

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HL-1 HÜCRELERİNDE Na^+/H^+ DEĞİŞ-
TOKUŞÇUSUNUN REGÜLASYONUNDA HİPOKSİ İLE
İNDÜKLENEN FAKTÖRLERİN ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

Gül ŞİMŞEK

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ

ANKARA
2016

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum 'HL-1 Hücrelerinde Na⁺/H⁺ Değiş-tokuşcusunun Regülasyonunda Hipoksi ile İndüklenen Faktörlerin Rolünün İncelenmesi' başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Gül ŞİMŞEK

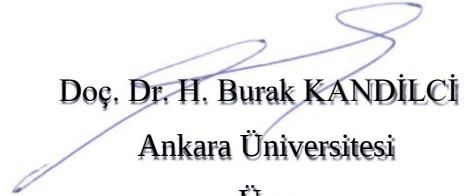
18.07.16

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Anabilim Dalında Gül ŞİMŞEK tarafından hazırlanan ‘HL-1 Hücrelerinde
Na⁺/H⁺ Değiş-Tokuşçusunun Regülasyonunda Hipoksi ile İndüklenen Faktörlerin
Rolünün İncelenmesi’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS
TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01.08.16


Prof. Dr. Nuhan PURALI
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. K. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	
1.1. Memeli Kardiyomiyositlerinde Hücre İçi pH Regülasyonu	1
1.2. Memeli Kardiyomiyositlerinde NHE-1'in Yapısı ve Regülasyonu	2
1.3. Hipokside Hücre İçi pH Dengesi ve Hipoksi ile İndüklenen Faktör	4
1.4. Hipoksik Koşullarda NHE Aktivitesi	6
1.5. Çalışmanın Amacı	7
2. GEREÇ ve YÖNTEM	
2.1. HL-1 Hücre Kültürü	8
2.2. Hipoksinin Oluşturulması	8
2.3. İmmünofloresans	9
2.4. Hücrelerden NHE Aracılı H ⁺ Atımının Ölçümü	10
2.4.1. Hücre İçi pH'nın Ölçülmesi	10
2.4.2. HL-1 Hücrelerinin Süperfüzyonu	11
2.4.3. Kullanılan Solüsyonlar	11
2.4.4. HL-1 Hücrelerinde Doğal Tamponlamanın Hesaplanması	12
2.4.5. HL-1 Hücrelerinde NHE Akısının Hesaplanması	14
2.5. HL-1 Hücrelerinde mRNA Ölçümü	15
2.5.1. Toplam RNA İzolasyonu	15
2.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	15
2.5.3. Primer Tasarımı	15
2.5.4. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)	16
2.6. HL-1 Hücrelerinde Protein Miktar Tayini (Western Blot)	17
2.7. İstatistik	18
3. BULGULAR	
3.1. HL-1 Hücrelerinden Asit Atımında NHE-1'in Rolünün Belirlenmesi	19
3.2. HL-1 Hücrelerinde 48 saatlik Hipoksik İnkübasyonun NHE Aktivitesine Etkisi	22
3.3. HL-1 Hücrelerinde Akut Anoksi ve 24 Saatlik Hipoksik İnkübasyonun NHE Aktivitesine Etkisi	24
3.4. HL-1 Hücrelerinde Hipoksi ve Normokside DMOG İnkübasyonunun Hücre İçi Hif-1 α Miktarına Etkisi	27
3.5. HL-1 Hücrelerinde Normokside 48 Saatlik DMOG İnkübasyonunun NHE Aktivitesine Etkisi	31

3.6. HL-1 Hücrelerinde Hipoksi ve Normokside DMOG İnkübasyonunun NHE Ekspresyonuna Etkisi	32
4. TARTIŞMA	35
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	40
ÖZET	41
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	47



ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, HL-1 hücrelerinde sodyum hidrojen değiş-tokuşçusu fonksiyonunun Hif-1 α tarafından regüle edilebileceğini öne sürmektedir. Bu bulgu kalpte hipoksi ile karşılaşılan durumlarda tedavi stratejileri geliştirilmesinde önemli olabilir.

Tez çalışmam süresince çalışmanın yapılması için gerekli desteği sağlayan değerli danışmanım Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ'ye teşekkür ederim.

Çalışmaların yürütülmesindeki katkı ve destekleri için Prof. Dr. Mehmet UĞUR, Prof. Dr. H. Ongun ONARAN, Prof. Dr. Özlem UĞUR, Doç. Dr. Kemal SAYAR ve Prof. Dr. Belma TURAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince hep yanımda olan ve her zaman desteklerini hissettiğim aileme sabır, anlayış ve destekleri için teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AC	Adenilil siklaz
AP-2	Aktive edici protein-2
APS	Amonyum per sülfat
AM	Asetometil ester
ATP	Adenozin trifosfat
β	Beta
β_i	Hücre içi doğal tamponlama kapasitesi
BCECF	5 (ve -6) karboksiflorescein
BDM	2,3-butandion monoksim
CAII	Karbonik anhidraz II
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CaM	Kalmodulin
cAMP	Siklik adenozin mono fosfat
CBE	Klor-Bikarbonat değiş-tokuşçusu
CD	Sitoplazmik bölge
cDNA	Komplementer DNA
cGMP	Guanozin mono fosfat
CHE	Klor-Hidroksil değiş-tokuşçusu
CHP	Kalsinörin homolog protein
CO ₂	Karbondioksit
CREB	cAMP duyarlı bağlayıcı protein
DMOG	Dimetiloksalilglisin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DT	Diatonit
Erk1/2	Hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz
FBS	Fetal sığır serumu
GC	Guanilil siklaz
H ⁺	Hidrojen iyonu

H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat iyonu
Hepes	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinethanosulfonik asit
Hif	Hipoksi ile indüklenen faktör
HRE	Hipoksiye duyarlı element dizileri
KCl	Potasyum klorür
J _{NHE}	NHE aktivitesi
MCT	Laktat-H ⁺ ko-transportu
MES	(N-morfolino) etanosülfonik asit
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mRNA	Mesajcı RNA
N ₂	Azot gazı
Na ⁺	Sodyum iyonu
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum fosfat
NaOH	Sodyum hidroksil
NBC	Sodyum-Bikarbonat ko-transportörü
NH ₃	Amonyak
NH ₄ ⁺ _i	Hücre içi amonyum
NH ₄ ⁺ _o	Hücre dışı amonyum
NH ₄ Cl	Amonyum klorür
NHE	Sodyum-Hidrojen değiş-tokuşçusu
NMDG	N-metil-D-glukamin
NO	Nitrik oksit
NP-40	Nonidet P-40
OH ⁻	Hidroksil iyonu
p160ROCK	p160 Rho-ilişkili kinaz
p38 MAPK	Mitojen ile aktifleşen protein kinaz
p90 ^{rsk}	p90 ribozomal S6 kinaz
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PKB	Protein kinaz B
PKC	Protein kinaz C
pH _i	Hücre içi pH
pH _o	Hücre dışı pH
PHD	Prolil hidroksilaz
PO ₂	Parsiyel oksijen basıncı
PP1	Protein fosfataz 1
PP2A	Protein fosfataz 2
RNA	Ribo nükleik asit
SEM	Ortalamanın standart hatası
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SHP-2	Tirozin fosfataz
SNP	Sodyum nitroprusitin
TMD	Trans membran bölgesi
Ub	Ubikutin proteini
VHL	Von Hippel Lindau

ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Kardiyomiyositlerde NHE-1'in aktivitesini kontrol eden bazı önemli agonist, reseptör ve reseptör sonrası alt yolları gösteren şema. NHE-1'in stimülasyonu (sağda) veya inhibisyonu (solda) reseptörlerin (italik) ve diğer bazı ligandların (italize değil) aktivasyonu ile olmaktadır. Aracı protein kinazlar açık gri, NHE-1 koyu gri ile gölgelendirildi. 815 amino asitlik NHE-1'in membranda yer alan trans membran kısmı (TMD) iyon transportunu gerçekleştirirken dimer şeklindedir. NHE-1 aktivitesi büyük ölçüde karboksi ucundaki sitoplazmik bölgenin (~300 amino asit, CD) fosforilasyonu (P) ile kontrol altındadır. Kısaltmalar için metine bakınız (Vaughan-Jones ve ark., 2009 makalesinden adapte edilmiştir). 4
- Şekil 1.2.** Hücre içindeki Hif-1 α sinyali ve yıkımını gösteren şematik model. Normoksida (% 21 PO₂) Hif-1 α 'daki prolin rezidüleri (Pro-402, Pro-564) prolil hidroksilaz (PHD) tarafından hidroksillenir. Hif-1 α 'nın hidroksillenmesi Von Hippel Lindau (VHL) adlı E3 ubiquitin (Ub) ligaz ile Ub takılmasına ve proteozomal yolda yıkılmasına yol açar. Hipoksida ise (~% 21'in altında PO₂) hidroksilasyon baskılandığından Hif-1 α sitoplazmada birikir ve çekirdeğe transloke olarak Hif-1 β ile birleşir. Bu heterodimer hedef genlerin hipoksiye duyarlı element (HRE) bölgelerini bağlanarak transkripsiyonlarını etkiler (Province ve ark., 2013s:116'dan adapte edilmiştir). 6
- Şekil 2.1.** *Chamber*'in resmi (A) ve içindeki oksijen konsantrasyonunun düşürülmesini gösteren örnek trase (B). Normal atmosfer basıncındaki (normoksi) oksijen (~158 mmHg, % 100) hipoksi sırasında % 3'e (~4-5 mmHg) düşmektedir. 9
- Şekil 2.2** pH boyasının emisyon oranlarının pH_i değerlerine çevrildiği kalibrasyon denklemi. R: emisyon oranı, R_{min}: minimum emisyon oranı, R_{maks}: maksimum emisyon oranı, pK_a: BCECF pK_a'sı, ve pH_o: hücre dışı çözeltinin pH'sını göstermektedir. Ölçüm değerlerine oturtulan eğriden emisyon sinyal oranının pH değerine dönüştürülebilmesi için yukarıdaki formülün ters fonksiyonu kullanıldı. 11
- Şekil 2.3.** Hücre içi doğal tamponlama hesaplanmasında kullanılan deneysel protokol. Süperfüzyon çözeltisinden kademeli olarak amonyum konsantrasyonunun azaltılması ile hücre içi asit yüklenmektedir. Doğal tamponlamadaki ortalama pH_i asit yüklenmelerinin başlangıç ve bitiş noktalarından hesaplandı. pH_i'nin asit olduğu değerde ortama 1 μ M selektif NHE-1 blokörü zoniporid eklendi. 13
- Şekil 2.4.** Hücre içi doğal tamponlamanın (β_i) hesaplandığı denklemler 14
- Şekil 2.5.** NHE-1 akısının hesaplanmasında kullanılan denklem 14
- Şekil 3.1.** HL-1 hücresinden asit uzaklaştıran mekanizmalar. A) HL-1 hücresindeki NHE izoformları ve NBCe1'in mRNA ekspresyonları. PCR ürünleri etidyum bromür içeren % 2 agaroz jelde ayrıştırıldı. B) HL-1 hücresinde pH duyarlı boya BCECF-AM ile elde edilen hücre içi pH (pH_i). Deney, pH'sı 7,4 olan Hepes tamponlu tirod çözeltisinde yapıldı. HL-1 hücreleri ilk önce 20 mM NH₄Cl ile süperfüze edildi. Daha sonra NH₄Cl hızla uzaklaştırılınca hücreye asit yüklemesi olmaktadır (amonyum ön işlemi). Hücre asit yükünü atmaya başladığında ortamdaki Na⁺ uzaklaştırılıp yerine NMDG konuldu ve asit atımı durdu. Trasenin son kısmında süperfüzyona Na⁺ geri konulduğunda asitten kurtulma bazal pH_i'ye kadar devam etmektedir. C) Aynı hücre grubundan ard arda alınan kontrol ve NHE-1 inhibitörü zoniporid (1 μ M) varlığında elde edilen asitten kurtulma eğrileri. Zoniporid hücrenin asit uzaklaştırmasını (dpH_i/dt) büyük oranda yavaşlattı. C'deki hücrelerden hesaplanan kontrol ve zoniporid varlığındaki (diğer) pH_i'ye göre asit atım miktarı. Kontrol ve zoniporid varlığındaki asit atım miktarı arasındaki fark NHE-1'in attığı asit atımını göstermektedir. 21

- Şekil 3.2.** 48 saat hipoksida (% 3 PO₂, gri trase) veya normoksida (atmosferik PO₂,siyah trase) tutulan HL-1 hücrelerine amonyum ön işlemi ile asit yüklendikten sonra hücrelerin üst üste getirilmiş asitten kurtulma eğri örnekleri. 23
- Şekil 3.3.** Normoksik kontrol (siyah) ve 48 saat hipoksi (gri) gruplarında pH_i'ye bağımlı hücre içi doğal tamponlama (β_i) değerleri. β_i ortalama değerleri birbirini takip eden yaklaşık 0,3 pH ünitelik dilimlerden hesaplandı (n=7-14). Grafikteki sürekli eğri metotta bahsedilen fizyolojik tamponlama denkleminde hesaplandı. 23
- Şekil 3.4.** pH_i'ye bağlı NHE aktivitesi. Ortalama NHE aktivitesi pH_i 6,7-7,2 aralığında ve 0,05'lik dilimlerde gösterildi. 48 saat hipoksik hücrelerden kayıt hipoksik *chamber*'in açılmasından ve hücrelerin atmosferik PO₂ maruz kalmasından sonra iki saat içerisinde alındı. 48 saat hipoksi (gri) normoksik kontrol (siyah) hücrelere göre NHE aktivitesini azalttı (n=6-11, * p<0,05). 24
- Şekil 3.5.** HL-1 hücresinden ard arda alınan asitten kurtulma eğrileri. İlk eğri normoksik şartlarda (atmosferik PO₂'de) alındı. İkinci eğride, ortamdan oksijen uzaklaştırılarak (1 mM sodyum diatinit (DT) + 100% N₂ ile gazlandırılan süperfüzyon solüsyonuna geçildi) hücre 10 dk.anoksida tutuldu. Anoksi bazal pH_i'yi aside kaydırıldı. 3. eğri DT ortamdan yıkandıktan sonra tekrar normoksida elde edildi. Kesikli çizgi pH_i: 6,95'de anoksida asitten kurtulmanın durduğunu, normoksida (1 ve 3. eğriler) ise aynı pH_i'de aktivitenin devam ettiğini göstermektedir. 25
- Şekil 3.6.** Normoksik kontrol (siyah) ve 24 saat hipoksi (gri) gruplarında pH_i'ye bağımlı hücre içi doğal tamponlama (β_i) değerleri. β_i ortalama değerleri birbirini takip eden yaklaşık 0,3 pH ünitelik dilimlerden hesaplandı (n=6-14). Grafikteki sürekli eğri metotta bahsedilen fizyolojik tamponlama denkleminde hesaplandı. 26
- Şekil 3.7.** pH_i'ye bağlı NHE aktivitesi. Ortalama NHE aktivitesi pH_i 6,7-7,1 aralığında ve 0,05'lik dilimlerde gösterildi. 24 saat hipoksik hücrelerden kayıt hipoksik *chamber*'in açılmasından ve hücrelerin atmosferik PO₂ maruz kalmasından sonra iki saat içerisinde alındı. 24 saat hipoksi (gri) ile normoksik kontrol (siyah) hücrelere göre NHE aktivitesi istatistiksel olarak değişmedi ancak inhibisyon eğilimi gözlemlendi (n=5). 26
- Şekil 3.8.** HL-1 hücrelerinde 5 saatlik hipoksi ve normoksida DMOG (1 mM) inkübasyonu sonrasında hücre içi Hif-1 proteininin çekirdeğe translokasyonunu gösteren konfokal görüntüsü. Hücreler sırasıyla Hif-1 α primer antikoru, Alexa flor 594 sekonder antikoru(kırmızı) ve 2,5 μ M Yo-Pro-1 DNA boyası ile inkübe edildi. Hücre çekirdek sınırları Yo- pro-1 sinyalinin filtrelendikten sonra gri skalaya (beyaz) dönüştürülmesi ile elde edildi. Normoksida 5 saat DMOG ile inkübe edilen hücreler (C) ve normoksik kontrol hücreleri (A). 5 saat hipoksida (% 3 PO₂) tutulan hücreler (D) ve normoksik kontrolleri (B) (n:3). 28
- Şekil 3.9.** HL-1 hücrelerinde 48 saatlik hipoksi ve normoksida DMOG (1 mM) inkübasyonu sonrasında hücre içi Hif-1 proteininin çekirdeğe translokasyonunu gösteren konfokal görüntüsü. Hücreler sırasıyla Hif-1 α primer antikoru, Alexa flor 594 sekonder antikoru (kırmızı) ve 2,5 μ M Yo-Pro-1 DNA boyası ile inkübe edildi. Hücre çekirdek sınırları Yo- pro-1 sinyalinin filtrelendikten sonra gri skalaya (beyaz) dönüştürülmesi ile elde edildi. Normoksida 48 saat DMOG ile inkübe edilen hücreler (C) ve normoksik kontrol hücreleri (A). 48 saat hipoksida (% 3 PO₂) tutulan hücreler (D) ve normoksik kontrolleri (B) (n:3). 29
- Şekil 3.10.** HL-1 hücrelerinde hipoksi ve normoksida DMOG inkübasyonu sonrasında sitoplazma (A) ve çekirdekteki (B) konfokal mikroskopta immüno Floresans birim alan başına düşen şiddet ölçümünden hesaplanan Hif-1 α miktarları. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ve normoksiye göre normalize edilerek verilmiştir. # 5 saat hipoksiye göre, † 5 saat normoksi + DMOG'a göre, * normoksiye göre p<0,05 (n:3). 30

Şekil 3.11. 48 saat normoksik kontrol (siyah) ve 48 saat normoksida 1 mM DMOG ile inkübe edilen (gri) gruplarda pH_i 'ye bağımlı hücre içi doğal tamponlama (β_i) değerleri. β_i ortalama değerleri birbirini takip eden yaklaşık 0,3 pH ünitelik dilimlerden hesaplandı (n=7-14). Grafikteki sürekli eğri metotta bahsedilen fizyolojik tamponlama denkleminde hesaplandı. 31

Şekil 3.12. pH_i 'ye bağlı NHE aktivitesi. Ortalama NHE aktivitesi pH_i 6,7-6,95 aralığında ve 0,05'lik dilimlerde gösterildi. 48 saat normoksida 1 mM DMOG inkübasyonu (gri) 48 saat normoksik kontrol (siyah) hücrelere göre NHE aktivitesini azalttı (n=4, * p<0,05). 32

Şekil 3.13. HL-1 hücrelerinde 48 saatlik hipoksi (A) ya da normoksida DMOG inkübasyonu sonrasında (B) NHE-1 (ana izoform) ve β -aktin (yükleme kontrolü)'e ait western blot (n=3-4, *p<0,05). Western blotların dansitometrik analizi (C). 48 saat hipoksi sonrasında RT-PCR'da elde edilen NHE-1 mRNA miktarı (D) (n=3). 33

