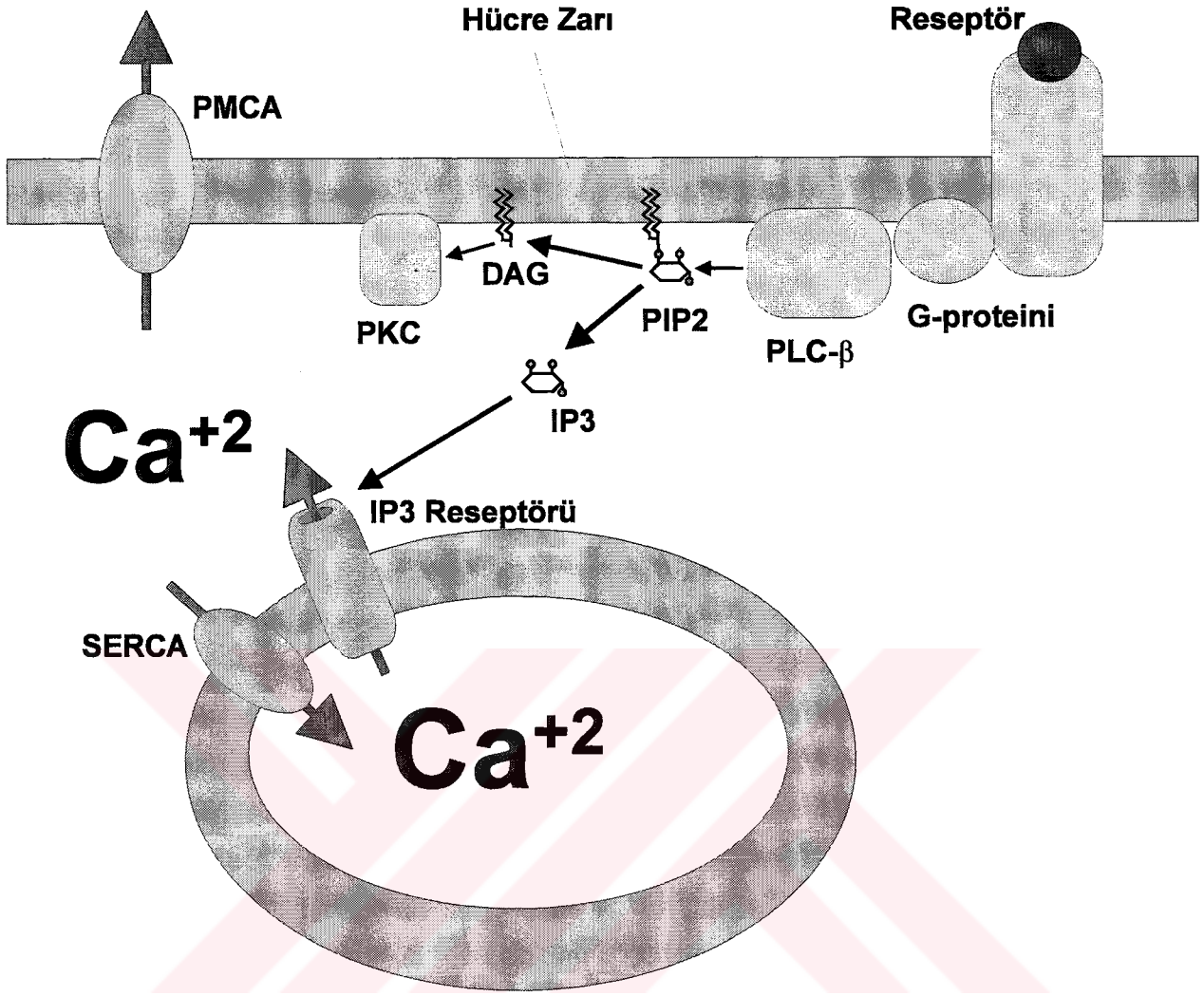
1.1.3. IP_3 ve Fosfolipaz C

Bazı G proteini kenetli reseptörler, etkilerini plazma membranına bağlı bir enzim olan fosfolipaz C-β'yı (PLC- β) aktive eden G proteinleri aracılığıyla gösterirler. Fosfolipaz C (PLC), fosfatidilinositol 4,5-bifosfat ($PI(4,5)P_2$) olarak adlandırılan ve lipit çift tabakanın hücre içine dönük yarısında az miktarda bulunan bir fosfolipide etki eder. Bu inositol fosfolipit sinyal yolunu kullanan GPCR'ler genel olarak bir G proteini çeşidi olan G_q üzerinden PLC-β'yı aktive ederler. Aktifleşen PLC,

$PI(4,5)P_2$'yi iki kısma ayırır: IP_3 ve diaçilgliserol (DAG). Bu noktadan itibaren sinyal yolu da iki kola ayrılır. Küçük, suda çözünebilen bir molekül olan IP_3, plazma membranından ayrılarak sitozole doğru hızla yayılır. ER'ye ulaştığında IP_3-kapılı Ca^{2+} kanallarına bağlanır (IP_3 reseptörü: IP_3R) ve kanalın açılmasını sağlar. ER'de depolanan Ca^{2+}, kanalların açılmasıyla birlikte sitoplazmaya salınmaya başlar ve sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonu hızla artar. Oluşan Ca^{2+} yanıtının sonlandırılması bazı mekanizmalar yardımı ile olur: (1) Özel fosfatazların yardımı ile IP_3 hızla IP_2'ye defosforile edilir. (2) IP_3 başka bir hücre içi haberci olduğu düşünülen IP_4'e fosforile edilir. (3) Sitozole giren Ca^{2+}, PMCA (Plazma Membran Ca^{2+}ATPaz) tarafından hızla dışarı atılırken, SERCA tarafından da ER'ye geri alınır (Bkz. bir üst bölüm).

$PI(4,5)P_2$'nin hidrolizi ile üretilen IP_3 hücre içi Ca^{2+} derişimini arttırırken, eş zamanlı olarak $PI(4,5)P_2$'nin diğer parçası olan DAG bir serine/threonine protein kinaz olan protein kinaz C'yi (PKC) aktive eder (Alberts ve ark., 2002).

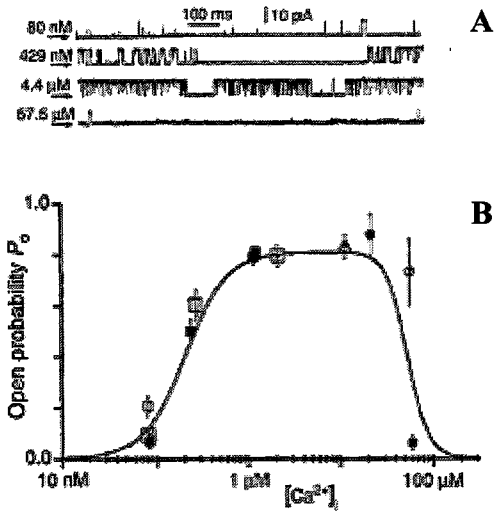
Bu kinaz pek çok hücre içi proteini fosforile ederek bu proteinlerin aktivasyonunu sağlar ve hücrenin fonksiyonu açısından geniş erimli etkilere neden olur. Aktifleşen PKC sitozolden hücre membranına yer değiştirir ve hücre tipine göre değişen çeşitli hedef proteinleri fosforile eder (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Hücrede $[Ca^{2+}]_i$ regülasyonunda rol alan temel mekanizmalar. GPCR ve ardından G proteini aracılığı ile aktive olan PLC, PIP_2'yi IP_3'e ve DAG'a ayırır. Bu noktadan itibaren sinyal yolu da iki kola ayrılır. IP_3, plazma membranından ayrılarak sitozole doğru hızla yayılır. ER'ye ulaştığında IP_3 reseptörüne bağlanır ve kanalın açılmasını sağlar. ER'de depolanan Ca^{2+}, kanalların açılmasıyla birlikte sitoplazmaya kimyasal gradient yönünde salınmaya başlar ve sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonu hızla artar. $[Ca^{2+}]_i$'nundaki artış SERCA aracılığı ile ER'ye, PMCA ve Na-Ca değiş-tokuşcusu ile de hücre dışına taşınır. Bu sayede $[Ca^{2+}]_i$ tekrar dinlenim durumuna döner.

1.1.4 Kalsiyumun IP_3 Reseptörleri Üzerinde Aktive ve İnhibe Edici Etkisi

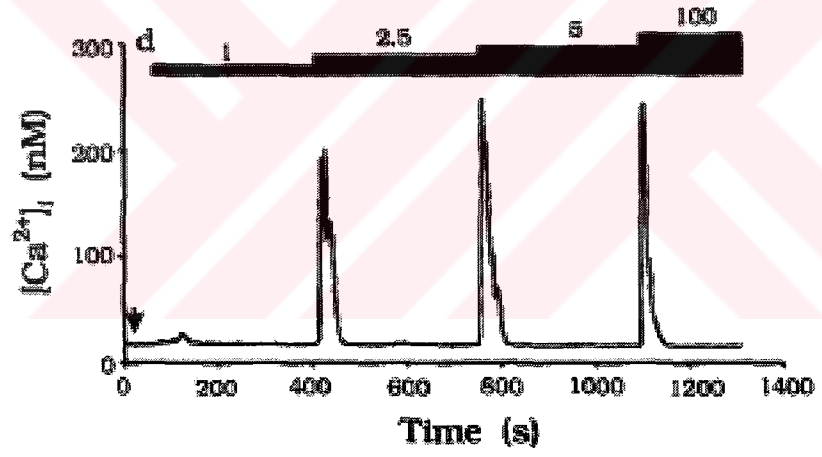
RYR ve IP_3R'lerinin yapısal ve moleküler benzerlikleri kalsiyuma duyarlılık gibi fonksiyonel özelliklerine de yansır. Örneğin her kalp atımı Ca^{2+} indüklü Ca^{2+} salınımının (Calcium Induce Calcium Release-CICR) rejeneretif oluşumu ile sürdürülür. Voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarından geçen küçük bir Ca^{2+} akımı, sarkoplazmik retikulumda depolanmış olan kalsiyumun RYR aracılığı ile salınımında tetikleyici bir görev üstlenir. Ca^{2+}'un kendi salınımını tetiklemesi ile oluşan bu pozitif geri besleme mekanizması, RYR'lerinde oluştuğu gibi IP_3R'lerinde de gözlenir (Berridge, 1993). İzole IP_3R'lerinin aktivitesinde sitozolik Ca^{2+}'un ikili bir etkisi olduğu, düşük derişimlerde sitozolik Ca^{2+} ile konsantrasyona bağımlı olarak aktive olan IP_3R'nin daha yüksek derişimlerdeki Ca^{2+} tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu ikili etki hem izole IP_3R'lerinde tek kanal aktivitesinde, hem de membranları delinmiş (permeabilize hale getirilmiş) hücrelerde depolardan $^{45}Ca^{+2}$ salımında görülmektedir (Finch ve ark., 1991; Bezprozvanny ve ark., 1991; Iino ve Endo 1992; Combettes ve ark. 1994; Mak ve ark.,1998). Bu ikili etkiyi açıklamak için reseptör proteininin üzerinde farklı afinitelere sahip iki ayrı Ca^{2+} bağlanma bölgesi olduğu bunlardan birinin aktivasyondan diğerinin ise inhibisyondan sorumlu olduğu iddia edilmiştir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 A. Çeşitli sitoplazmik $[Ca^{2+}]$'larında IP_3Rleri için tek kanal akım kayıtları. **B.** Sitoplazmik solüsyondaki farklı $[Ca^{2+}]$'ı için IP_3Rlerinin açılma olasılıklarının değişimi. (Mak ve ark., 1998)

1.2. KUANTAL KALSİYUM SALINIMI

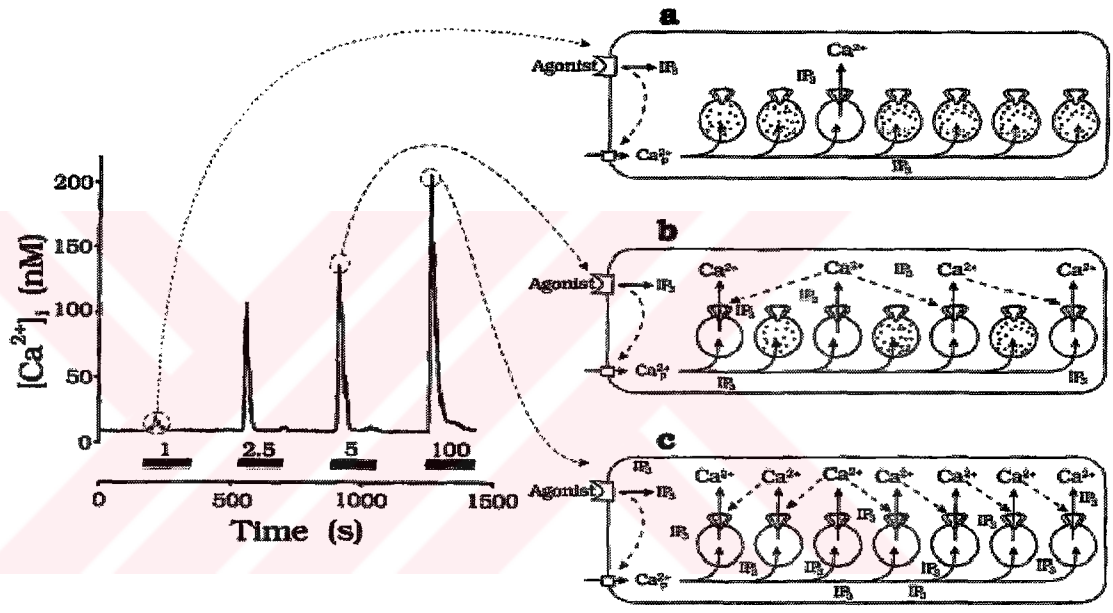
IP_3R'lerinin IP_3 ile uyarımları devam ettiği sürece Ca^{2+} salmaya devam edecekleri, bunun sonucu olarak da depolardaki tüm kalsiyum bitene kadar Ca^{2+} salınımının süreceği beklenir (hep ya da hiç salınım). CICR mekanizmasının varlığı da bu beklentiyi güçlendiren bir bulgudur. Ancak bir çok hücre tipinde, hem IP_3 hem de ryanodin reseptörlerinin kuantal (kademeli) kalsiyum salınımı gerçekleştirdikleri gözlenmiştir. Kuantal kalsiyum salınımı; sabit agonist uyarımı (ya da RyR için kafein uygulaması) neticesinde hücre içi kalsiyum depolarındaki Ca^{2+}'un yalnızca bir bölümünün sitoplazmaya çıkması ve uyarımın devam etmesine rağmen daha fazla kalsiyum salınımı gözlenmemesidir (Bootman ve ark., 1994). Ancak uyarının şiddeti arttırılır ise depolardan ikinci bir salınım gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. IP_3 aracılı kuantal Ca^{2+} salınımına bir örnek: Tek bir HeLa hücresinin ardışık uygulanan histamin ile oluşturduğu kuantal Ca^{2+} salınımı. Şeklin üst kısmında görülen koyu çizgiler histaminin uygulanma süresi ve dozunu göstermektedir (Bootman ve ark., 1994).

Bu fenomen membranları permeabilize hücrelerde ve intakt hücrelerde ayrı ayrı gözlenmiştir. Membranları permeabilize edilmiş hücrelere IP_3 dışarıdan eklenmiş ve konsantrasyonu sabit tutulmuştur. Bu koşullarda da kuantal kalsiyum salınımının oluştuğu dolayısı ile salınımı sınırlayan mekanizmanın IP_3 yapımındaki azalma

olmadığı düşünülmüştür (Berridge, 1993). Ayrıca doğrudan RyR uyarmak için kullanılan kafein de dışarıdan ve sabit derişimlerde uygulanmaktadır. Bu şekilde sabit bir uyarı ile Ca^{2+}'un, nasıl olup da kademeli salınım gerçekleştirdiğini açıklamak amacı ile çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. İlk olarak Muallem ve ark. (1989), hücre içi Ca^{2+} depolarının, IP_3 duyarlılıkları farklı, birbirlerinden bağımsız ünitelerden oluştuğunu önerdiler. Bu model, kuantal kalsiyum salınımını, bu bağımsız ünitelerin IP_3 duyarlılıklarına göre farklı şiddetteki uyarılar ile depoladıkları Ca^{2+}'u tamamen boşaltmalarının sonucu olarak izah eder (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Hücre içi Ca^{2+} depoları, bağımsız üniteler gibi davranarak, duyarlılıklarına göre değişik agonist konsantrasyonlarında yanıt verirler. Ca^{2+} depoları, Ca^{2+}'un difüzyonu sayesinde birbirleri ile fonksiyonel olarak kenetlidir (Bootman ve ark.,1994).

Kuantal kalsiyum salınımını açıklamaya çalışan bir diğer hipotez ise, sitoplazmadaki Ca^{2+}'un ya da luminal kalsiyumun azalmasının yarattığı negatif geri besleme etkisi nedeni ile ER'den çıkışının durmasına dayanır. İleri sürülen bu mekanizmaya göre agonist uyarımı sonucunda $[Ca^{2+}]_i$ maksimum değerine ulaştığında Ca^{2+} IP_3R'lerini inhibe eder ve Ca^{2+} salınımını engeller (Iino ve Endo 1992, Petersen ve ark., 1993).

Bu model izole IP_3 reseptörlerinde gözlenen Ca^{2+} inhibisyonu ile de uyumludur (bkz bir önceki paragraf). Aynı şekilde Ca^{2+} salınımının inhibisyonunun hücre içi kalsiyum depolarının doluluk oranı tarafından regüle edildiği de öne sürülmüştür (Irvine, 1991; Koizumi ve ark., 1999). Bu modele göre RyR ya da IP_3R'lerinin agonistlerine duyarlılığı ER içindeki Ca^{2+} konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği ve bu etkinin IP_3 yada Ry reseptörünün luminal tarafında bulunduğu düşünülen bir kalsiyum bağlanma bölgesi aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Salınımın inhibisyonun ardından SERCA ve PMCA tarafından sitoplazmadaki Ca^{2+} hızla uzaklaştırılır ve $[Ca^{2+}]_i$ dinlenim seviyesine geri döner.

Önerilen bu mekanizmaların yanında, literatürde Ca^{2+}'un kademeli olarak salınmasını açıklamak amacı ile öne sürülen farklı bir hipotez de SERCA'nın sitoplazmik Ca^{2+} un artışı ile aktive olması üzerine dayanır. Bu hipoteze göre maksimal dozun altındaki agonist uyarılarında $[Ca^{2+}]_i$ artışına paralel olarak artan SERCA aktivitesi salınımı dengeleyerek $[Ca^{2+}]_i$'nun yeni bir kararlı duruma gelmesini sağlar. Uyarının şiddetinin artması ile $[Ca^{2+}]_i$ yeniden geçici bir süre artar, ardından SERCA aktivasyonu ile yeniden kararlı bir durum oluşur (Steenbergen J.M. 1995).

Kuantal kalsiyum salınımını açıklamak için önerilebilecek yukarda adı geçen ya da daha başka tüm mekanizmalar iç ayrıntıları dışarıda bırakılırsa iki temel gurupta toplanabilir: Birinci guruba $[Ca^{2+}]_i$ artışından sonra depolardan olan salınımın azaldığı yada durduğu modelleri, ikinci guruba Ca^{2+} salınımın uyarı devam ettiği sürece devam ettiği ancak Ca^{2+} uzaklaştırma mekanizmalarının etkinliklerini arttırarak $[Ca^{2+}]_i$'nun dinlenim seviyesine geri dönmesini ve depoların doluluk oranının sabit kalmasını sağladığı modelleri koyabiliriz.

Tüm bu düşüncelerin ışığında, bu tez çalışmasında kuantal kalsiyum salınımına, Ca^{2+} ATPazların etkisini ve önerilen mekanizmadaki önemlerini doku kültür hücrelerinde inceledik.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kültür Hücrelerinin Büyütülmesi

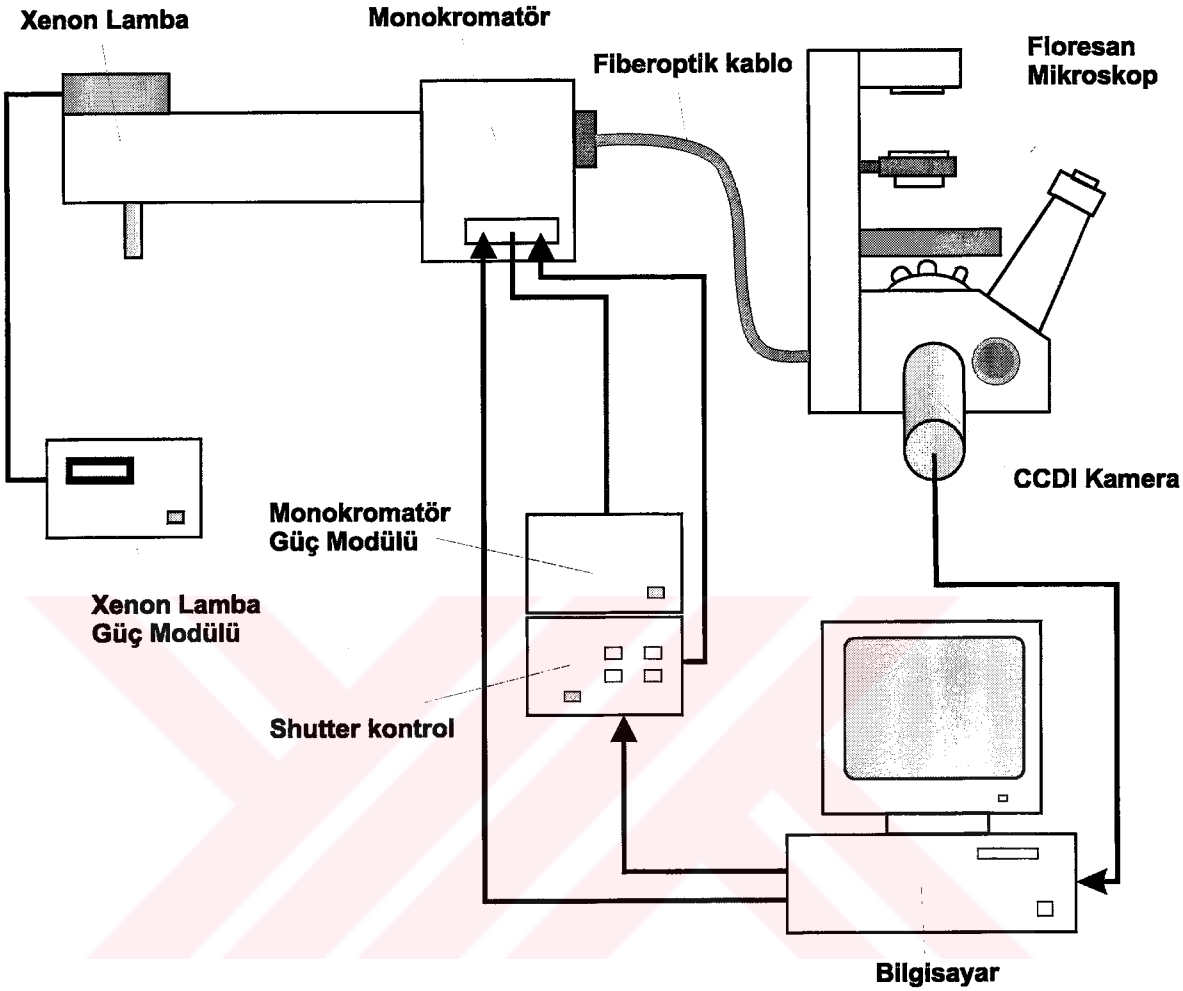
Bu çalışmada LTK8, Rat1 ve CHO-K1 kültür hücreleri kullanıldı. Kullanılan kültür hücreleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalından sağlandı. LTK8 ve RAT-1 hücreleri %10 fetal calf serum (FCS) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (GIBCO BRL Life Tech. NY, ABD) solüsyonu içinde büyütüldü. CHO-K1 hücreleri ise yine %10 FCS içeren DMEM F12 içinde yetiştirildi. 37°C'de, pH dengesinin korunması için %5 CO_2 içeren ortamda 75 cm^2'lik kültür kapları (flask) içinde büyütüldüler. Hücreler yaklaşık %100 konfluense geldikten sonra deneylerde kullanıldılar Deney öncesinde PBS (phosphate buffered saline)-EDTA içinde yaklaşık 10 dakika 37°C'de bekletildikten sonra yavaş mekanik etki ile kaldırılan hücreler, 3 cm çaplı tabanları cam lamelden oluşan petrilere ekildi. Hücreler petri tabanındaki lamelin yüzeyine yapışmaları için 1 saat etüvde büyüme koşullarında bekletildikten sonra içinde bulundukları solüsyon çekilerek, içeriği 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Hepes, 1 mM $6H_2OMgCl_2$ ve 1,5 mM Ca^{2+} olan solüsyonla (Banyo solüsyonu) bir kez yıkandılar ve floresans boya ile yüklenmeye hazır hale getirildiler.

2.2 Hücrelerin Fura-2 ile Yüklenmesi

Hücreler 6 μM Fura-2 asetoksimetil ester (fura-2 AM) içeren banyo solüsyonunda 24°C'de 60 dakika bekletilmek suretiyle yüklendiler. İnkübasyonun ardından geri plan (background) floresansını en aza indirebilmek için hücreler yine aynı solüsyon ile iki defa yıkanıp, ester formundaki boyanın tam metabolize olmasını sağlamak amacı ile 15 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildi.

2.3 Hücre İçi Ca^{2+} Derişiminin Ölçülmesi

Hücre içi Ca^{2+} derişiminin ölçülmesi amacı ile mikroskoba bağlı bir kamera sistemi kullanılmıştır (Ratiomaster, Photon Technologies International, NJ, ABD). Bu görüntüleme sisteminde, hücreler bir monokromatörden geçirilen xenon ark lamba ışığı kullanılarak sırası ile 340 ve 380 nm'de ışık ile uyarılmakta, emisyon sinyalleri ise 510 nm dalga boyunda filtrelenerek inverted floresan mikroskoba (Nikon, ECLIPSE TE200) bağlı bir intensified charge-coupled device (CCDI) kamera (IC-300, Photon Technologies International, NJ, ABD) ile görüntülenmektedir. Deneyler sırasında bu sistem aracılığı ile ardışık olarak alınan 340 ve 380 nm ışık ile uyarılan floresan hücre görüntüleri oran bilgisine çevrilmiş ve IMAGE MASTER yazılımı (Photon Technologies International, NJ, ABD) kullanılarak görüntü alanındaki her hücrenin içerisindeki [Ca^{2+}] değişimi ayrı ayrı ölçülmüştür (Sistemin yapısı Şekil 2.1'de şematik olarak gösterilmiştir).