Şekil 3.14. HL-1 hücrelerinde 48 saatlik normoksi kontrol (A) ile 48 saatlik hipoksi sonrası (B) NHE-1 proteininin lokalizasyonuna immüno Floresans görüntüleri. 48 saatlik hipoksi NHE-1 lokalizasyonunu değiştirmeden sitoplazma ve çekirdeğe ait toplam floresans sinyalinde az miktar artış oluşturdu (C). Hücreler sırasıyla NHE-1 primer antikoru, Alexa flor 594 sekonder antikoru (yeşil) ve 2,5 μ M Yo-Pro-1 DNA boyası ile inkübe edildi. Hücre çekirdek sınırları Yo-pro-1 sinyalinin filtrelendikten sonra gri skalaya (beyaz) dönüştürülmesi ile elde edildi (n=3). 34

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Deneylerde kullanılan primerlerin sekans, erime sıcaklıkları ve çoğalttıkları baz çifti uzunlukları

16

Çizelge 2.2. Protein miktar tayini için kullanılan jeller

17



1. GİRİŞ

1.1. Memeli Kardiyomiyositlerinde Hücre İçi pH Regülasyonu

Kardiyomiyositlerde metabolizma sonucu oluşan hidrojen iyonu (H^+) doğrudan ya da H^+ eşdeğer iyon transportu ile hücreden uzaklaştırılır (Hulikova ve ark., 2012). Hücre yüzey membranında yer alan bu transportörlerin başlıcaları; Sodyum-Hidrojen değiş-tokuşçusu (Sodium hydrogen exchanger; NHE), Sodyum-Bikarbonat ko-transportörü (Sodium bicarbonate co-transporter; NBC) ve ATP bağımlı H^+ dışarı atan pompalardır (V tipi ATPaz). Hücre içi pH (pH_i) alkaliye kaydığında ise, hücre içine Klor-Bikarbonat değiş-tokuşçusu (Chloride bicarbonate exchanger; CBE) ve Klor-Hidroksil değiş-tokuşçusu (Chloride hydroxyl exchanger; CHE) ile H^+ eşdeğer asit yüklenir. Böylece hücre bazal pH_i 'sını 7,2 civarında tutar (Leem ve ark., 1999). H^+ eşdeğer iyon transportu, bikarbonat (HCO_3^-) ve hidroksil (OH^-) iyonlarının taşınması ile olur. HCO_3^- iyonu hücreye alındığında hücre içindeki H^+ 'nu nötralize ederek CO_2 olarak atılır. Benzer şekilde OH^- iyonunun hücreden uzaklaştırılması H^+ açığa çıkarır. Bu reaksiyonlar H^+ 'nın hücreden doğrudan atılması veya alınmasına eşdeğerdir (Sun ve ark., 1996). Anaerobik koşullarda, ilave olarak laktat- H^+ ko-transportunun da (H^+ -monocarboxylate transporters; MCT) pH_i regülasyonuna katkısı vardır (Poole ve ark., 1989). H^+ eşdeğer transport hızı esas olarak pH_i 'ya bağlıdır. pH_i aside kaydıkça NHE ve NBC'nin aktivesi artarken, pH_i 'nın alkaliye kayması CHE ve CBE aktivitesini artırır. Değiş-tokuşçuların aktivitesi hücre dışı pH (pH_o) ile de kontrol edilir. pH_o asite kayması kobay ventriküler miyositlerinde NHE ve NBC aktivitesini azaltırken, CHE ve CBE aktivitesini artırmaktadır (Niederer ve ark., 2008).

Memeli kardiyomiyositlerinde asit atımından sorumlu ana membran proteini NHE-1, bu işlevini hücre içi H^+ ile hücre dışı Na^+ iyonunun (Na^+) elektronötral değiş-tokuşu ile gerçekleştirir (Liu ve ark., 2015). NHE-1, özellikle asidik pH_i 'da hücre dışına asit atımının yaklaşık % 60'ından sorumlu olan yüksek kapasiteli yapısal izoformdur (Goss ve ark., 1994; Lawrence ve ark., 2010). NHE-1 yaygın

olarak birçok dokuda bulunmaktadır (Lawrence ve ark., 2010; Parker ve ark.,2015). Farelerde NHE-1 geninin silinmesi doğum sonrası gelişimi azaltırken, ölüm oranını, ataksiyi ve epilepsi krizlerini artırır (Cox ve ark., 1997). NHE-1'in fenotip gelişiminde önemli role sahip olduğu öne sürülmüştür (Liu ve ark., 2015). NHE-1 gen defekti olan insanlarda ataksi ve duyma kaybı ortaya çıkmıştır (Guissat ve ark., 2015).

Na^+/H^+ değiş-tokuşucusu ilk kez sıçan bağırsak ve böbrek mikrovilluslarında gösterilmiş ve NHE-1 ilk defa 1989 yılında klonlanmıştır (Murer ve ark., 1976; Sardet ve ark., 1989). Bu güne kadar memelilerde 9 adet NHE izoformu tanımlanmıştır (Slepkov ve ark., 2007). NHE-1 kalp kası plazma membranında, NHE-2 ve NHE-3 bağırsak ve böbrekte, NHE-4 midede, NHE-5 beyinde, NHE-(6-9) ise, hücre içi kompartmanlarda yer almaktadır (Cavet ve ark., 2001; Karmazyn ve ark., 1999; Nakamura ve ark., 2005; Slepkov ve ark., 2007).

1.2. Memeli Kardiyomiyositlerinde NHE-1'in Yapısı ve Regülasyonu

NHE-1, 815 amino asit uzunluğundadır. Bu proteinin membranda yer alan bölgesi (hidrofobik ilk 1-500 amino asitlik amino ucu) H^+ transportundan sorumludur. Karboksi ucunun bulunduğu sitoplazma içindeki bölge (501-815 amino asitlik kısım) ise, transportun regülasyonunda görev alır (Liu ve ark., 2015; Baumgartner ve ark., 2004, Şekil 1.1). NHE-1'in pH_i regülasyonunun yanı sıra hücre farklılaşması, hücre büyümesi, hücre hacmi kontrolü, hücre iskeleti organizasyonu ve hücre göçünden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Fliegel, 2005; Liu ve ark, 2015). Ayrıca, NHE-1 iskemi-reperfüzyon hasarında ve kalp hipertrofisinde de rol oynamaktadır (Lee ve ark., 2013).

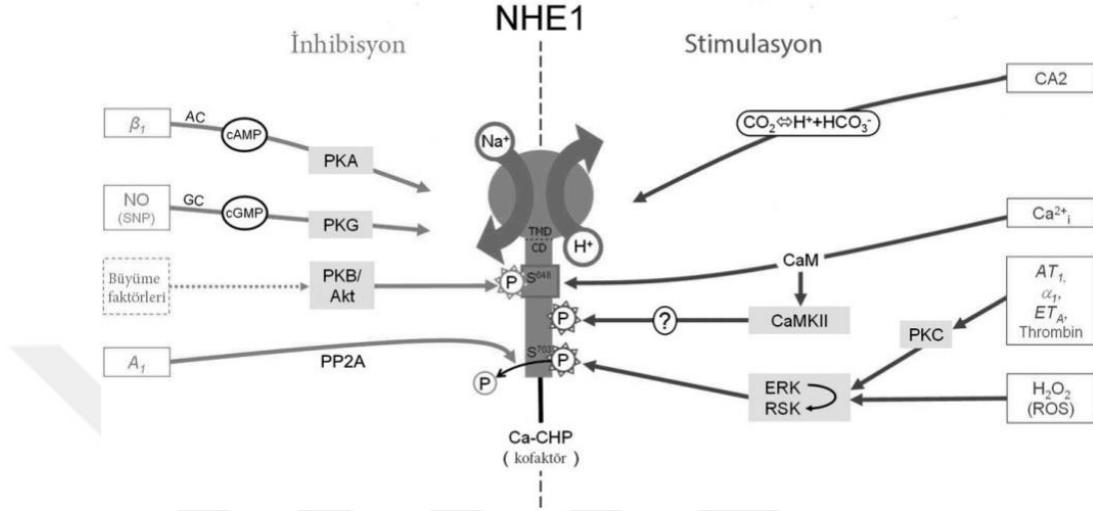
NHE-1'in sitoplazmik karboksi ucu çeşitli kinazlar (hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz (Erk1/2), p90 ribozomal S6 kinaz (p90^{rsk}), p160 Rho-ilişkili kinaz (p160ROCK) ve mitojen ile aktiveleşen protein kinaz (p38 MAPK) gibi) tarafından fosforilasyonu NHE-1 aktivitesini artırmaktadır (Lee ve ark., 2013; Fliegel, 2005;

Slepkov ve ark., 2007). Ancak, NHE-1'in sitoplazmik bölgesinin protein kinaz B (PKB) tarafından fosforilasyonunun Ca^{+2} -kalmodulin (CaM) kompleksinin bağlanmasını engelleyerek NHE-1 aktivitesini azalttığı öne sürülmüştür (Snabaitis ve ark., 2008). Sitoplazmik ucun protein fosfataz 1 (Protein Phosphatase 1; PP1), protein fosfataz 2 (Protein Phosphatase 2; PP2A) ve tirozin fosfataz (Protein Tyrosine Phosphatase; PTP) gibi proteinler aracılı defosforilasyonu ise NHE aktivitesinde inhibisyona yol açar (Lawrence ve ark., 2010).

NHE-1'in sitozolik bölgesine doğrudan düzenleyici proteinlerin bağlanması da aktivitesini değiştirebilmektedir. Örnek olarak, NHE-1 aktivitesini kalmodulin (Calmodulin; CaM) ve karbonik anhidraz II (Carbonic anhydrase; CAII) bağlanması artırırken, teskalsin bağlanması inhibe etmektedir (Fliegel, 2005). Ca^{+2} bağlayan kalsinörin homolog proteinin (Calcineurin homologous protein; CHP), NHE-1 aktivitesi için gerekli bir ko-faktör olduğu öne sürülmektedir (Amith ve Fliegel, 2013). Ayrıca, hücre içi Ca^{+2} artışının da NHE-1 aktivitesini artırdığı öne sürülmektedir. Ca^{+2} 'un stimule edici etkisinin kalmodulin kinaz II aracılığı ile NHE-1'in sitoplazmik bölgesinin fosforilasyonu ya da bu bölgeye doğrudan CaM bağlanması ile oluştuğu düşünülmektedir (Fliegel ve ark., 1992; Wakabayashi ve ark., 1994). Endotelin-1 (ET_A reseptörü üzerinden), anjiyotensin II (AT_1 reseptörü üzerinden), α_1 -adrenerjik agonistler ve trombin gibi membran reseptörlerinin uyarılması da NHE-1'i aktive edebilmektedir. Bu etkilerin protein kinaz C (PKC)'nin NHE-1'i fosforile etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir reaktif oksijen türevi olan hidrojen peroksitin (H_2O_2) de MAPK yolağı üzerinden NHE-1 aktivitesini artırdığı öne sürülmüştür. Beta (β_1) reseptör uyarısı ile adenilil siklazin (Adenylyl cyclase; AC) hücre içi siklik adenosin mono fosfatı (Cyclic adenosine monophosphate; cAMP) artırması ve nitrik oksit (NO)/sodyum nitroprusitin (SNP) guanilil siklaz (Guanylyl cyclase; GC) ile hücre içi siklik guanozin mono fosfatı (Cyclic guanosine monophosphate; cGMP) artırması ise NHE-1 değiş-tokuşunu inhibe etmektedir (Karmazyn ve ark.,1999, Vaughan-Jones ve ark.,2009; Şekil 1.1).

NHE-1 genini transkripsiyon düzeyinde kontrol eden bazı proteinler (AP-2 (Activating enhancer binding Protein-2) , CREB (cAMP Response Element-Binding

protein), Sp-1 (Specificity Protein 1)) olduğu düşünülmektedir. Örneğin; protein ailesi-2 (AP-2)'nin NHE-1 transkripsiyonunu artırdığı bildirilmiştir (Dyck ve Fliegel, 1995).



Şekil 1.1. Kardiyomiyositlerde NHE-1'in aktivitesini kontrol eden bazı önemli agonist, reseptör ve reseptör sonrası alt yolları gösteren şema. NHE-1'in stimülasyonu (sağda) veya inhibisyonu (solda) reseptörlerin (italik) ve diğer bazı ligandların (italize değil) aktivasyonu ile olmaktadır. Aracı protein kinazlar açık gri, NHE-1 koyu gri ile gölgelendirildi. 815 amino asitlik NHE-1'in membranda yer alan trans membran kısmı (TMD) iyon transportunu gerçekleştirirken dimer şeklindedir. NHE-1 aktivitesi büyük ölçüde karboksi ucundaki sitoplazmik bölgenin (~300 amino asit, CD) fosforilasyonu (P) ile kontrol altındadır. Kısaltmalar için metine bakınız (Vaughan-Jones ve ark., 2009 makalesinden adapte edilmiştir).

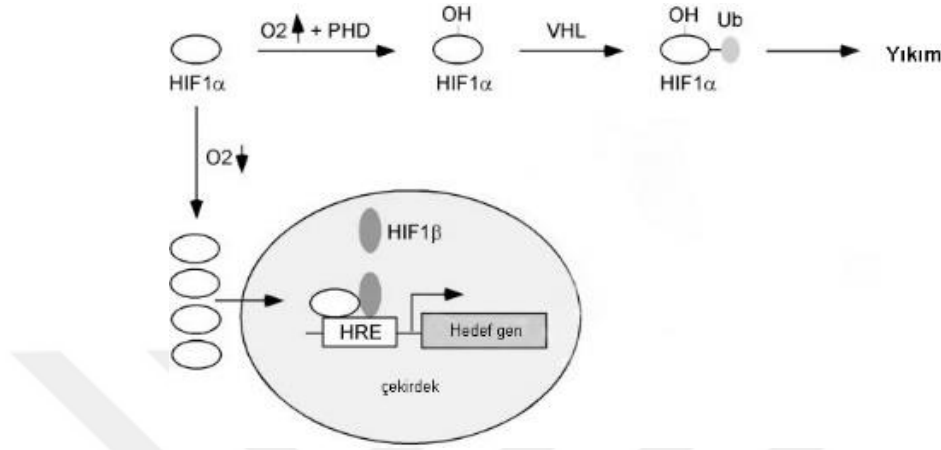
1.3. Hipoksida Hücre İçi pH Dengesi ve Hipoksi ile İndüklenen Faktör

Hipoksi, miyokard iskemisi ve kalp yetmezliği gibi patolojilerde karşımıza çıkmaktadır (Ambrose ve ark., 2014). Dokuya kan akışı yetersiz olduğundan oksijensiz solunum hakimdir ve hücreden metabolitlerin uzaklaştırılması durur. Bu durumda, genellikle pH_i dengesi bozulur. Hücre içinde asit yükünün artması NHE-1'i aktive ederek hücre içine Na^+ girişi ve sonrasında Na^+/Ca^{+2} değiş-tokuşucu üzerinden hücre içine Ca^{+2} girişine yol açabilir (Lazdunski ve ark., 1985). Hücre içerisindeki yüksek Ca^{+2} 'un çeşitli sinyal yollarını etkileyerek hücre ölümünü artırdığı düşünülmektedir (Lee ve ark., 2013).

Hipoksi durumunda hücre içinde biriken hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktörü (Hif) hipoksinin birçok etkisinden sorumlu tutulmaktadır (Ke ve Costa, 2006). Hif proteini, Hif- α ve Hif-1 β alt ünitelerinden oluşur. Hif- α 'nın, Hif-1 α , Hif-2 α ve Hif-3 α olmak üzere üç izoformu vardır. Hif-1 α , kalp dahil birçok dokuda yaygın olarak bulunurken, Hif-2 α daha çok akciğer ve endotel tabakasında eksprese olmaktadır. Hif-2 α 'nın amino asit dizisi % 48 oranında Hif-1 α ile benzerlik gösterir. Hif- α 'nın çekirdeğe transloke olarak çekirdekteki Hif-1 β ile birleştiği düşünülmektedir. Bu heterodimer, genlerin promotor bölgelerindeki hipoksiye duyarlı element (Hypoxia response element; HRE) olarak adlandırılan nükleotid dizilerine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonlarını etkiler (Ke ve Costa, 2006). Hif- α 'ların oksijen varlığında translokasyon gerçekleşmeden prolil hidroksilaz (PHD) enzimi aracılı yıkılırlar (Wu ve ark., 2015). Hif-3 α hakkında çok bilgi olmamasına rağmen diğer izoformlara benzer etki oluşturduğu düşünülmektedir (Ke ve Costa, 2006).

Hif-1 α yapımı oksijen miktarından etkilenmez ancak oksijen varlığında prolil hidroksilaz enzimi aracılığı ile hızlıca yıkılır (Ke ve Costa, 2006; Wang ve ark., 1995). Bu enzim, oksijenli solunum ürünü olan 2-oksoglutaratı kullanan bir dioksijenazdır, kofaktör olarak da Fe⁺²'i ve askorbatı kullanır (Wu ve ark., 2015). Prolil hidroksilazın bir oksijen atomunu Hif- α 'daki prolin rezidülerinin hidroksillenmesinde diğerini ise, 2-oksoglutaratdan süksinat ve CO₂ oluşturmada kullandığı düşünülmektedir (Ke ve Costa, 2006). Hif-1 α 'daki prolin rezidülerinin hidroksilasyonu sonucu von Hippel Lindau (VHL) ubiquitin E3 ligaz kompleksinin Hif-1 α 'yı tanıdığı ve ubiquitin proteini (Ub) takarak proteosomda yıkılmasına yol açtığı öne sürülmüştür (Ke ve Costa, 2006; Wang ve ark. 2016). Hipoksik koşullarda (oksijen seviyesi % 21'in altında iken) ise, prolil hidroksilaz enzimi baskılanır ve Hif-1 α proteini proteosomal yıkımdan kaçarak sitoplazmada birikir (Borsi ve ark., 2014; Weidemann ve Johnson, 2008). Hif-1 α çekirdeğe transloke olduktan sonra Hif-1 β ile dimerize olup Hif kompleksini oluşturur ve hedef gen transkripsiyonunu etkiler (Weidemann ve Johnson, 2008, Şekil 1.2). Hif-1 β miktarı oksijen konsantrasyonundan etkilenmez. Hipoksinin etkisi, normokside demir şelatörleri, 2-oksoglutarat analogu olan dimetiloksalilglisin (DMOG) ya da Fe⁺² yerine kobalt,

nikel gibi metal iyonları kullanılarak taklit edilebilir (Weidemann ve Johnson, 2008). Prolil hidroksilaz enzimindeki demir bağlanma bölgelerine yarışmalı olarak diğer iki değerlikli metallerin bağlanması veya DMOG kullanılması bu enzimi inaktive eder.