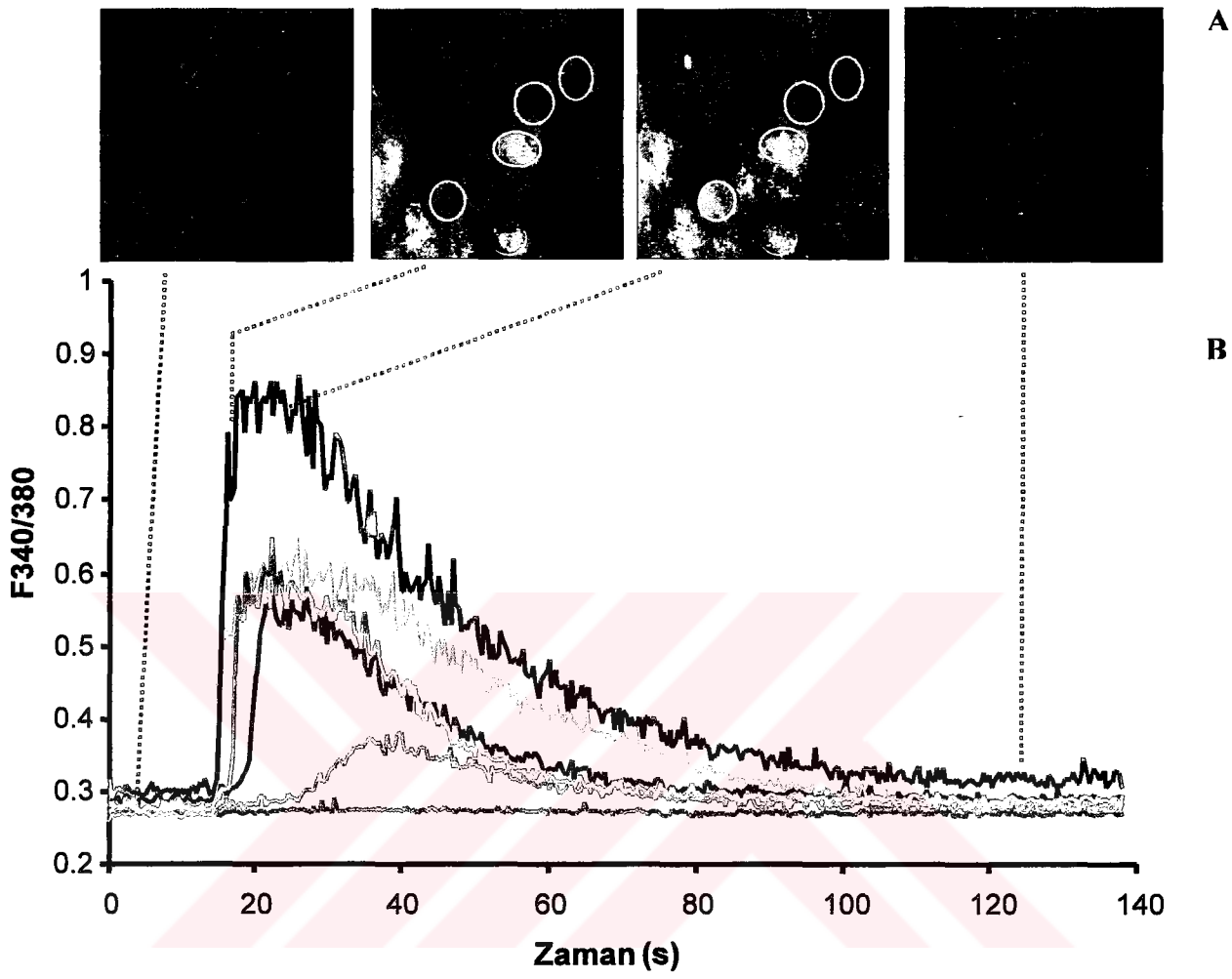


Şekil 2.1. Hücre içi Ca^{2+} derişiminin ölçülmesinde kullanılan CCD kamera-mikro-floresan görüntüleme sisteminin genel yapısı. Veriler bir intensified CCD kamera ile toplandıktan sonra işlenmek üzere bilgisayara aktarılıp saklanmaktadır. Bilgisayar aynı zamanda spektrometrenin monokromatörünü de kontrol ederek hızlı bir şekilde uyarı dalga boyunun değişmesine olanak vermektedir.

Fura-2 kullanılarak hücre içi Ca^{2+} derişiminin ölçülmesinin genel prensibi şu şekilde özetlenebilir: Ca^{2+} bağlı Fura-2 340 nm, serbest Fura-2 ise 380 nm dalga boyundaki ışık ile uyarılabilmektedir. Hem bağlı, hem de serbest Fura-2'nin floresan emisyonu ise 510 nm`de oluşmaktadır. Bağlı ve serbest Fura-2'nin derişimi ise, Ca^{2+} ile bağlanması tersinir olduğundan, ortamdaki serbest Ca^{2+} un değişimine bağlıdır ve Ca^{2+} değişimindeki değişikleri hızla takip eder. Sitoplazmadaki Ca^{2+} derişimi bilgisi ise 340 ve 380 nm dalga boyu ile uyarılan 510 nm floresan emisyonlarının şiddetlerinin oranlanması (F340/F380) ile elde edilebilir. F340/F380 oranı hücre içindeki boyanın (Fura-2) derişiminden ve ışığın geçtiği yolun özelliklerinden (optik path) bağımsız olup sadece hücre içi Ca^{2+} derişiminin bir fonksiyonudur. Bu tip derişim ölçümlerine genel olarak oransal ölçüm denir (ratiometric measurement) ve bu ölçümlerde kullanılan Fura-2 gibi boyalar oransal boyalar olarak adlandırılır (Tsien ve ark., 1985).

Hücreler bir inverted epifloresan mikroskobun tablasına yerleştirildikten sonra 0.3 s aralıklarla dönüşümlü olarak 340 nm ve 380 nm`deki ışık ile uyarıldı ve her uyarı ile elde edilen 510 nm floresans görüntü bilgisayara aktarıldı. Veri analizleri için kullanılan yazılım (Image Master) yardımı ile deney başlangıcındaki 380 nm görüntüsü kullanılarak her hücrenin sınırı (Region of Interest, ROI) belirlendi. Deney boyunca bu ROI'ler içindeki her piksel için F340/F380 oranı hesaplandı ve bu oranların her ROI için ortalama değerinin zamanla nasıl değiştiği gözlendi. Bu şekilde floresans oran ölçümleri hücrelerin alanı ile sınırlandırılmış oldu. Bu çalışmadaki tüm ölçüm sonuçları kalibre edilmemiş oran değerleri (F340/F380) olarak sunulmuştur. RAT-1 kültür hücrelerinde agonist uyarımı ardından oluşan F340/F380 oran değişimi ve seçilmiş ROI'lerin görüntüleri ile ROI'ler için hesaplanan ortalama F340/F380 oranlarının zamanla değişimi Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.

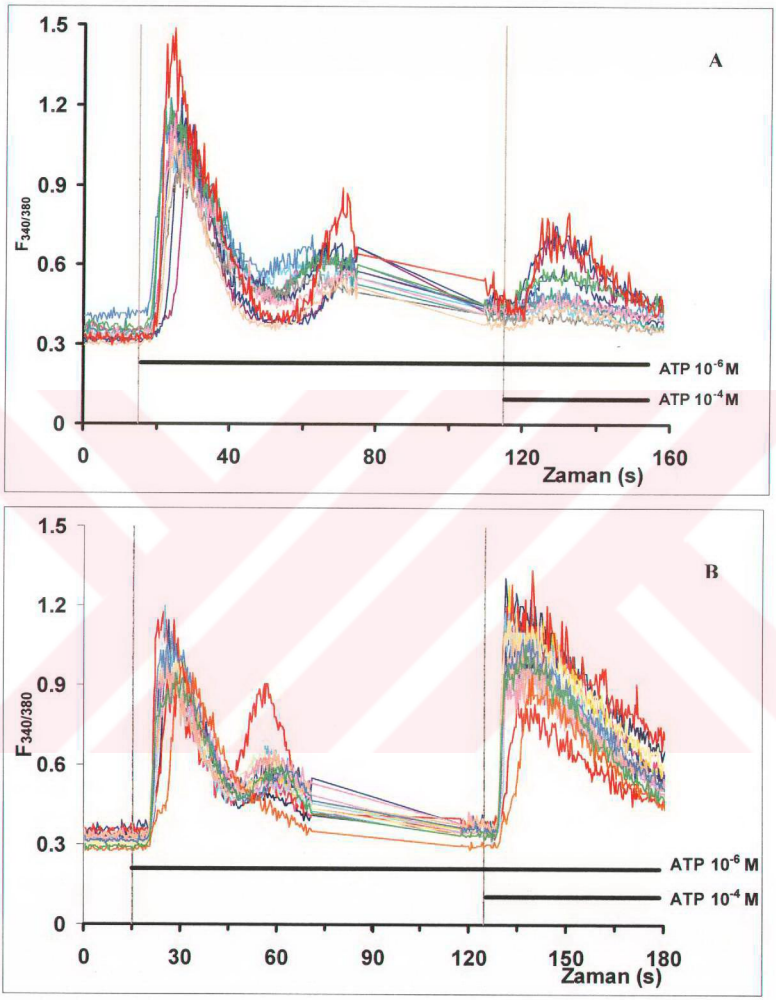
Deney sırasında hücrelere çeşitli kimyasal maddelerin uygulamaları, bu maddelerin banyo ortamına direkt eklenmesi ile yapıldı



Şekil 2.2. A. CCDI kamera ile elde edilen ve F340/F380 oran bilgisini gösteren sonradan renklendirilmiş, farklı zamanlarda, aynı bölgeden alınmış örnek görüntüler ve ölçüm için işaretlenmiş bölgeler (ROI'ler). **B.** İşaretli bölgelerden ölçülen ortalama F340/F380 oran değerlerinin zaman ile değişimi. Belli bir ROI'ye ait grafikler o ROI ile aynı renk koduna sahiptir.

3. BULGULAR

Kullandığımız LTK-8 hücrelerinde kuantal salınımın gerçekleştiğini görebilmek için Ca^{2+}'lu banyo solüsyonu içinde yüklenen hücrelere, deney sırasında hem Ca^{2+}'lu hem de Ca^{2+}'suz solüsyon içinde Adenozin Trifosfat (ATP) uygulandı. Bu hücrelerde Uridin Trifosfat (UTP) uygulamasına aldığımız yanıtlardan bu hücrelerde hücre dışından yapılan pürinerjik uyarılara yanıt veren P_2Y tipi reseptörlerin olduğunu bilmekteyiz (sonuçlar gösterilmemiştir). Ayrıca bu hücrelerin Ca^{2+} içermeyen banyo solüsyonunda da ATP uyarısı ile $[Ca^{2+}]_i$ artışı göstermeleri bu ATP yanıtlarda IP_3 ve hücre içi depoların rol oynadığını göstermektedir. Ca^{2+} içeren banyo solüsyonunda LTK-8 hücreleri banyoya uygulanan 10^{-6} M ATP'ye $[Ca^{2+}]_i$ artışı ile cevap verdiler. ATP uyarısı devam ederken bu hücrelerde $[Ca^{2+}]_i$'nun bir süre yüksek kaldığı sonra dinlenim durumuna geri döndüğü gözlendi. İlk uygulamanın ardından yapılan 10^{-4} M ATP uygulamasına hücreler yeniden bir $[Ca^{2+}]_i$ artışı ile yanıt verdiler. Aynı deney Ca^{2+} içermeyen banyo solüsyonunda tekerarlandığı ikinci uyarıya yanıtın azaldığı ancak devam ettiği gözlendi (Şekil 3.1. A ve B)

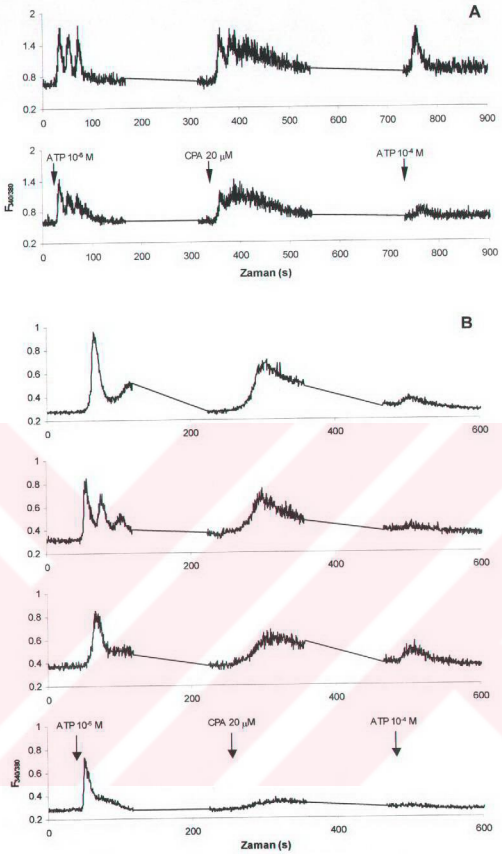


Şekil 3.1. A. Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda yapılan deneyde 10^{-6} M ve 10^{-4} M ATP uygulaması ile oluşan kuantal salınım. **B.** Ca^{2+}'lu banyo solüsyonunda yapılan deneyde 10^{-6} M ve 10^{-4} M ATP uygulaması ile oluşan kuantal salınım. Deneyler aynı gün yapılmıştır. Her bir şekil tek bir deneyden alınan en az 10 farklı hücrenin yanıtını içermektedir. Kimyasalların uygulanma zamanları şekillerin üzerinde gösterilmiştir.