1.4. Hipoksik Koşullarda NHE Aktivitesi

Hipoksida NHE-1 aktivitesi hipoksinin süresine ve hücre tipine bağlı olarak değişmektedir (Hulikova ve ark., 2013). NHE-1 regülasyonunda Hif'lerin katkısı tam olarak bilinmemektedir. NHE-1 geninin promoter bölgesinde, Hif'in bağlanabileceği HRE dizisinin bulunduğu öne sürülmüştür (Lucien ve ark., 2011, Weidemann ve Johnson, 2008). Lucien ve ark. (2011), 4 saat hipoksinin (% 1 PO₂) HT1080 hücrelerinde (fibrosarkom hücre serisi) mRNA ve protein miktarını değiştirmeden NHE-1 aktivitesini artırdığını göstermiştir. Hif-1α geninin susturulması ise, NHE-1 aktivitesindeki bu artışı engellememiştir. Bu bulguların aksine, Hulikova ve ark. (2013), 3 saat hipoksinin (% 1 PO₂) HCT116 hücrelerinde (kolorektal kanser hücre serisi) yine protein miktarını değiştirmeden NHE-1 aktivitesini azalttığını

göstermiştir. NHE-1 aktivitesindeki bu azalma birkaç saatlik reoksijenasyon ile geriye dönmüş ve normoksida DMOG inkübasyonu ile hipoksi etkisi taklit edilmiştir. Aynı çalışmada, uzun süreli 48 saatlik hipoksi (% 2 PO₂) ise NHE-1 aktivitesi ve protein seviyesini azaltmıştır. 48 saat hipoksida tutulan hücrelerde NHE aktivitesinin azaldığı ve bunun reoksijenasyon ile kısmen geriye döndüğü gözlenmiştir. Normoksida 48 saatlik DMOG inkübasyonu da bu etkileri taklit etmiştir. Farklı mekanizmalarla gerçekleştiği anlaşılan kısa ve uzun süreli hipoksi etkilerinin DMOG ile taklit edilmesi bu etkilerin Hif bağımlı olabileceğini düşündürmektedir. Shimoda ve ark. (2006) ise, normoksik sıçanlardan izole edilen pulmoner arter düz kas hücrelerinde 48 saat hipoksi (% 4 PO₂) ile NHE-1 aktivitesinin arttığını ve bu artışa mRNA ve protein seviyesinin eşlik ettiğini gözlemlemişlerdir. Hif geni silinen farelerin 21 gün hipoksida (% 10 PO₂) tutulması ile NHE-1 artışının ve bazal pH değişikliğinin engellendiği, NHE-1 mRNA ve protein ekspresyonunun ise değişmediği gözlenmiştir. Normoksik ve Hif geni silinmemiş sıçanlardan izole edilen primer hücrelerde Hif-1 α 'nın aşırı miktarda eksprese edilmesi ise hipoksiyi taklit etmiş, bazal pH'yı alkaliye kaydırmış ve NHE aktivitesi, proteini ve mRNA'sında artış gözlenmiştir.

1.5. Çalışmanın Amacı

Miyokard iskemisi ve kalp yetmezliği gibi patolojilerde uzun süreli hipoksi ile karşılaşmaktadır. Hipoksida hücre içi pH dengesi hücre canlılığı açısından önemlidir. Kardiyomiyositlerde, hipoksik koşullarda hücre içinde oluşan asitin dışarı atılmasından sorumlu ana membran proteini NHE-1'dir. Hipoksida NHE-1 aktivitesi ve regülasyonu tedavi stratejileri geliştirilmesi açısından önemli olabilir. Bugüne kadar kardiyomiyosit kültürlerinde hücrelerindeki NHE-1 aktivitesinde hipoksi etkisinin majör sorumlusu Hif-1 α 'nın rolü araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, atrial kökenli hücre serisi HL-1 hücrelerinde 48 saat hipoksik (% 3 PO₂) inkübasyonun NHE-1 aktivitesi üzerindeki etki mekanizmasını ve bu etkideki Hif-1 α 'nın rolünü aydınlatmaktır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. HL-1 Hücre Kültürü

HL-1 hücreleri jelatin (% 0,02) ve fibronektin (% 0,5) ile kaplanmış *Claycomb* solüsyonu (Claycomb (Sigma), 2 mM L-glutamin, 0,1 mM norepinefrin, % 10 fetal sıgır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 100 U/ml penisilin, 100 µM streptomisin) içeren ortamda flask ya da 6'lık kuyulara ekildi. Daha sonra hücreler standart kültür koşullarında (% 5 karbondioksit (CO₂), % 95 nem ve 37°C'de) inkübe edilerek çoğaltıldı. % 80-100 yoğunluğa ulaşan hücreler % 0,05 tripsin/EDTA ile pasajlandı. Pasajlanan hücreler, devam ve deney grubu olmak üzere tekrar jelatin/fibronektin kaplı flask ya da 6'lı kuyulara bölündü. Geri kalan hücreler, % 95 FBS ve % 5 dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde önce kademeli olarak -80°C'de bir gece tutuldu, sonrasında ise sıvı azot tankında donduruldu.

2.2. Hipoksinin Oluşturulması

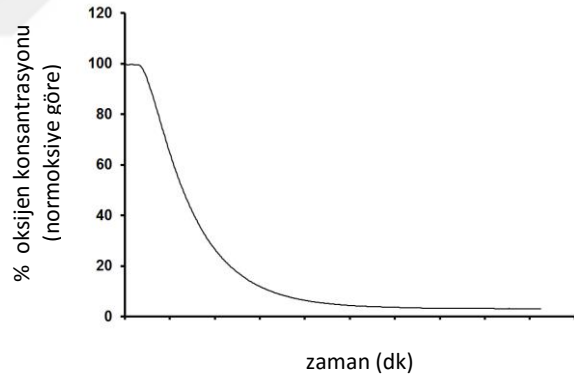
HL-1 hücreleri normoksida uygun yoğunluğa (% 60-70) ulaştıktan sonra 48 saat boyunca kesintisiz olarak hipoksida inkübe edildi. Hipoksi oluşturmak için gaz geçirgen olmayan kapalı kap (*chamber*) (Billups-Rothenberg, Inc.) kullanıldı (Şekil 2.1 A). *Chamber* % 95 azot (N₂), % 5 CO₂ içeren gaz karışımı ile gazlandırıldı. *Chamber*'ın oksijen içeriği oksijene duyarlı bir prob (Oxymicro, WPI) ile ölçüldü. *Chamber*'ın oksijen konsantrasyonu deneyin yapıldığı normoksik oksijen konsantrasyonu % 100 kabul edilerek % 3'üne (PO₂: 4-5 mmHg, Şekil 2.1 B) düşürüldü. Bu işlemten iki saat sonra inkübatörde bekleyen *Chamber*'da ısınma yüzünden oluşan gaz basıncı alındı. *Chamber*'ın gaz içeriği 24 saat sonra tazelendi ve iki saat sonra yeniden gaz basıncı alındı. Hipoksida hücreler çoğalırken ortam pH'sının asite kayabildiği bilinmektedir (Hulikova ve ark., 2013). NHE fonksiyon deneylerinde hipoksi süresince ortam pH'sını aynı tutabilmek (~7,4) için, hücreler ilk başta kırık camlara ekilerek çoğaltıldı. Daha sonra hücreler 6'lı kuyulara her

kuyuda iki kırık cam, protein miktar tayini deneyleri için ise, daha fazla toplam protein elde edilmesi amacıyla 60 mm'lik petri kabına iki yuvarlak lamel olacak şekilde aktarıldı. Daha sonra hücreler 48 saat kesintisiz hipoksiye alındı ya da normoksida dimetiloksalilglisin (DMOG) ile inkübe edildi. Böylece hücre yoğunluğu değişmeden (% 80-100) toplam hücre sayısı azaltılarak ortam pH'sının aside kayması engellendi. Ortamın pH'sı renk değişimi izlenerek kontrol edildi. Ayrıca, hücrelerin maruz kaldığı hipoksi şiddetinin difüzyon hızına göre değişebileceği (Lynn ve ark., 2011) de göz önünde bulundurularak 6'lı kuyu ve petri kabındaki hücrelerin bulunduğu ortam solüsyonunun hacmi, derinliği 0,2 cm olacak şekilde ayarlandı. Böylece, bütün deney grubu hücrelerine yaklaşık aynı miktar ortam eklendi, hipoksi şiddeti ve hücre dışı pH (pH_o) eşit tutuldu. Hücreler hipoksi *chamber*'ndan çıkartıldıktan sonra yaklaşık iki saat içerisinde NHE fonksiyonları ölçüldü. Akut anoksi için N_2 ile sürekli gazlandırılan süperfüzyon ortamına O_2 süpürücüsü sodyum diatonit (1 mM, Sigma) eklendi.

A)



B)



Şekil 2.1. *Chamber*'ın resmi (A) ve içindeki oksijen konsantrasyonunun düşürülmesini gösteren örnek trase (B). Normal atmosfer basıncındaki (normoksi) oksijen (~158 mmHg, % 100) hipoksi sırasında % 3'e (~4-5 mmHg) düşmektedir.