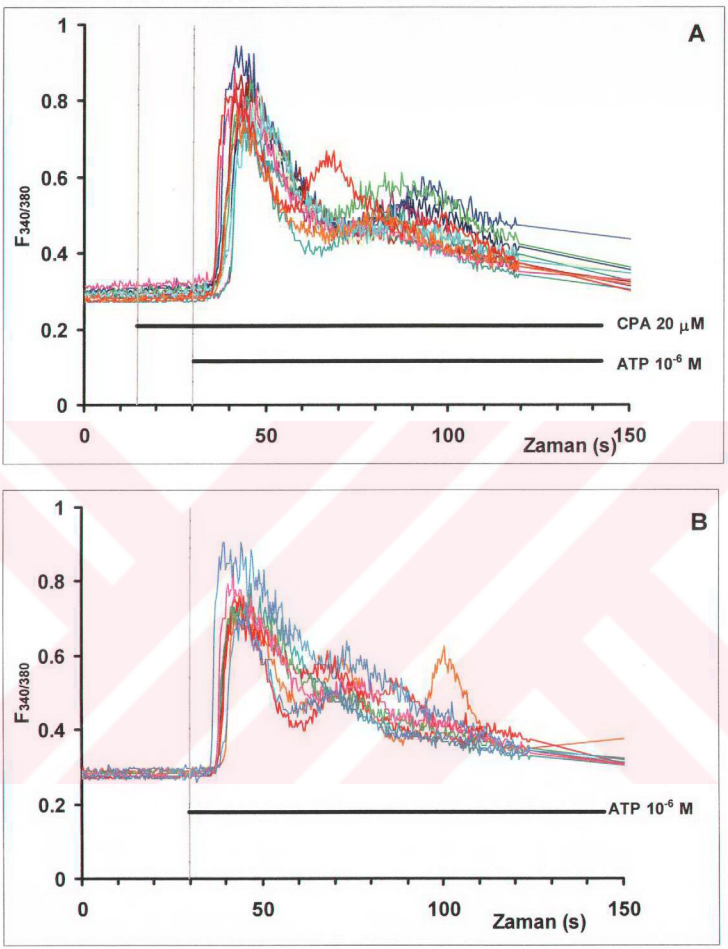
Ca^{2+} (1,5 mM) içeren banyo solüsyonuna 10^{-6} M ATP uygulandığında oluşan Ca^{2+} artışı bazal seviyeye döndükten sonra aynı hücrelere bir SERCA blokörü olan siklopiazonik asitin (CPA, 20 μM) uygulanması ani ve geçici bir $[Ca^{2+}]_i$ artışına sebep oldu. Yanıtın geçici olma nedenin ER Ca^{2+}'nun tümüyle boşalması olup olmadığını kontrol etmek amacı ile ortama maksimal doz (10^{-4} M) ATP eklendi maksimal doz ATP'nin, belirgin bir Ca^{2+} yanıtı oluşturabildiği görüldü (Şekil 3.2.A). Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda aynı deney tekrarlandığında, 10^{-6} M ATP uyarısı ardından ortama CPA uygulamasının ani ve geçici bir $[Ca^{2+}]_i$ artışına sebep olduğu, ancak 10^{-4} M ATP'nin çok belirgin bir yanıt oluşturamadığı gözlendi. (Şekil 3.2 B.) CPA tek başına uygulandığı zaman belirgin bir artışa neden olmadı.

Bu deney kuantal kalsiyum salınımı yapan bir hücrede, agonist uyarısı sürmekte iken $[Ca^{2+}]_i$'nun dinlenim seviyesine dönmesinden sonra bu durumun korunmasında SERCA'nın belirgin bir rolü olduğunu göstermektedir.

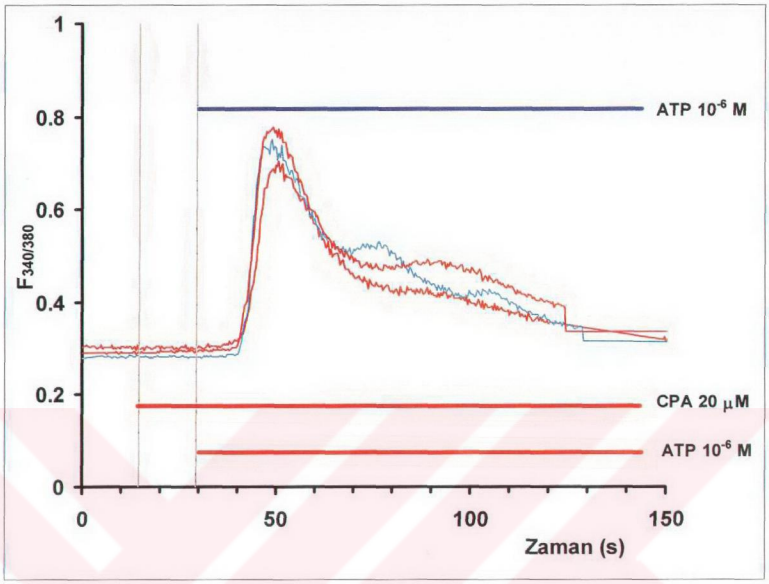
SERCA'nın agonist uyarımı sırasında $[Ca^{2+}]_i$ dinlenim düzeyine dönerek o seviyede kalmasının sağlanmasındaki rolünün yanı sıra sitoplazmadan Ca^{2+}'un uzaklaştırılmasındaki olası rolünü de araştırdık. Bu amaçla, Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda bulunan LTK-8 hücrelerinde CPA'nın ardından uygulanan ATP (Şekil 3.3.A) ve CPA olmadan uygulanan ATP (Şekil 3.3.B) ile oluşan kalsiyum yanıtlarının düşme hızlarını karşılaştırdık ve bu hızların belirgin bir şekilde farklı olmadıklarını gözledik (Şekil 3.4.).



Şekil. 3.2. A. Ca^{2+} (1,5 mM) içeren banyo solüsyonunda yapılan deneylerde 10^{-6} M ATP ye alınan yanıttan sonra, CPA ($2x10^{-5}$ M) ve ardından 10^{-4} M ATP uygulaması sonucu oluşan kalsiyum yanıtları aynı deneyden alınan iki farklı hücre için gösterilmiştir. **B.** Deneye başlanmadan önce Ca^{2+}'suz banyo solüsyonuna alınan hücrelerde sırası ile ATP (10^{-6} M), CPA ($2x10^{-5}$ M) ve ATP (10^{-4} M) uygulaması sonucu oluşan kalsiyum yanıtları aynı deneyden alınan dört farklı hücre için gösterilmiştir. Kimyasalların uygulama zamanları şekiller üzerinde oklarla belirtilmiştir.



Şekil 3.3. A. LTK-8 hücrelerinin 20 µM CPA uygulaması ardından verilen 10^{-6} M ATP'ye yanıtları. **B.** Bu hücrelerin yalnızca 10^{-6} M ATP'ye yanıtları. Uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir. Yanıtlar Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır. Deneyler aynı gün yapılmıştır. Her bir şekil, tek bir deney sırasında alınan en az 9 farklı hücrenin yanıtını içermektedir.



Şekil 3.4. Şekil 3.3 A ve B de görülen CPA uygulanmış ve uygulanmamış her iki yanıtın zamansal olarak karşılaştırılması. Aynı gün yapılan farklı deneylerden alınmış yanıtların zaman noktaları için ortalamaları gösterilmiştir (Karşılaştırmada kullanılan her bir eğri için 6-15 hücrenin yanıtlarının ortalaması alınmıştır). CPA 20 µM ve 10^{-6} M ATP'nin beraber uygulamaları ile gelişen yanıtlar kırmızı (2 deney), yalnızca ATP 10^{-6} M uygulaması mavi renkte gösterilmiştir (Bir deney). Yanıtların azalma kinetiklerinde belirgin bir farklılık görülmemektedir. Yanıtlar Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır. Uygulanan kimyasallar ve uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir.

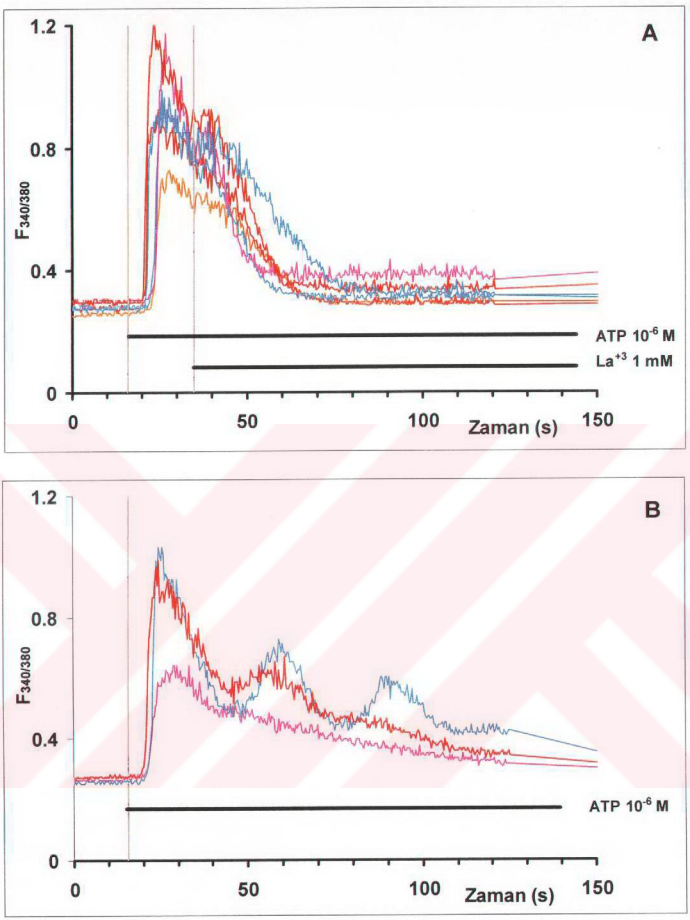
SERCA'nın inhibisyonun, agonist uyarımı ile oluşan Ca^{2+} yanıtının düşme hızına bir etkisinin olmaması, bizi PMCA'nın sitoplazmaya salınan Ca^{2+}'un uzaklaştırılmasındaki rolünü incelemeye yöneltti. PMCA'nın bloke olduğu durumda $[Ca^{2+}]_i$'nun azalma hızını incelemek amacı ile bir PMCA ve katyon kanal blokörü olan Lantanumu (La^{3+}) kullandık. Ca^{2+}'suz ortamda agonist uyarımının hemen ardından verilen La^{3+}'un (1 mM) yanıtlara etkisini (Şekil 3.5.A), La^{3+} uygulaması yapılmamış hücrelerin yanıtları (Şekil 3.5.B) ile karşılaştırarak inceledik. Bu deneylerden, La^{3+} uygulamasının $[Ca^{2+}]_i$'nun azalma hızına belirgin bir yavaşlatma etkisi göstermediği anlaşılmaktadır (Şekil 3.6).

Heterolog olarak insan α-adrenerjik reseptörü eksprese eden RAT-1 hücrelerinde de LTK-8 hücrelerinde yaptığımız SERCA ve PMCA blokaj deneylerini tekrarladık. Çalışmalarda öncelikle SERCA'nın blokajının yanıtlara etkisini gözlemlemek için CPA uygulaması sonrasında fenilefrin yanıtları gözlendi. Bu yanıtlar yanlızca fenilefrin uygulanmış hücrelerin yanıtları ile alt alta Şekil 3.7'de, gösterilmiştir.

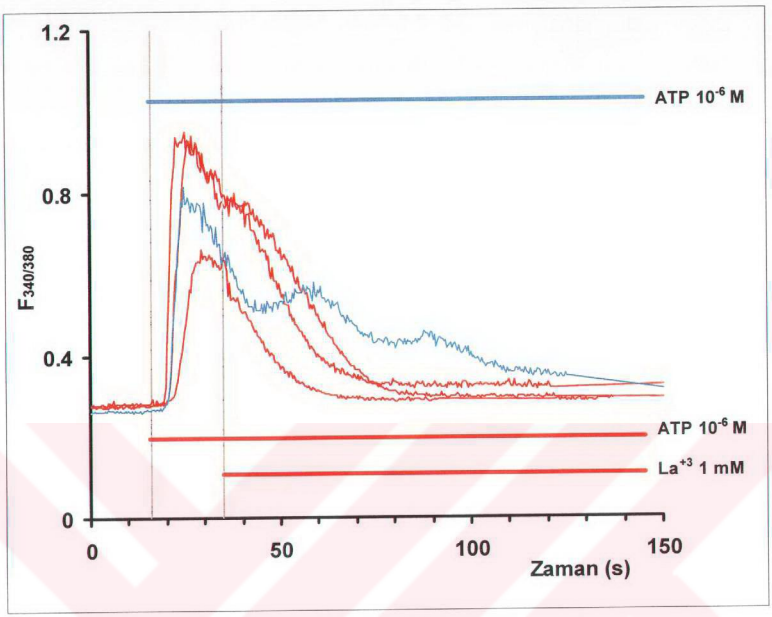
Agonist varlığında ER Ca^{2+} ATPazı bloke edilen hücrelerin, edilmemiş hücrelere göre yanıtlarının karşılaştırılmasının ardından (Şekil 3.8), yine agonist varlığında PMCA'ları bloke edilmiş hücrelerin yanıtları (Şekil 3.9.A) ile sadece fenilefrin verilmiş hücre gruplarının yanıtları (Şekil 3.9.B) Şekil 3.10'da karşılaştırılmıştır.

Hem LTK-8, hem RAT-1 hücrelerinde, ne SERCA blokajının ne de PMCA blokajının tek başına $[Ca^{2+}]_i$ azalma hızını etkilememesi bizi yanıtların düşme hızına CPA ve La^{3+}'un her ikisinin birlikte uygulamasının nasıl bir etki yapacağını gözlemeye itti. LTK-8 hücrelerinde her iki blokörün de birlikte kullanıldığı deneylerde $[Ca^{+2}]_i$ azalma hızının La^{3+} uygulamasının ardından bir miktar yavaşladığı görüldü (Şekil 3.11 ve 3.12).

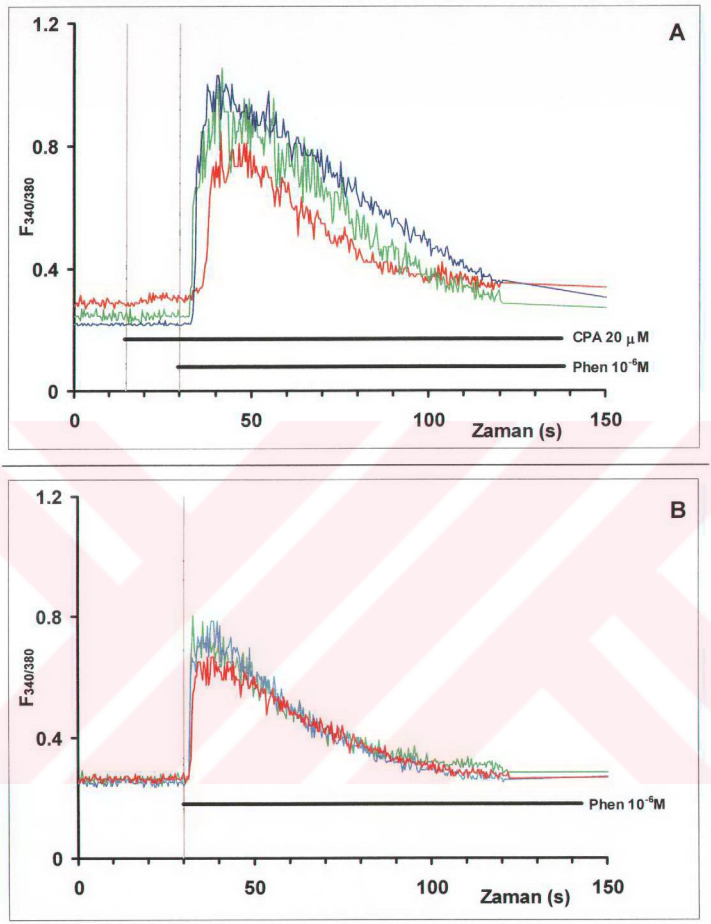
Ancak RAT1 hücrelerinde her iki Ca^{2+}ATPaz blokörü bir arada kullanıldığında $[Ca^{+2}]_i$'nun azalma hızının çok daha belirgin bir şekilde yavaşladığı gözlendi (Şekil 3.13 ve 3.14).



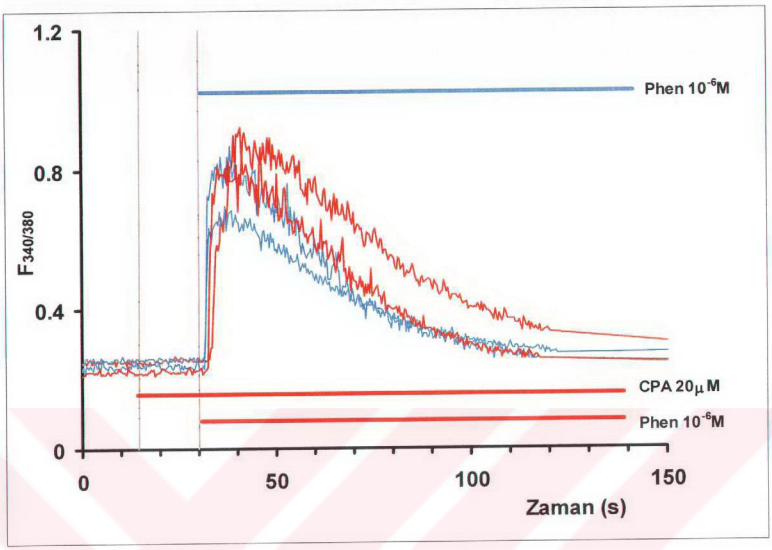
Şekil 3.5. A. LTK-8 hücrelerinde 10^{-6} M ATP uyarımı sonucunda oluşan Ca^{2+} yanıtı maksimum seviyesindeyken, şekilde belirtilen anda La^{3+} (1 mM) uygulanması ile elde edilen Ca^{2+} yanıtları. **B.** Aynı gün farklı bir gurup hücrede ölçülen, La^{3+} uygulanmadan alınan ATP (10^{-6} M) yanıtları. Deneyler aynı gün yapılmıştır. Her bir şekil aynı deneyden alınan 3-5 farklı hücrenin yanıtını içermektedir. Yanıtlar Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır.



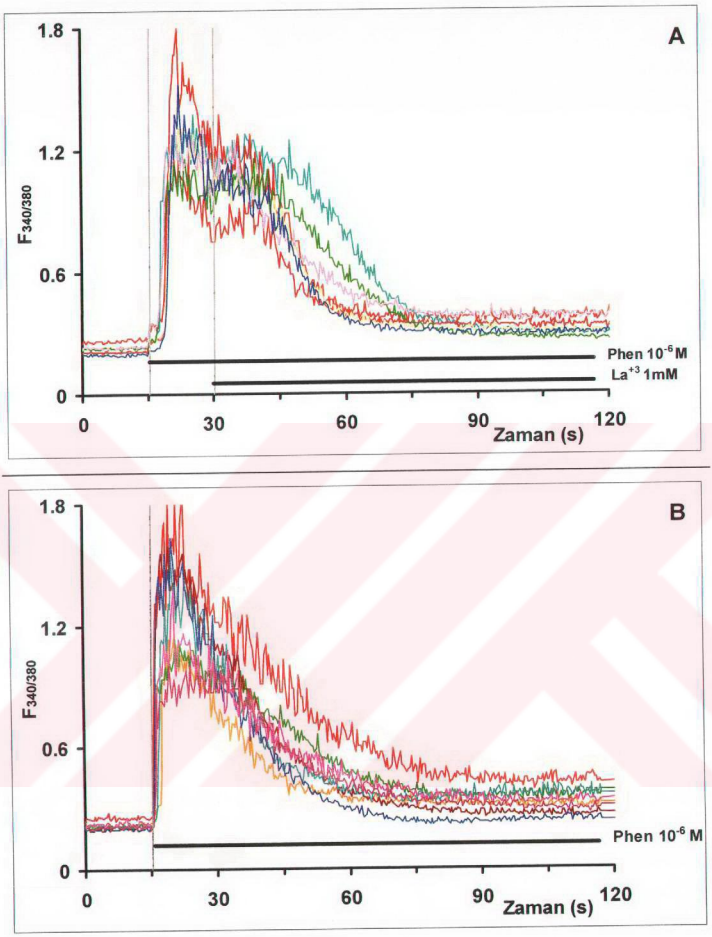
Şekil 3.6. Şekil 3.5. A ve B'de görülen La^{3+} uygulanmış ve uygulanmamış deneylerdeki yanıtların zamansal olarak karşılaştırılması. İki gün içinde yapılmış, farklı deneylerdeki hücrelerden alınmış yanıtların zaman noktaları için ortalamaları gösterilmiştir (Karşılaştırmada kullanılan her bir eğri için 5-20 hücrenin yanıtlarının ortalaması alınmıştır.). La^{3+} (1 mM) ve 10^{-6} M ATP'nin beraber uygulanması ile gelişen yanıtlar kırmızı (3 deney), yalnızca ATP 10^{-6} M uygulaması mavi renkte gösterilmiştir (1 deney). Yanıtların azalma kinetiklerinde belirgin bir farklılık görülmemiştir. Yanıtlar Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır. Uygulanan kimyasallar ve uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir.



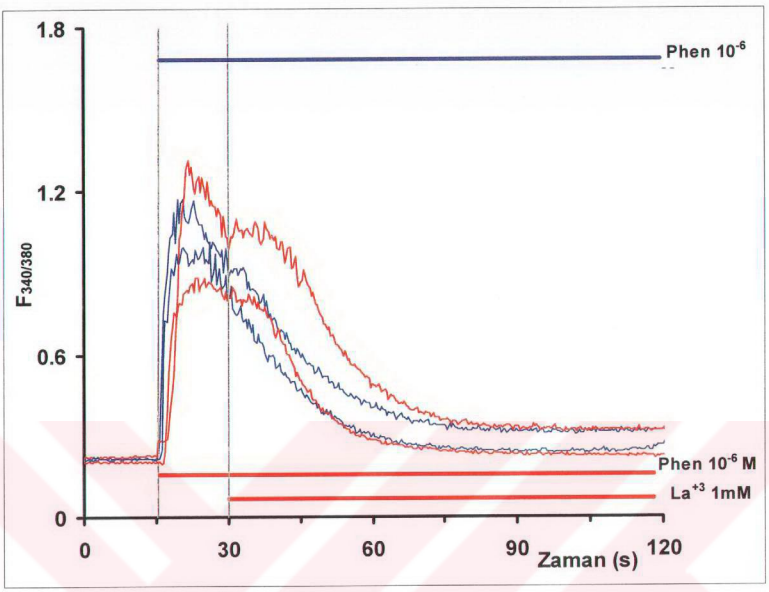
Şekil 3.7. A. RAT1 hücrelerine $2x10^{-5}$ M CPA verilmesinin ardından hücrelerin 10^{-6} M fenilefrine yanıtları. **B.** RAT1 hücrelerinde $2x10^{-5}$ M CPA uygulaması yapılmadan alınan fenilefrin (10^{-6} M) yanıtları. Uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir. Deneyler aynı gün yapılmıştır ve her şekil aynı deneyden en az 3 farklı hücrenin yanıtını içermektedir. Yanıtlar Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır.



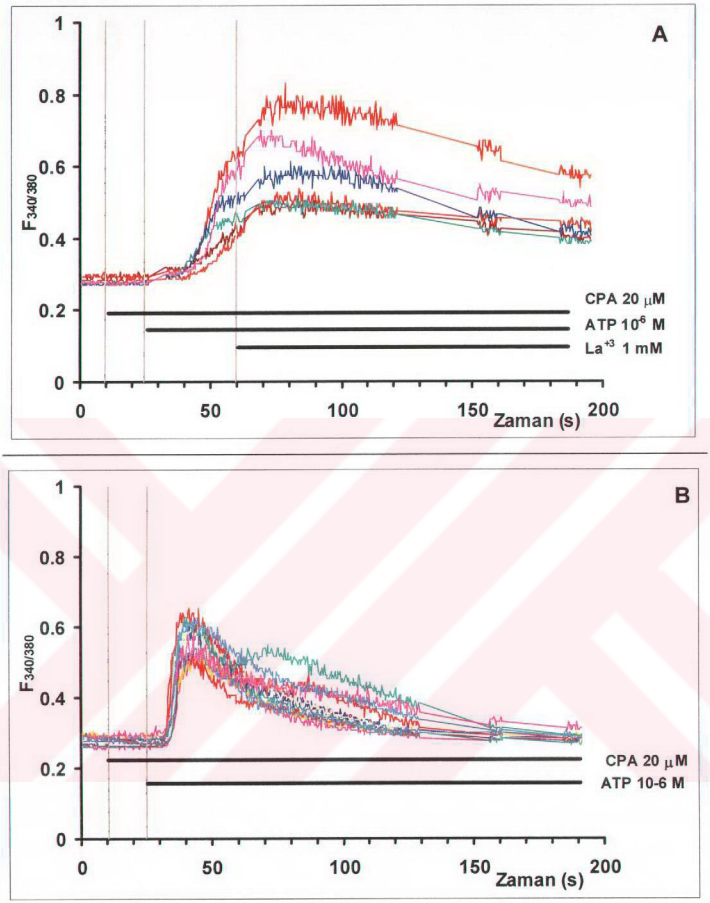
Şekil.3.8. Şekil 3.7. A ve B de görülen CPA uygulanmış ve uygulanmamış deneylerdeki yanıtların zamansal karşılaştırımı. İki gün içinde yapılan farklı deneylerden alınmış yanıtların zaman noktaları için ortalamaları gösterilmiştir (Karşılaştırmada kullanılan her bir eğri için 2-7 hücrenin yanıtlarının ortalaması alınmıştır). CPA 20 μM ve 10^{-6} M fenilefrinin'in beraber uygulamaları ile gelişen yanıtlar kırmızı (2 deney), yalnızca fenilefrin 10^{-6} M uygulaması mavi renkte gösterilmiştir (2 Deney). Yanıtların azalma kinetiklerinde belirgin bir farklılık görülmemiştir. Yanıtlar, Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır. Uygulanan kimyasallar ve uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir.



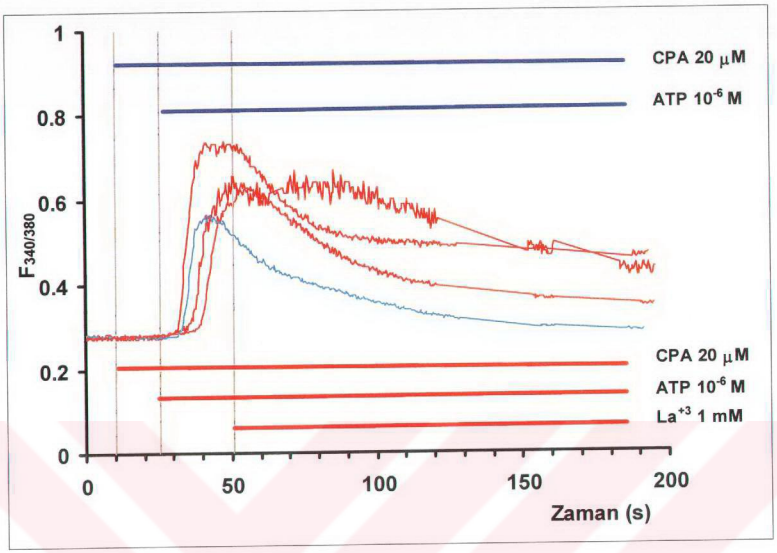
Şekil 3.9. A. RAT-1 hücrelerinde 10^{-6} M fenilefrin uyarımı sonucunda oluşan Ca^{2+} yanıtı maksimum seviyesindeyken, belirtilen anda La^{3+} (1 mM) uygulanması ile elde edilen Ca^{2+} yanıtları. **B.** Aynı gün farklı bir gurup hücrede ölçülen La^{3+} uygulanmadan alınan fenilefrin (10^{-6} M) yanıtı. Deneyler aynı gün yapılmıştır ve her şekil aynı deneyden en az 6 farklı hücrenin yanıtını içermektedir. Uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir. Yanıtlar Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır.