2.3. İmmünofloresans

HL-1 hücrelerinde hipoksinin NHE-1 ve Hif-1 α miktarına etkisi immünofloresans yöntemi ile ölçüldü. Yapılan çalışmalarda hipoksi ile Hif-1 α 'nın

çekirdeğe transloke olduğu ve miktarının hipoksi süresine bağlı olarak azaldığı öne sürülmektedir (Ambrose ve ark., 2014; Ke ve Costa, 2006). Bu nedenle, Hif-1 α miktarı iki ayrı hipoksi süresinde ölçüldü. HL-1 hücreleri, 5 ve 48 saat hipoksi ya da hipoksiyi taklit etmek amacıyla normokside Hif-1 α 'yı yıkan enzimin inhibitörü DMOG (1 mM) ile inkübe edildi. Hücreler iki kez PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkandıktan sonra % 2 paraformaldehit ile 20 dakika sabitlendi. Hücreler % 0,1 Triton-x içeren PBS ile 15 dakika inkübe edilerek hücre membranı geçirgen hale getirildi. Bloklama için hücreler tekrar PBS ile yıkanarak % 0,1 triton-x ve % 1 albumin içeren PBS içerisinde 1 saat bekletildi. Daha sonra geçirgenlik ve bloklama devam ederken sırasıyla birincil (fare monoklonal Hif-1 α , Novus Biologica/NB100-105, 1:500; fare monoklonal NHE-1 Santa Cruz/sc-136239,1:50) ve ikincil (keçi antifare Alexa Fluor 594, 1:100) antikorlarda 1 saat inkübe edilen hücreler son olarak DNA boyası yo-pro-1 (2,5 μ M)'e 40 saniye bekletildi (Uğur ve Jones, 2000). Bunu takiben preparatın kurumasını engellemek amacıyla *mountant* 'a (Diamond Antifade Mountant Life tech P36961) konuldu ve 12 saat ışık almayacak şekilde bırakıldı. Hücrelerden immünofloresans ölçümü için konfokal mikroskop (Leica, SP5) kullanıldı. Hücreler yo-pro-1 boyası için 488 nm dalga boyunda, aleksa flor için ise 594 nm dalga boyunda uyarılarak emisyon sinyali sırasıyla 495-550 nm ve 600-700 nm dalga boyu aralıklarında toplandı. Total sinyal şiddeti birim alan başına verilerek normalize edildi ve her bir deney grubu için uyaran lazer şiddeti ve konfokal mikroskop ayarları aynı tutuldu.

2.4. HL-1 Hücrelerinden NHE Aracılı H⁺ Atımının Ölçümü

2.4.1. Hücre İçi pH'nın Ölçülmesi

HL-1 hücrelerinde hücre içi pH (pH_i) görüntülenmesi için BCECF (5 (ve -6) karboksifloresin) boyasının asetometil esteri (AM) kullanıldı. HL-1 hücreleri 5 μ M BCECF ile 30 dakika standart kültür koşullarında inkübe edildi. Kırık cama ekilmiş hücreler, epifloresan mikroskopta (Nikon Eclipse TE 2000 ve PTI D104 görüntüleme sistemi) banyo ortamına yerleştirildi. BCECF boyası monokromotör ile 440 ve 490

nm dalga boyunda uyarıldı. Emisyon sinyali 535 nm dalga boyunda foto çoğaltıcı tüp ile toplandı. Elde edilen sinyalin pH değerine çevrilebilmesi için HL-1 hücrelerinde *in suti* nigerisin (Sigma) (K^+/H^+ iyonoforu, 10 μM) kalibrasyonu yapıldı. Nigerisin kalibrasyonu beş farklı pH'dan yapıldı. Her pH değerine karşılık gelen emisyon oranları (R) Şekil 2.2'deki dört parametrelili lojistik denklem eğrisine oturtuldu.

$$R = R_{\min} + (R_{\max} - R_{\min}) / (1 + 10^{-(pK_a - pH_0)})$$

Şekil 2.2. pH boyasının emisyon oranlarının pH_i değerlerine çevrildiği kalibrasyon denklemi. R: emisyon oranı, R_{min}: minimum emisyon oranı, R_{maks}: maksimum emisyon oranı, pK_a: BCECF pK_a'sı, ve pH₀: hücre dışı çözeltinin pH'sını göstermektedir. Ölçüm değerlerine oturtulan eğriden emisyon sinyal oranının pH değerine dönüştürülebilmesi için bu formülün ters fonksiyonu kullanıldı.

2.4.2. HL-1 Hücrelerinin Süperfüzyonu

HL-1 hücreleri solüsyon değiştirici ve peristaltik pompa yardımıyla tampon çözeltileri ile 3 ml/dk hızında süperfüze edildi. Çözeltilerin sıcaklığı geri beslemeli peltier ısıtıcı sistemi (CL-100, Warner Instruments) ile 37°C'de sabit tutuldu. Süperfüzyon sistemi ve banyo sırasıyla 100 ml % 2'lik sıgır serum albumini (37°C), 2L % 20 deterjanlı su (60°C), 100 ml etanol (25°C) ve 3L distile su kullanılarak temizlendi.

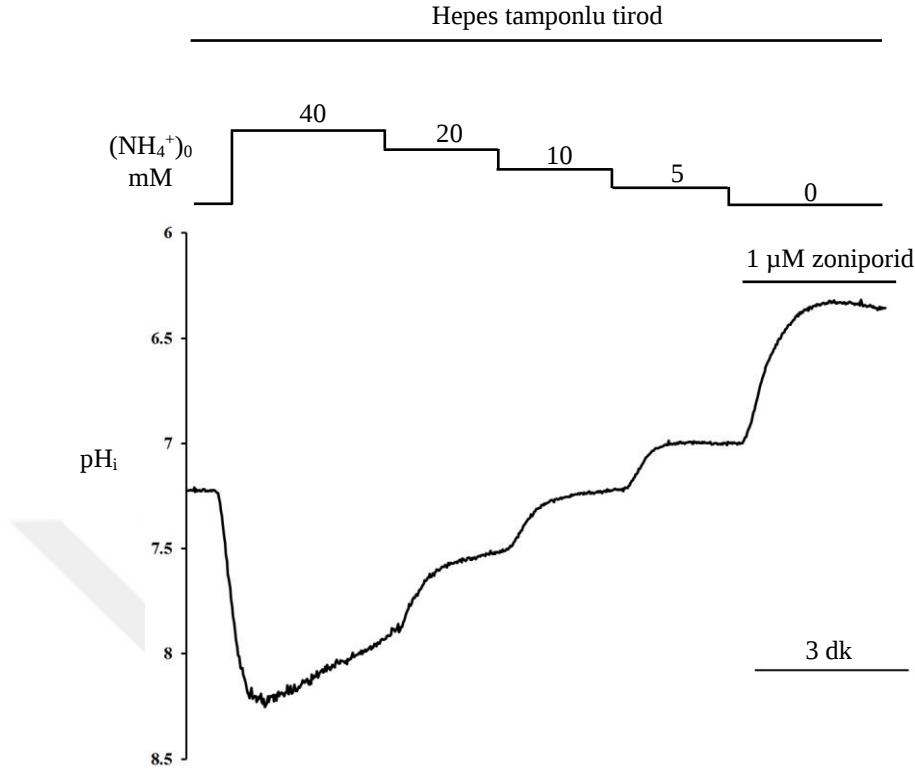
2.4.3. Kullanılan Solüsyonlar

Süperfüzyon için kullanılan Hepes tamponlu tirod solüsyon (mM olarak): 135 NaCl, 20 Hepes (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinethanosulfonik asit, pK_a:7,5), 11 Glukoz, 4,5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂ kullanılarak hazırlandı. HCO₃⁻ tamponlu tirod çözeltisi için (mM olarak): 125 NaCl, 22 NaHCO₃, 11 Glukoz, 4,5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂ kullanıldı. Amonyum klorür (NH₄Cl) Hepes ve bikarbonat tamponlu tirod solüsyonları hazırlanırken eşdeğer Na⁺ ile yer değiştirildi. Na⁺ içermeyen tirod solüsyonu için Na⁺ eşdeğer 145 mM N-metil-D-glukamin (NMDG) ile yer değiştirildi. Kalibrasyon çözeltileri için ise (mM olarak): 140 KCl, 1 MgCl₂, 0,5 EGTA, 0,01 nigerisin (Sigma), 20 Hepes ya da 2- (N-morfolino) etanosülfonik asit

(MES, pKa: 6,1) kullanıldı. Alkali kalibrasyon solüsyonlarına hücrelerin kasılmalarını önlemek amacıyla miyozin inhibitörü 2,3-butandion monoksim (BDM) eklendi. Kalibrasyon solüsyonlarının ve süperfüzyon için kullanılan Hepes solüsyonlarının pH'sı derişik NaOH ile 37°C'de 7,4'e ayarlandı. Protein miktar tayini (western blot) ve immünofloresans deneylerinde hücrelerin yıkanması için kullanılan fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS); 1,67 g Na₂HPO₄, 0,57 g NaH₂PO₄ ve 8,5 g NaCl kullanılarak hazırlandı.

2.4.4. HL-1 Hücrelerinde Doğal Tamponlamanın Hesaplanması

Hücre içi doğal tamponlama (β_i) ölçümünde hücreden asit çıkışı HCO₃⁻ içermeyen Hepes tamponlu tirod ve NHE-1 spesifik inhibitörü zoniporid (1 μ M) kullanılarak bloke edildi. Daha sonra hücreler sırasıyla farklı hücre dışı amonyum (NH₄⁺) çözeltileri (40 mM- 0 mM arasında) ile süperfüze edildi (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hücre içi doğal tamponlama hesaplanmasında kullanılan deneysel protokol. Süperfüzyon solüsyonundan kademeli olarak amonyum konsantrasyonunun azaltılması ile hücre içi asit yüklenmektedir. Doğal tamponlamadaki ortalama pH_i asit yüklenmelerinin başlangıç ve bitiş noktalarından hesaplandı. pH_i 'nin asit olduğu değerde ortama 1 μM selektif NHE-1 blokörü zoniporid eklendi.