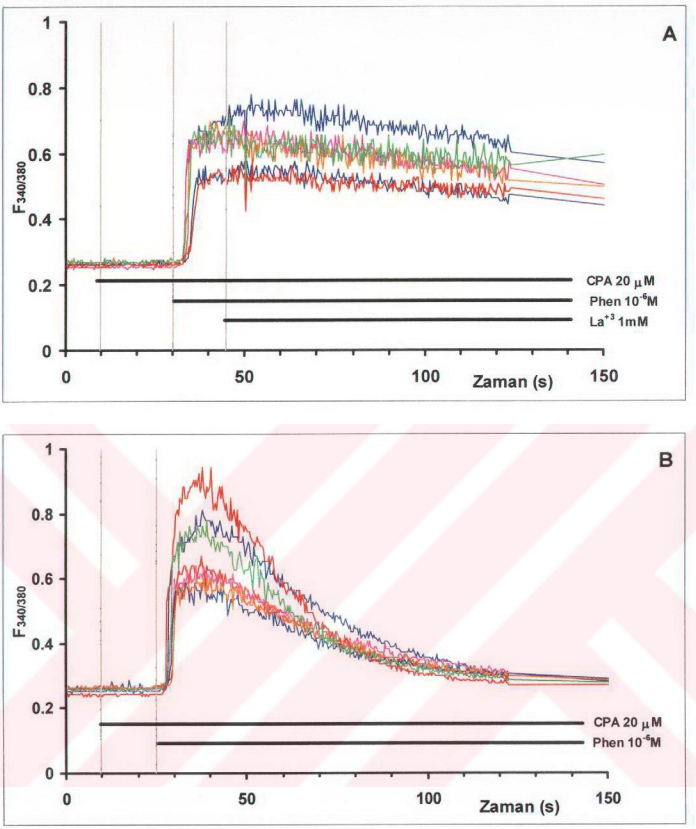
Şekil 3.10. Şekil 3.9 A ve B de görülen La^{3+} uygulanmış ya da uygulanmamış deneylerdeki yanıtların zamansal olarak karşılaştırılması. Aynı gün yapılan farklı deneylerden alınmış yanıtların zaman noktaları için ortalamaları gösterilmiştir (Karşılaştırmada kullanılan her bir eğri için 9-13 hücrenin yanıtlarının ortalaması alınmıştır). La^{3+} 1 mM ve 10^{-6}M fenilefrin'in beraber uygulamaları ile gelişen yanıtlar kırmızı (2 deney), yalnızca Fenilefrin 10^{-6} M uygulaması mavi renkte gösterilmiştir (2 deney). Agonist uygulamasının ardından verilen La^{3+}, Ca^{2+}'un uzaklaştırılmasını kısa bir süre için durdurabilmişse de yanıtların toplam azalma kinetiklerinde belirgin bir farklılık görülmemiştir. Yanıtlar Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır. Uygulanan kimyasallar ve uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir.



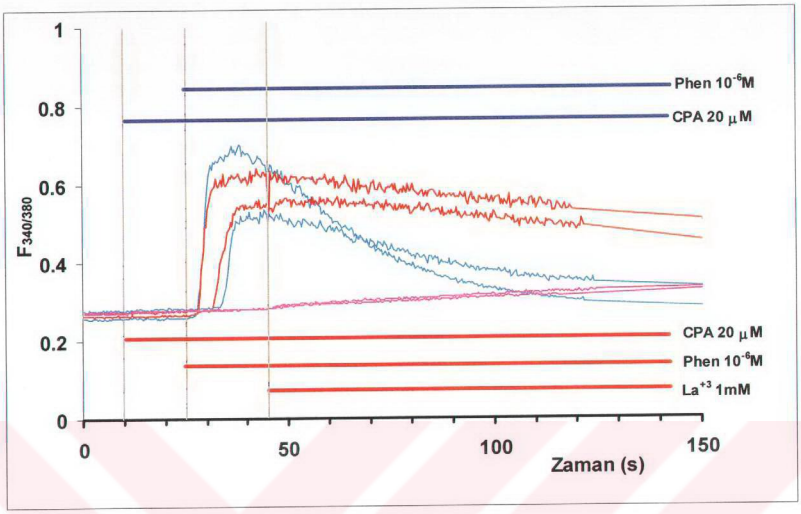
Şekil 3.11. A. LTK-8 hücrelerinde 10^{-6} M ATP uyarımı sonucunda oluşan Ca^{2+} yanıtı maksimum seviyesindeyken, belirtilen anda La^{3+} (1 mM) uygulanması ile elde edilen Ca^{2+} yanıtları. **B.** Aynı gün farklı bir gurup hücrede ölçülen La^{3+} uygulanmadan alınan ATP (10^{-6} M) yanıtı. Deneyler aynı gün yapılmıştır ve her şekil aynı deneyden en az 6 farklı hücrenin yanıtını içermektedir. Uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir. Yanıtlar Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır.



Şekil.3.12. Şekil 3.11 A ve B de görülen La^{3+} uygulanmış ya da uygulanmamış deneylerdeki yanıtların zamansal olarak karşılaştırılması. Aynı gün yapılan farklı deneylerden alınmış yanıtların zaman noktaları için ortalamaları gösterilmiştir (Karşılaştırmada kullanılan her bir eğri için 7-12 hücrenin yanıtlarının ortalaması alınmıştır.). CPA 20 µM, La^{3+} 1 mM ve 10^{-6} M ATP'nin beraber uygulamaları ile gelişen yanıtlar kırmızı, yalnızca ATP 10^{-6} M ve CPA 20 µM uygulaması mavi renkte gösterilmiştir. Uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir. LTK-8 hücrelerinde her iki blokörün beraber kullanımını, yanıtların azalma kinetiklerini bir miktar yavaşlatmıştır. Yanıtlar Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır. Uygulanan kimyasallar ve uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir.



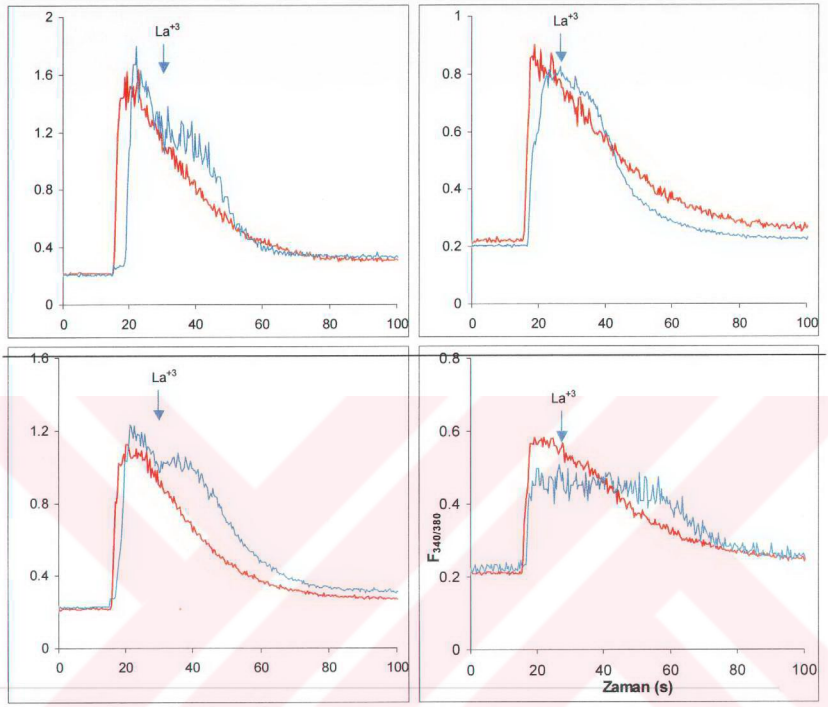
Şekil 3.13. A. RAT1 hücrelerine CPA ($2x10^{-5}$ M), fenilefrin (10^{-6} M) ve La^{3+} (1 mM) bu sırayla uygulanmıştır. **B.** Aynı gün sadece CPA ($2x10^{-5}$ M) ve fenilefrin (10^{-6} M) uygulanmış ancak La^{3+} uygulanmamış hücrelerin yanıtları. Uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir. Yanıtlar Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır



Şekil.3.14. Her iki yanıt ile birlikte belirtilen zamanlarda yalnızca CPA 20 µM ve La^{3+} 1 mM uygulanmış hücrelerin yanıtlarının zamansal karşılaştırımı. Üç gün içinde yapılan deneylerden alınmış yanıtların zaman noktaları için ortalamaları gösterilmiştir (Karşılaştırmada kullanılan her bir eğri için 2-15 hücrenin yanıtlarının ortalaması alınmıştır). CPA (20 µM), La^{3+} (1 mM) ve fenilefrin'in (10^{-6} M) beraber uygulamaları ile gelişen yanıtlar kırmızı (2 deney), ATP (10^{-6} M), CPA (20 µM) uygulaması ile oluşanlar mavi (2 deney) ve CPA 20 µM, La^{3+} 1 mM uygulaması ile oluşanlar majenta ile gösterilmiştir. RAT-1 hücrelerinde her iki blokörün beraber kullanımının yanıtların azalma kinetiklerini belirgin bir şekilde yavaşlattığı şekilde görülmektedir. Yanıtlar, Ca^{2+}'suz banyo solüsyonunda alınmıştır. Uygulanan kimyasallar ve uygulama zamanları şekilde belirtilmiştir.

Bu deneylerden anlaşıldığı üzere RAT1 hücrelerinde de SERCA ve PMCA'nın tek başına blokajı Ca^{2+} yanıtlarının azalma hızını belirgin bir şekilde etkilememektedir. Ancak her iki pompanın birlikte blokajı, agonist sonrası artan $[Ca^{2+}]_i$'un azalma hızını etkilemektedir.

Bu nokta ile ilgili ilginç iki gözlemden söz edilebilir. Birinci gözlem, önceden La^{3+} uygulanan hücrelerin ATP'ye hemen hiç cevap vermemesidir. Lantanum'un bu etkisi 100 mM La^{3+} konsantrasyonunda da gözlenmiştir (Data gösterilmemiştir). Bu gözlemin olası bir nedeni negatif yüklü ATP nin pozitif yüklü La^{3+} ile iyonik etkileşme sonucu çelasyona uğrama olasılığı olduğu için bu etkileşmenin olmadığı bir başka agonist ile aynı deneyi tekrarladık. La^{3+}'un RAT1 hücrelerinde fenilefrin ile uyarılan α-adrenerjik reseptör yanıtlarını da bloke ettiğini gözledik. Ayrıca La^{3+} CHO-K1 hücrelerindeki P_2Y reseptörleri ile oluşan kalsiyum yanıtlarını da bloke etti. Bu sonuçlar La^{3+} un IP_3 aracılı kalsiyum yanıtlarını bloke ettiğini ve bunun ATP'nin La^{3+} ile çelasyonu dışında bir mekanizma ile oluşan ve farklı hücre tiplerinde görünen yaygın bir etki olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgu, literatürdeki La^{3+} un seçici bir PMCA blokörü olduğu iddiası ile uyumlu değildir. Belirtilmesi gereken ikinci gözlem; eğer yakından incelenirse RAT-1 hücrelerinde fenilefrinden sonra uygulanan La^{3+} un $[Ca^{2+}]_i$'nun azalma hızını önce azalttığı ancak daha sonra bu hızın artarak $[Ca^{2+}]_i$'nun dinlenim düzeyine kontrol ile yaklaşık aynı sürede indiğinin görülmesidir (Şekil 3.10 ve Şekil 3.15). Bu nokta tartışma bölümünde tekrar ele alınacaktır.



Şekil 3.15. RAT1 hücreleriyle aynı gün yapılan deneylerde, fenilefrin (10^{-6} M) uygulamasının ardından La^{3+} (1 mM) eklenerek veya eklenmeden alınan yanıtların, maksimum büyüklükleri benzer olanlar eşleştirilmiş ve dört örnek çift gösterilmiştir. La^{3+} uygulamasının ardından $[Ca^{2+}]_i$'daki azalmanın önce yavaşladığı, daha sonra hızlanarak $[Ca^{2+}]_i$'nun bazal seviyeye düştüğü gözlenmektedir. Şekilde ortama fenilefrin ardından La^{3+} eklenen kayıtlar mavi, La^{3+} eklenmeyenler ise kırmızı ile gösterilmiştir, La^{3+}'un ortama eklendiği an okla belirtilmiştir. Deneyler Ca^{2+}'suz ortamda yapılmıştır.

4. TARTIŞMA

Pek çok hücre tipinde, IP_3 veya Ry reseptörlerinin uyarılması sonucu, "dereceli" ya da "kuantal" olarak adlandırılan bir tip kalsiyum yanıtı gözlenir. Bu tip kalsiyum salınımının iki temel özelliği vardır: Birinci özellik; belirli bir şiddetteki uyarı ile depolardaki kalsiyumun yalnızca bir miktarının salınması ve uyarının devam etmesine rağmen salınım devam etmemesidir. Bu durumda depoda kalan kalsiyumun bir bölümü daha sitoplazmaya, uyarı şiddetinin arttırılması ile salınanabilir. İkinci özellik ise, hücre içi depolardan salınan kalsiyum oranının, uyarının şiddeti ile doğru orantılı olmasıdır. Maksimum uyarı depo kalsiyumunun hemen tamamının boşalmasına neden olurken, sub maksimal uyarılar depolardan sadece belli bir miktar Ca^{2+}'un salınmasına neden olur. Dereceli ya da kuantal kalsiyum salınımının bu iki temel özelliğini birden açıklayan en basit hipotez ilk olarak Muallem ve ark. (1989), tarafından önerilen ve depoların birbirinden bağımsız ve farklı duyarlılıkta alt ünitelerden oluştuğunu iddia eden hipotezdir (Model I). Bu hipoteze göre, her alt ünite "hep ya da hiç" salınım yapar, ancak her ünitenin uyarıya duyarlılığı farklı olduğundan cevap veren ünite sayısının toplama oranı, uyarı şiddeti ile orantılıdır (Şekil 1.4). Bu modelin temel özelliklerinde bir değişiklik yapmadan CICR gibi geri besleme mekanizmaları da katmak mümkündür (Bootman ve ark.,1994). İkinci bir gurup teori ise depoların parçalı olmadığını ve yanıtların homojen, tek bir deponun cevabı olduğunu varsaymaktadır. Bu teorilerden birincisinde, depodan Ca^{2+} çıkışının uyarı devam ettiği sürece devam ettiği ancak SERCA'nın (ya da daha genel olarak sitoplazmadan kalsiyum uzaklaştıran tüm mekanizmaların) zamanla aktivite artışı göstererek bu çıkışı kompanse eder duruma geldiği iddia edilmektedir (Model II) (Steenbergen J.M. 1995). Bir diğeri ise depodan Ca^{2+} çıkışının sitoplazmik Ca^{2+} derişiminin artması sonucu ya da hücre içi depolardaki kalsiyum derişiminin azalması ile inhibe olduğu ve depolardan Ca^{2+} çıkışının durduğu görüşünü savunur (Model III) (Irvine, 1991; Iino ve Endo, 1992; Koizumi ve ark., 1999). Bu hipotezin bir varyantı ise IP_3 bağlamış IP_3 reseptörlerinin zamana bağlı olarak inaktivasyona uğradığını ve bu şekilde depolardan Ca^{2+} çıkışının durduğunu iddia etmektedir (Model IV) (Dawson ve ark. 2003). Yukarıda sayılan bütün bu hipotezler, uyarı

sürmekte iken $[Ca^{2+}]_i$'nun dinlenim seviyesine düşmesi için depolardan Ca^{2+} çıkışının durmasının gerektiği (Model III ve IV) veya gerekmediği (Model I ve II) modeller olarak da ikiye ayrılabilir. Ancak hem deponun farklı duyarlılıkta alt birimlerden oluştuğunu hem de depo içi ve sitoplazmik Ca^{2+}'un salım üzerine kontrol edici bir etkisini öngören birleşik modeller de öne sürülmüştür (Dettbarn ve ark. 1997).