Hücre içindeki amonyum ($NH_4^+_i$) konsantrasyonu $NH_4^+_0$ konsantrasyonunun bir fonksiyonu (Şekil 2.4 A) olduğundan teorik olarak hesaplanabilmektedir. Tamponlama hesaplanırken, hücre içi ve hücre dışında amonyum ayrışmasının pK_a 'larının eşit olduğu ve $NH_4^+_0$ uzaklaştırılması ile oluşan $NH_4^+_i$ farkı ($\Delta NH_4^+_i$) kadar hücre içinde H^+ (ΔpH_i) yaratılacağı kabul edildi. Böylece teorik olarak hesaplanan ve deney sırasında ölçülen gerçek pH_i arasındaki fark tamponlama (β_i , Şekil 2.4 B) olarak hesaplandı. Tamponlama verileri hücre içinde tek tip tampon (T) modeli (Şekil 2.4 C) kullanılarak ifade edildi (Leem ve ark., 1999).

- (A) $[\text{NH}_4^+]_i = [\text{NH}_4^+]_o \times 10^{(\text{pH}_o - \text{pH}_i)}$
- (B) $\beta_i = \Delta [\text{NH}_4^+]_i / \Delta \text{pH}_i$
- (C) $\beta_i = \ln 10 [T] \times 10^{(\text{pH}_i - \text{pK}_a)} / (1 + 10^{(\text{pH}_i - \text{pK}_a)})^2$

Şekil 2.4. Hücre içi doğal tamponlamanın (β_i) hesaplandığı denklemler.

2.4.5. HL-1 Hücrelerinde NHE Akısının Hesaplanması

HL-1 hücrelerinden asit dışarı atan değiş-tokuş proteinlerini (NHE ve NBC) aktive etmek için hücreler yaklaşık dört dakika amonyum (20 mM NH_4Cl) solüsyonu ile süperfüze edildi. Amonyum hızla yüksüz amonyak (NH_3) ve H^+ 'e dönüşür ve amonyak hücre içine girer. Hücre içindeki amonyak da ters reaksiyon ile amonyum oluşturarak pH_i 'yi alkaliye kaydırır. Bu durum, hücrede asit yükleyen değiş-tokuşları (Cl^- bağımlı OH^- ve HCO_3^- değiş-tokuşcuları) aktive eder ve hücre içine net asit yüklenmeye başlar. Daha sonra hücre dışından hızlıca amonyum uzaklaştırılınca değişen amonyak dengesi hücre içindeki amonyak ve dolayısı ile amonyumu hücreden yıkar. Bu protokol amonyum ön işlemi olarak adlandırılır (Boron ve De Weer, 1976). Hücre içerisinde kalan net asit süperfüzyon solüsyonunda HCO_3^- iyonu varlığında NHE ve NBC aracılığı ile, eğer sadece Hepes tamponu var ise NHE aracılı atılır.

Asit atan değiş-tokuşçu aktivitelerinin hesaplanması için hücrenin asitten kurtulma hızı (dpH_i/dt) aynı pH'daki tampon değeri ile çarpıldı. Asit atan değiş-tokuşçular çalışıp hücre dışına H^+ attıkça hücre içi tampon bağladığı H^+ 'i ortama verdiğinden gözlenen pH_i artışı asit atan transportörler ile dışarı atılan H^+ ve tampon tarafından ortama verilen H^+ 'nin toplamı olarak verildi (Şekil 2.5).

$$J_{\text{NHE}} = \text{dpH}_i/\text{dt} \times \beta_i \text{ (mM/dk)}$$

Şekil 2.5. NHE-1 akısının (aktivite) hesaplanmasında kullanılan denklem.

2.5. HL-1 Hücrelerinde mRNA Ölçümü

2.5.1. Toplam RNA İzolasyonu

Toplam RNA izolasyonu için, HL-1 hücrelerinden *claycomb* solüsyonu uzaklaştırıldı ve oda ısısında 5 dakika Trizol (Invitrogen) ile inkübe edildi. Daha sonra örneklerin üzerine kloroform eklenerek santüfjüldü. Üst faza izopropil alkol konuldu ve -20°C’de bir gece bekletildi. Ardından bekletilen RNA’lar santüfjülenerek çöktürüldü ve üzerine etanol ilave edilerek tekrar santüfjüldü. Üstteki etanol uzaklaştırıldıktan sonra RNA’lar suda çözüldü. Elde edilen RNA miktarı spektrofotometrede (260/280 nm’de) ölçüldü.

2.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Üretici firmanın (ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit, NEB E6300s) önerdiği protokol doğrultusunda toplam RNA’dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. 1 µg total RNA, kit ile gelen ters transkripsiyon çözeltisi, ters transkriptaz enzimi, spesifik *primer* ve saf su ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde karıştırıldı. Daha sonra bu karışım polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazına (Applied Biosystems, Veriti®) yerleştirilerek önce 25°C’de 10 dakika ardından 37°C’de 30 dakika ve son olarak 85°C’de 5 dakika bekletilerek total RNA’dan cDNA sentezi gerçekleştirildi.

2.5.3. Primer Tasarımı

İlgilenilen genlerin tüm transkriptleri ensembl database’inden (<http://www.ensembl.org>) elde edildi. Primer seçimi web tabanlı program primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) ya da Vector NTI 10.0 (Invitrogen) kullanılarak yapıldı. Tasarlanan primerlerin kalitesi Oligo Analyzer 1.0 yazılımı ile kontrol edildi. Web tabanlı algoritma olan Primer blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ile primerlerin çoğalttığı bölge kontrol edildi (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Deneylerde kullanılan primerlerin sekans, erime sıcaklıkları ve çoğalttıkları baz çifti uzunlukları.

Primer adı	Primer Sekansı (5' ->3')	Erime Sıcaklığı ((T _m)/°C)	Amplikon
NHE-1 düz primer	GAGGACATCTGTGGTCATTATGGCC	63	212
NHE-1 ters primer	GAGACAGTGGAGACAGCAGATGGG	64.5	
NHE-3 düz primer	GGCTCTGCACCATGAAGAAAGGC	56.5	173
NHE-3 ters primer	CTTGCCCTCCATGCAGACACC	57	
NHE-8 düz primer	CCTCACCAACACGGCTGAAGG	63.5	131
NHE-8 ters primer	CAGTCAGCGTGCCAAGTGCTG	64.5	
NBCe1 düz primer	CGGAGGAGGAGGACATGGTGAC	64	181
NBCe1 ters primer	GATGGCGTTGGTTACGGTTGC	63	
β-aktin düz primer	GGCACCACACTTTCTACAATG	57.5	133
β-aktin ters primer	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAAC	59	

2.5.4. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)

Deneylerde kapiller sisteme (Roche LightCycler 1.2) uygun Syber Green bazlı RT-PCR kitleri (DyNAmo Capillary SYBR Green qPCR Kit, Thermoscientific F-420L) kullanıldı. 10 ng cDNA, kit ile birlikte gelen reaksiyon çözeltisi, çalışılan gene ait ters ve düz primerler (5 pmol) ve steril su ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde karıştırılıp RT-PCR cihazına yüklendi. Deneylerde DNA boyasının (Syber Green) herhangi bir çift zincirli yapıya (primer dimerleri, kontamine DNA gibi) bağlanma potansiyelinden dolayı deneylerin sonunda çoğaltılan yapıların özgülüğü erime eğrisi analizi ile kontrol edildi. Kontrol ve hipoksik örneklerden elde edilen NHE-1 mRNA miktarlarının karşılaştırılması $\Delta\Delta C_t$ metoduna göre göreceli

ekspresyon oranı olarak hesaplandı. Bu ölçümde primerlerin reaksiyon verimleri kontrol edildi (Pfaffl, 2001).

2.6. HL-1 Hücrelerinde Protein Miktar Tayini (Western Blot)

HL-1 hücrelerinden protein örnekleri elde etmek için, claycomb ortamından uzaklaştırılan hücreler +4°C’de fosfat tampon çözeltisi ile yıkandı ve kazınarak tüpe aktarıldı. Daha sonra santüfjlenerek çöktürülen hücreler +4°C’deki lizis çözeltisinde (50 mM HEPES (pH:7,6), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1,5 mM MgCl₂, % 0,5 NP-40 ve proteaz inhibitör kokteyli (Complete, Roche)) 15 dakika düzenli aralıklarla ters düz edilerek bekletildi. Örnekler, 12000 g’de 10 dakika +4°C’de santrifjlendikten sonra süpernatanttan membran ve sitozolik fraksiyondaki proteinler elde edildi. Proteinler sabit akımda (sıkıştırma jeli için 10 mA, ayırıştırma için 20 mA, Çizelge 2.2) SDS-PAGE ile ayırıştırıldıktan sonra polivinilidin florür (Santa Cruz) membrana transfer edildi ve % 3 sığır serum albumin içeren tampon çözelti (% 0,2 Tween 20, Tris pH 7,6) içerisinde bloklandı. Daha sonra membranlar NHE-1 proteini için fare monoklonal (Santa Cruz/sc-136239, glikolize formu 100 kDa, 1/200), β-aktin için fare monoklonal (Santa Cruz/sc-47778, 43 kDa, 1/1000) birincil antikorları ile bir gece +4°C’de inkübe edildi. İkincil antikor (1:25000) ile bir saat inkübe edilen membranlardan luminol ile oluşturulan kemiluminesans filme aktarıldı. Filmdeki bantların yoğunluk analizi için *Image J* (v1.44p) yazılımı kullanıldı.