Bu çalışmalarda, Fura-2 ile yüklediğimiz kültür hücrelerinin, banyo ortamına eklediğimiz agonistler aracılığı ile oluşturdukları sitoplazmik Ca^{2+} derişimi artışları ölçülmüştür. Yaptığımız deneylerde ilk olarak LTK-8 hücrelerinin agonist uyarısı (ATP) ile dereceli ya da kuantal kalsiyum salınımı yaptığını gösterdik (Şekil 3.1.A ve B). Bu yanıtlar hücrelerde endojen olarak eksprese edilen P_2Y tipi reseptörlerin uyarılması sonucu ve IP_3 aracılığı ile oluşmaktadır. LTK-8 hücrelerinde ikinci olarak SERCA blokajının bu kuantal yanıtlara etkisini inceledik. Model II'nin önerdiği şekilde eğer uyarı ve buna bağlı olarak depolardan Ca^{2+} çıkışı devam ediyor, ancak SERCA aktivitesi bunu kompanse ederek sitoplazmik Ca^{2+} derişimini dinlenim düzeyine indirip orada tutuyorsa (Şekil 4.1 A), agonist yanıtı sonrası CPA gibi bir SERCA blokörü uygulanmasının, dinlenim düzeyinde ve sabit seyreden sitozolik Ca^{2+} derişiminde bir artışa neden olmasını gerektirir. Bu öngörüyü sınamak amacı ile 10^{-6} M ATP'ye oluşan Ca^{2+} yanıtının ardından $[Ca^{+2}]_i$'nun dinlenim düzeyine düşmesi beklendi ve ortama 20 μM CPA eklendi. Bu uygulamanın ani bir $[Ca^{2+}]_i$ artışına neden olduğu görüldü (Şekil 3.2). Deneylerin Ca^{2+} içermeyen banyo solüsyonunda yapılmış olması nedeni ile bu $[Ca^{2+}]_i$ artışın depolardan gelen Ca^{2+} salınımını yansıttığı sonucuna vardık (Şekil 3.2.B). Bu sonuç her ne kadar Model II ile uyumlu görünmekte ise de deneylerden açıkça görüldüğü üzere CPA ile oluşan $[Ca^{2+}]_i$ artışı geçicidir. CPA yanıtındaki bu düşme depo kalsiyumunun bitmekte olması ve $[Ca^{2+}]_i$'un PMCA aracılığı ile hücre dışına uzaklaştırılması ile açıklanabilir, eğer depolar tamamen ya da tamamına yakın bir şekilde boşalmıyorsa bu azalmayı sadece Model II' nin önerileri ile açıklamak güçtür. Bu soruna cevap aramak amacı ile CPA'nın ardından daha yüksek doz ATP (10^{-4} M) uygulayarak depoların doluluk durumunu kontrol ettik (Şekil 3.2). Bu deneyler Ca^{2+} içermeyen banyo solüsyonunda yapıldıklarında, ikinci ATP uygulaması belirgin bir Ca^{2+} yanıtı

oluşturmadı. Bu durum depoların tamamen boşaldığı ve CPA sonrası görülen $[Ca^{2+}]_i$ artışının geçici olmasının nedeninin de depolardaki bu boşalma olduğu şeklinde yorumlanabilirse de Ca^{2+} içeren ortamda yapılan deneylerde ikinci ATP uygulamasına belirgin bir yanıt almak mümkün oldu (Şekil 3.2.A). Bu durumda CPA sonrası görünen Ca^{2+} yanıtın zamanla azalmasının sadece hücre içi depoların boşalmasına bağlamak güçtür.

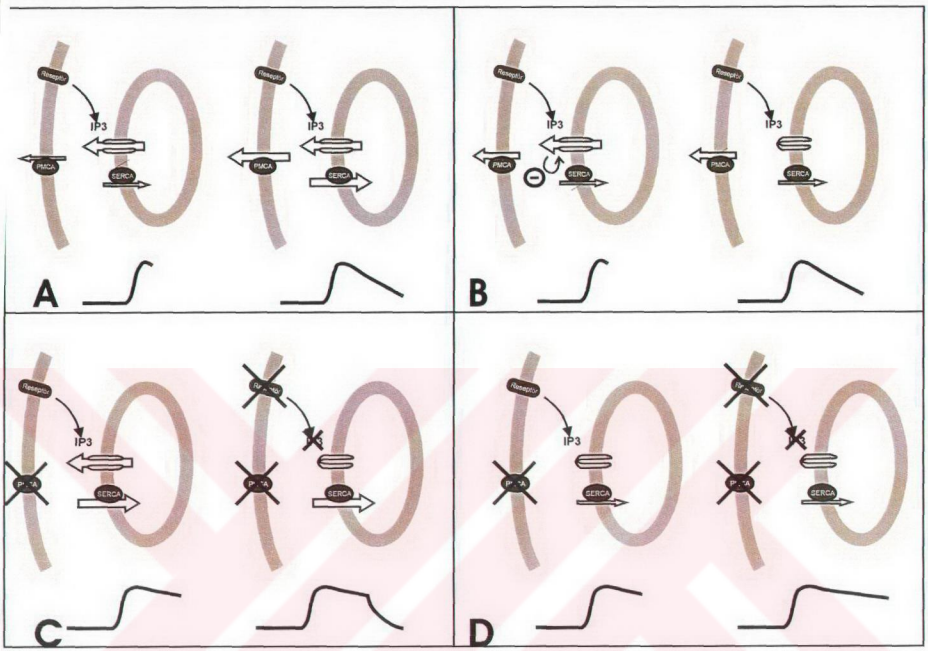
Model II'nin bir başka beklenen sonucu da agonist yanıtının düşme aşamasının CPA uygulamasından etkilenerek yavaşlamasıdır. Bu öngörüyü sınamak amacı ile LTK-8 hücrelerine ATP (10^{-6} M) uygulamasından 15 saniye önce CPA (20 μM) uyguladık ve bu uygulamanın ATP yanıtının azalma hızına belirgin bir etkisi olmadığını gözlemledik (Şekil 3.4). CPA'nın ATP yanıtlarının azalma hızına belirgin bir etkisi olmaması Model II ile uyumlu görünmemektedir ve agonist uyarısı ile sitoplazmaya salınan Ca^{2+}'un uzaklaştırılmasında PMCA'nın SERCA'ya göre daha önemli olduğunu düşündürmektedir. Ancak Model II'de esas Ca^{2+} uzaklaştırma mekanizmasının PMCA olduğu düşünülürse, Model II'nin hala doğru olduğu söylenebilir. PMCA'nın LTK-8 hücrelerindeki baskın sitozolik Ca^{2+} uzaklaştırma mekanizması olup olmadığını sınamak amacı ile banyo solüsyonuna uygulanan La^{3+} ile PMCA'yı bloke etmek yoluna gittik. La^{3+}'un 1 mM konsantrasyonda PMCA'yı bloke ettiği gösterilmiştir (Kwan ve ark., 1990). LTK-8 hücrelerinde La^{3+} uygulaması ATP yanıtlarının azalma fazını belirgin bir şekilde yavaşlatmadı (Şekil 3.6). SERCA'nın ve PMCA'nın bloke edilmesi ile çok benzer etkileri, α-adrenerjik reseptör (başka bir IP_3 kenetli GPCR) eksprese eden RAT1 hücrelerinde de gözlemledik (Şekil 3.8 ve 3.10). Bu sonuçlar beklenmedik sonuçlardır, çünkü ne SERCA'nın ne de PMCA'nın tek başına blokajı, agonist yanıtlarının düşme fazını yani sitozolik Ca^{2+}'un uzaklaştırılmasını hemen hiç etkilememektedir. Bu sonuç beklenmedik olmakla beraber Morgan ve Jacob, (1998) ile uyumludur. Bahsedilen çalışmada HUVEC hücrelerinde oluşan sub-maksimal histamin (0,3 μM) yanıtlarında $[Ca^{2+}]_i$ düşme hızına CPA (30 μM) veya La^{3+}'un (1 mM) tek başına bir etkisi yok gibi görünmektedir. Morgan ve Jacob, (1998) ve bizim bulgularımız SERCA ve PMCA aktivitelerinin birbirleri ile sıkıca kenetli olduğunu ve birindeki aktivite azalmasının diğeri tarafından kompanse edilebildiğini düşündürmektedir.

Ancak deneylerimizin beklenmeyen bir sonucu daha oldu ve La^{3+} ATP yanıtlarını tümden engelledi. Önceden ortama La^{3+} eklendiğinde, üç ayrı hücre tipi (LTK-8, RAT1 ve CHO-K1) sonradan uygulanan agonistlere (ATP ve fenilefrin) hemen hiç yanıt vermediler. Bu bulgu daha önceden bildirilen La^{3+}'un seçici PMCA bloke edici etkisine benzememektedir (Kwan ve ark., 1990; Morgan ve Jacob, 1998). Bu şekilde La^{3+}'un ikili bir etkisinin olduğunu düşünürsek (hem PMCA blokajı, hem de agonist yanıtlarının blokajı) gözlemlediğimiz bu şaşırtıcı sonuçları başka bir şekilde de açıklamamız mümkün olabilir ancak bu noktaya ileride değineceğiz (Bkz. son paragraf). Ancak şunu güvenle söylemek mümkündür ki La^{3+}'un bu inhibe edici etkisi basitçe ATP^{-4} ile La^{3+}'un çelasyonuna bağlı değildir, çünkü negatif yüklü olmayan fenilefrin kullanılarak başka bir tip reseptörde de (α-adrenerjik reseptör) aynı sonuç alınmıştır. Bu inhibisyon LTK-8 hücrelerine ve P_2Y reseptörlerine özgü bir durum da değildir, çünkü hem LTK-8 hem RAT-1 ve ayrıca CHO-K1 hücrelerinde, hem P_2Y hem α-adrenerjik reseptör yanıtları için gözlenmiştir. Ancak La^{3+} etkisinin hücrede hangi noktaya olduğu şu an için açık değildir.

RAT-1 hücrelerinde PMCA ve SERCA'yı birlikte bloke ettiğimizde ne olduğunu incelemek amacı ile CPA uygulanmış hücrelerde fenilefrin yanıtları oluşturduk ve yanıtın oluşmasını takiben banyo solüsyonuna La^{3+} uyguladık (Şekil 3.13.A). Bu uygulama ile $[Ca^{2+}]_i$'nun düşme hızı çok belirgin bir şekilde yavaşladı (Şekil 3.14). Aynı sonuç LTK-8 hücrelerinde ATP yanıtları için de gözlendi (Şekil 3.12). Ancak LKT-8 hücrelerinde CPA ve La^{3+} un beraber uygulanması ile gözlenen etki çok daha az belirgindir. Bu durumda CPA'nın LTK-8 hücrelerindeki blokaj etkisinin az olduğu ve SERCA'nın kapasitesinin büyük ölçüde etkilenmediği düşünülebilir. Ancak LTK-8 hücrelerinde ATP uygulamasının ardından verilen CPA belirgin bir etki de göstermektedir. CPA'nın ATP'nin ardından uygulandığında oluşturduğu yanıtın SERCA'nın tümden blokajı yerine kısmi blokajı ile oluşan bir tetik etkinin sonucu olduğu iddia edilebilir.

Bu çalışmada amaçlanan deneylerden bir diğeri ise La^{3+} ile PMCA'nın blokajı sonrası, agonist uyarısı ile artan $[Ca^{2+}]_i$'nun azalma hızı belirgin bir şekilde yavaşlatıldıktan sonra agonist uyarısının kesilmesi ile (antagonist uygulanarak ya da

agonistin yıkanması sağlanarak) $[Ca^{2+}]_i$'nun düşme hızının artıp artmayacağının gözlenmesi idi. Agonist uyarısının ortadan kalkması ile eğer $[Ca^{2+}]_i$'nun düşme hızında bir artış oluşursa bu depolardan kalsiyum çıkışının durmasının gerektiren modellerin (Model III ve IV) aleyhine ve diğer modellerin (Model I ve II) lehine bir bulgu olarak görülebilir (Şekil 4.1 C ve D). Bu şekilde yorumlanabilecek bir bulgu Morgan ve Jacob, (1998) tarafından HUVEC hücrelerinde yapılan bir çalışmada yüksek agonist konsantrasyonları için sunulmuştur. Ancak bahsedilen çalışmada bu bulgu üzerinde herhangi bir tartışma yapılmamış ve gözlenen fenomen mekanizmayı aydınlatmaya yönelik olarak incelenmemiştir. Bizim çalışmamızda La^{3+}'un agonist yanıtlarını beklenmedik şekilde inhibe etmesi bu deneyi yapmamızı engellemiştir. Yine de elde ettiğimiz sonuçları bu gözle tekrar incelersek; PMCA'nın La^{3+} ile blokajının $[Ca^{2+}]_i$'nun azalma hızını belirgin bir şekilde etkilememesi aslında PMCA'nın sitoplazmadaki Ca^{2+}'u uzaklaştırmada tek başına rolünün az olmasından çok La^{3+}'un PMCA blokajnn yanısıra agonist yanıtını da bloke etmesi, bunun sonucunda da depolardan IP_3 aracılı Ca^{2+} salınımını durdurması ile açıklamak mümkündür (Açıklama için Şekil 4.1.D'ye bakınız). Bu hipotezle uyumlu olarak RAT1 hücrelerinden elde edilen kayıtlar yakından incelendiğinde oluşmuş agonist yanıtları üzerine La^{3+} eklendiğinde $[Ca^{2+}]_i$'nun azalma hızının önce kısa bir süre yavaşladığı sonradan oldukça hızlanarak dinlenim durumuna düştüğü görülebilir (Şekil 3.9.A). Eğer La^{3+} önce PMCA'yı bloke ediyor ve agonist yanıtlarını kısa bir süre sonra inhibe ediyorsa böyle bir sonucu açıklamak mümkün olacaktır. Ancak çok dolaylı bir yolla çıkarılmış bu hipotezin doğruluğunun doğrudan sınanması gereklidir. Bu amaçla La^{3+}'un agonist yanıtlarını bloke etmediği bir sistemde deneylerin yapılması zorunludur, bu yöndeki çalışmalarımızı sürdürmekteyiz. Bir başka açıklığa kavuşturulması gereken nokta da La^{3+}'un agonist yanıtları üzerindeki beklenmedik inhibe edici etkisinin mekanizmasıdır. Bu etkide rol alabilecek olası mekanizmalar La^{3+}'un reseptör agonist etkileşmesini engellemesi, reseptör g-proteini kenetini bozması, IP_3 yapımını etkilemesi yada hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımını bozmasıdır. Bu mekanizmalardan hangisinin ya da hangilerinin geçerli olduğunun tam olarak anlaşılabilmesi için yeni deneyler gerekmektedir.



Şekil 4.1. **A**. Dereceli Ca^{2+} salınımını açıklamak için önerilen modellerden depolardan Ca^{2+} salınımının durmasını gerektirmeyen modellerin (Model III) şematik gösterimi. Ca^{2+} yanıtının çıkış fazında salınım baskınken, durma ve düşme fazında SERCA ve PMCA baskındır. **B**. Dereceli Ca^{2+} salınımını açıklamak için önerilen modellerden depolardan Ca^{2+} salınımının durmasını gerektiren modellerin (Model III ve IV) şematik gösterimi. Ca^{2+} yanıtının çıkış fazında salınım baskınken, durma ve düşme fazında salınım durur ve SERCA ve PMCa etkisi ile $[Ca^{2+}]_i$ düşer. **C.** Ca^{2+} yanıtları üzerine La^{3+}'un olası etkisi. A daki modelin geçerli olması durumunda yanıt oluştuktan sonra PMCA'nın blokajı Ca^{2+} yanıtının düşme fazını yavaşlatır. Bu sırada reseptör uyarısının kesilmesi ve IP_3'ün azalması, devam eden Ca^{2+} salınımını durduracağı için yanıtın düşme hızını arttıracaktır. **D**. Eğer B deki model doğru ise reseptör'ün blokajı Ca^{2+}, salınımı zaten durmuş olduğu için La^{3+}'un üzerine ek bir etki göstermeyecektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Memeli kültür hücresi kullanarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, kuantal kalsiyum salınımında SERCA'nın rolünü anlamaya çalıştık. Ca^{2+}'suz ortamda gerçekleştirdiğimiz deneylerde, LTK-8 hücrelerinde ardışık ATP uygulaması ile kuantal kalsiyum salınımı oluştuğunu görüldü. LTK-8 ve RAT-1 hücrelerinde agonist uyarımı öncesinde SERCA'nın blokajının Ca^{2+} yanıtların azalma kinetiklerine belirli etkisinin olmadığını gözlemledik. Ca^{2+} yanıtının sonlandırılmasında etkin pompanın PMCA olabileceği düşüncesi ile agonist uyarımının hemen ardından kullandığımız PMCA blokörü La^{3+}'un da yanıt kinetiğine önemli bir etkisi olmamıştır. Ancak La^{3+} ve CPA'nın beraber kullanılması ile Ca^{2+} yanıtlarının azalma kinetiklerinde belirgin br yavaşlama oluşturulabildik. LTK-8 hücrelerinde ATP yanıtlarının bazal seviyeye dönmesinden sonra uygulanan CPA geçici ve ani bir Ca^{2+} yanıtına neden oldu. Bu bulgular SERCA ve PMCA'nın kooperatif olarak çalıştıklarını ve kuantal kalsiyum salınımında belirleyici rol oynadıklarını göstermektedir. Ayrıca La^{3+}'un ATP ve fenilefrin yanıtlarını doğrudan bloke edici bir etkisi olduğu da gözlendi. Bu etkinin La^{3+}'un seçici bir PMCA blokörü olarak kullanılmasında sorun oluşturabileceği düşüncesi ile PMCA'nın hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun azaltılmasındaki ve kuantal Ca^{2+} salınımındaki rolünün ve La^{3+}'un etki mekanizmasının araştırılabilmesi için La^{3+}'un reseptör yanıtlarını bloke etmediği bir hücre sistemi aranmaktadır.

ÖZET

Memeli Hücre Kültüründe ATP Uygulaması ile Oluşan Kuantal Kalsiyum Salınımında SERCA'nın Rolünün Araştırılması

Dinlenim durumunda sitoplazmadaki Ca^{2+} konsantrasyonunu ($[Ca^{2+}]_i$), hücre membranında ve endoplasmik retikulumda (ER) bulunan Ca^{2+} pompaları düşük seviyelerde tutar. Ancak, agonist uyarımı ile açılan inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) kapılı Ca^{2+} kanallarından sitoplazmaya salınan Ca^{2+} kendi salınımını indükler (Calcium-induced calcium release) ve sitoplazmadaki $[Ca^{2+}]$'nun birkaç misli artmasına neden olur. Bu artış, agonist uyarımı devam ederken dahi bir müddet sonra durur ve sitoplazmadaki Ca^{2+} konsantrasyonu dinlenim durumuna yakın bir değere döner. "Kuantal" ya da "kademeli" kalsiyum salınımı olarak adlandırılan bu olguyu açıklamak için çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Bu çalışmamızın amacı agonist uyarımı sonucunda oluşan "kuantal" ya da "kademeli" kalsiyum salınımının oluşmasında ve Ca^{2+}'un sitoplazmadan uzaklaştırılmasında Ca^{2+} ATPazların rolünü incelemektir.

LTK-8 ve RAT 1 kültür hücreleri, Fura-2 asetoksimetil ester (fura-2 AM) ile yüklenip $[Ca^{2+}]_i$'nu bir mikrospektroflorimetre ve bir CCDI kamera ile ölçüldü. Deneyler sırasında agonist (ATP ve Fenilefrin) uyarıları ile oluşan Ca^{2+} yanıtları F340/380 sinyal oranı olarak bilgisayara aktarıldı.

LTK-8 hücrelerinde, ATP uyarısı ile kuantal kalsiyum salınımı gerçekleştirdiğini gördük Bu hücrelerde, submaksimal doz agonist yanıtının ardından verilen SERCA blokörü CPA, ani ve geçici bir Ca^{+2} yanıtı oluşturdu. CPA ve La^{3+} kullanılarak SERCA ve PMCA ayrı ayrı bloke edildiği zaman hem RAT-1 hem de LTK-8 hücrelerinde Ca^{+2} yanıtlarındaki azalmanın hızına belirgin bir etki gözlemedik. Ancak iki blokörün birlikte verilmesi belirgin bir etki yaratabildi. Yaptığımız gözlemler hem SERCA'nın hem de PMCA'nın Ca^{+2} salınımın dereceli özellik göstermesinde rolleri olduğunu ve dereceli salınımda Ca^{+2} çıkışının azalmasında daha çok bunun rolü olduğunu ve bu iki Ca^{2+} pompasının ortaklaşa bir ilişki içinde çalıştıklarını düşündürmektedir.

Elde ettiğimiz bir önemli bulgu da La^{3+}'un IP_3 kenetli Ca^{+2} yanıtlarını bloke etmesidir. Bu beklenmedik etkinin nedenlerinin araştırılması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Kuantal kalsiyum salınımı, IP_3, SERCA, PMCA, P_2Y

SUMMARY

The Investigation of the Role of SERCA in ATP-Induced Quantal Calcium Release In Mammalian Culture Cells

In the steady state conditions, leakage and plasma membrane and endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps hold cytoplasmic Ca^{2+} concentration at low levels. However, after the agonist stimulation, released Ca^{2+} via IP_3-gated Ca^{2+} release channels induce its own release which causes a few fold increase in the cytoplasmic [Ca^{2+}]. Despite the continuation of agonist stimulation, this increase stops after a while and cytoplasmic calcium concentration returns to its basal levels. To explain this phenomenon, which is called as "Quantal" or "Graded Calcium Release", some hypothesis have been proposed. The purpose of this study is to investigate the role of of Ca^{2+} ATPases in the quantal calcium release seen after agonist stimulation and also in the Ca^{2+} removal from the cytoplasm.

LTK-8 and RAT1 culture cells were loaded with Fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM) and Ca^{2+} responses to the agonist stimulation (ATP and phenylephrine) were measured by a microfluorimetric system and a CCDI camera and transferred to the computer programme as F340/380 signal ratio.

LTK-8 cells, showed quantal calcium release. We have observed a sudden but transient release due to SERCA blockage by CPA when applied after the submaximal dose ATP (10^{-6} M) response. Blokage of PMCA by La^{3+} or SERCA by CPA itself did not effect the decrease rate of cytoplasmic [Ca^{2+}]. Only simultaneous application of both blockers had an effect on this decrase rate. Our results indicate that SERCA and PMCA may have a prominent role in quantal calcium release and that these two Ca^{2+} pumps may be functioning in close cooperation with each other.

Another interesting finding in this study is the unexpected inhibitory effect of La^{3+} on agonist induced Ca^{2+} responses. Further experiments are needed to clarify the mechanism of this effect.

Key Words: Quantal calcium release, IP_3, SERCA, PMCA, P_2Y.

KAYNAKLAR

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (2002). Molecular Biology of the Cell: Fourth Edition.Garland Publishing INC., p.: 852-862.

BERRIDGE, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**: 315-325

BEZPROZVANNY, I., WATRAS, J., ERLICH, B.E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of ıns(1,4,5)P_3-and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, **351**: 751-754.

BOOTMAN, M.D., CHEEK, T.R., MORETON R.B., BENNETT D.L., BERRIDGE, M.J. (1994). Smoothly graded Ca^{2+} release from Inositol 1,4,5-Trisphosphate-sensitive Ca^{2+} stores. *J. Biol. Chem.*, **269**: 24783-24.

COMBETTES, L., HANAERT-MERAH, Z., COQUIL, J., ROUSSEAU, C., CLARET, M., SWILLENS, S., CHAMPEIL, P. (1994). Rapid filtration studies of the effect of cytosolic Ca^{2+} on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced $^{45}Ca^{2+}$ release from cerebellar microsones. *J. Biol. Chem.*, **269**: 17561-17571.

DAWSON, A.P., LEA, E.J., IRVINE, R.F. (2003). Kinetic model of the inositol trisphosphate receptor that shows both steady-state and quantal patterns of Ca^{2+} release from intracellular stores. *Biochem. J.*, **370**: 621-629.

DETTBARN, C., PALADE, P. (1997). Ca^{2+} feedback on "quantal" Ca^{2+} release involving ryanodine receptors. *Mol. Pharm.*, **52**: 1124-1130.

FINCH, E.A., TURNER, T.J., GOLDIN, S.M. (1991). Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-ınduced calcium release. *Science*, **252**: 443-446.

GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., TSIEN, R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**: 3440-3450.

IINO, M., ENDO, M. (1992). Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release. *Nature*, **360**: 76-78.

IRVINE, R.F. (1991). Inositol tetrakis phosphate as a second messenger: Confusions, contradictions and a potential resolution.*Bio Essays* **13**: 419-427.

KOIZUMİ, S., LIPP, P., BERRIDGE, M.J., BOOTMAN, M.D. (1999). Regulation of ryanodine receptor opening by lumenal Ca^{2+} underlies quantal Ca^{2+} release in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **247**: 33327-33333.

KWAN, C.Y., TAKEMURA, H., OBIE, J.F., THASTRUP, O., PUTNEY, J.W. (1990) Effects of MeCh, thapsigargin, and La^{3+} on plasmalemmal and intracellular Ca^{2+} transport in lacrimal acinar cells. *Am. J. Physiol.*, **258**: C1006-C1015.

MAK, D.D., MCBRIDE, S., FOSKETT, J.K. (1998). Inositol 1,4,5-tris-phosphate receptor Ca^{2+} channel by ligand tuning of Ca^{2+} inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 15821-15825.

MORGAN, A.J., JACOB. R. (1998). Differential modulation of the phases of a Ca^{2+} spike by the store Ca^{2+}-ATPase in human umbilical vein endothelial cells. *J. Physiol.*, **513**.1: 83-101.

MUALLEM, S., PANDOL, S.J., BEEKER, T.G. (1989). Hormone-evoked calcium release from intracellular stores is a quantal process. *J. Biol. Chem.*, **264**: 205-212

PETERSEN, C.C.H., PETERSEN O.H., BERRIDGE, M.J. (1993). The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.*, **268**: 22262-22264.

STEENBERGEN, J.M., FAY, F.S. (1995). The quantal nature of calcium release to caffeine in single smooth muscle cells results from activation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **271**: 1821-1824.

ÖZGEÇMİŞ

Adı:	Figen
Soyadı:	Amber
Doğum yeri ve tarihi:	Ankara - 28.10.1977
Uyruğu:	T.C.
Medeni durumu:	Bekar
İletişim adresi ve telefonu:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biofizik A.B.D. – 03123103010/337

EĞİTİMİ

Gaziantep Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fizik Mühendisliği. (1995-2000)
İstiklal Makzume Anadolu Lisesi İskenderun. (1988-1995)
İskenderun Demir Çelik Fabrikaları İlkokulu. (1983-1988)

Yabancı dili: İngilizce

MESLEKİ DENEYİMİ

Araştırma Görevlisi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik A.B.D.(22.11.2002 _ -)

Yayınları: Amber, F. Uğur M. (2003) Kültür hücrelerinde agonist uyarımı ile oluşan $[Ca^{2+}]_i$ değişikliğinde Ca^{2+} ATPaz'ların rolü. 15. Ulusal Biyofizik Kongresi, Denizli. Poster Sunumu.

Verdiği Seminerler: Floresans Spektroskopisinde Kullanılan Teknikler. (2002)