Çizelge 2.2. Protein miktar tayini için kullanılan jeller

	% 5 Sıkıştırma jeli		% 8 Ayırıştırma jeli
Su	1380	Su	3445
Tris (0,5 M)	250	Tris (1,5 M)	1899
Akrilamid	329	Akrilamid	2000
SDS	20	SDS	75
Temed	2	Temed	3
APS	20	APS	75

2.7. İstatistik

Tüm sonuçlar ortalama ve standart hata ($\pm$ S.E.M) şeklinde gösterildi. Gruplar arası fark için çift yönlü Student's *t*-test'i kullanıldı (Graphpad Prism 4) ve $P<0,05$ anlamlı kabul edildi.

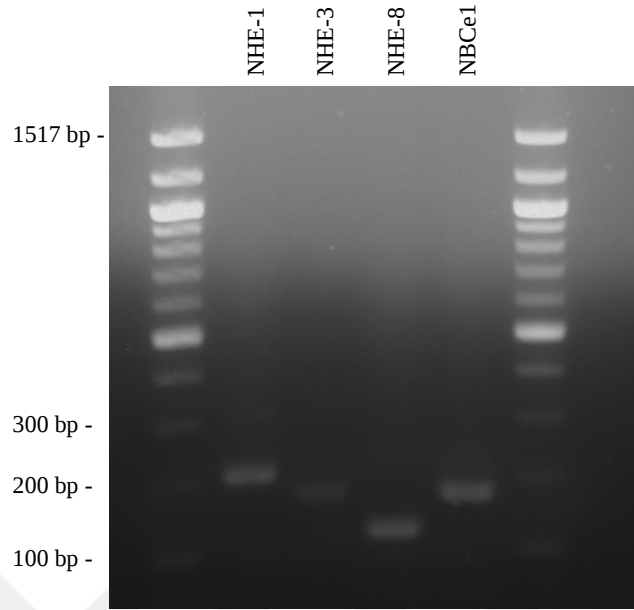


3. BULGULAR

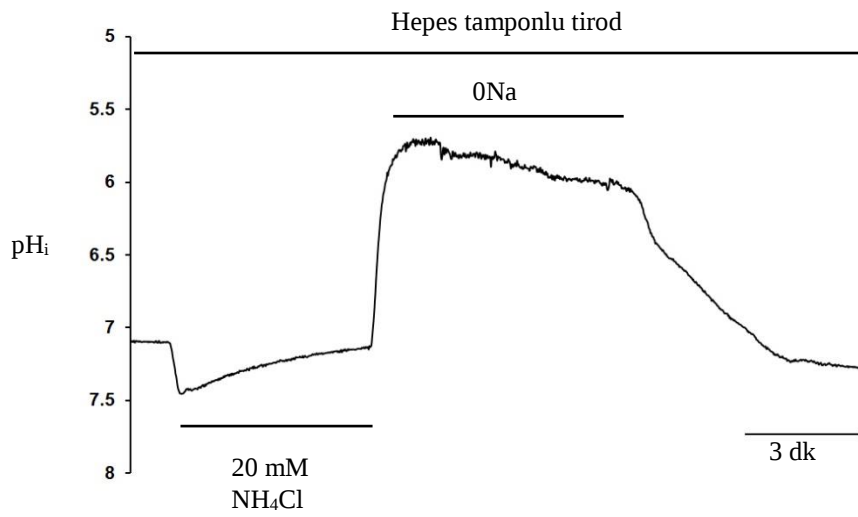
3.1. HL-1 Hücrelerinden Asit Atımında NHE-1'in Rolünün Belirlenmesi

Memeli kardiyomiyositleri hücre içindeki asit yükünden Na^+ aracılı NHE ve NBC değiş-tokuşçuları ya da ATP'ye bağımlı hücre dışına aktif H^+ atan pompalar ile kurtulur. Bu tez çalışmasında, fare atrial tümör kökenli HL-1 hücrelerinde, hücreden dışarı asit atan proteinleri belirlemek amacıyla kalp dokusuna özgü ve hücre membranında eksprese olduğu bilinen NHE ve NBC izoformlarının varlığı araştırıldı. Hücrelerde NHE-1, NHE-8 ve NBCe1 izoformları ve daha az miktarda NHE-3 ekspresyonu saptandı (Şekil 3.1 A). Amonyum ön işlemi ile asit yüklenen hücrelerde asitten kurtulma sırasında süperfüzyon solüsyonundaki Na^+ NMDG ile yer değiştirildi. Bu koşullarda hücrelerin asit yükünden kurtulması durdu. NMDG ortamdan uzaklaştırıldığında (Na^+ geri konulduğunda) ise NHE bağımlı asitten kurtulma devam etti (Şekil 3.1 B). Böylece, HL-1 hücrelerinde Na^+ 'dan bağımsız diğer mekanizmaların (ATP bağımlı aktif asit atımı gibi) katkısının ihmal edilebilir düzeyde olduğu anlaşıldı. Daha sonra, hücrelerdeki NHE aracılı asit atım mekanizmalarını aydınlatmak için, bütün süperfüzyon solüsyonlarından HCO_3^- çıkartılarak yerine Hepes tamponu konuldu. Aynı protokol ile hücrelerin asitten kurtulması sırasında süperfüzyon solüsyonuna NHE-1 inhibitörü zoniporid (1 μM) eklendi. Benzer şekilde, zoniporid varlığında asitten kurtulma büyük ölçüde inhibe oldu (Şekil 3.1 C, D). Bu sonuçlara göre, HL-1 hücrelerinde NHE-1'in asit atımından sorumlu fonksiyonel ana izoform olduğu anlaşıldı.

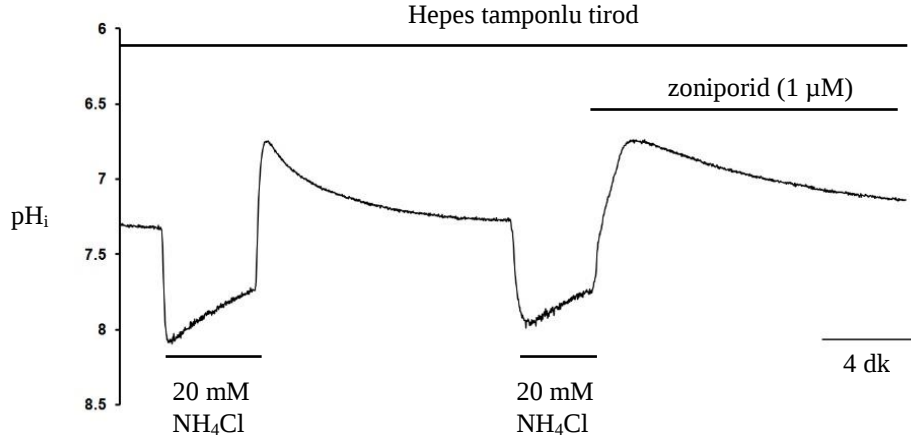
A)



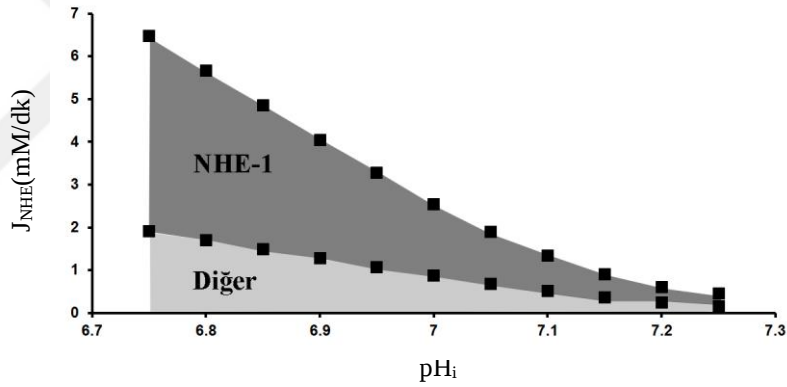
B)



C)



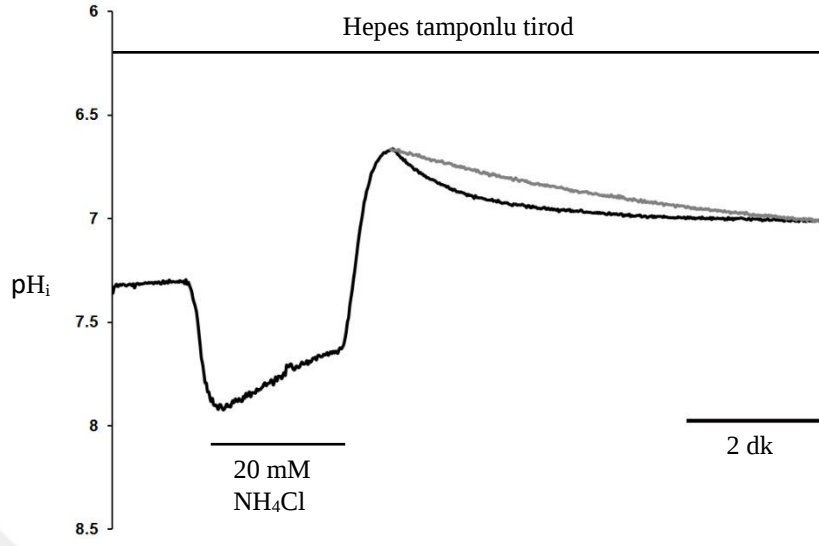
D)



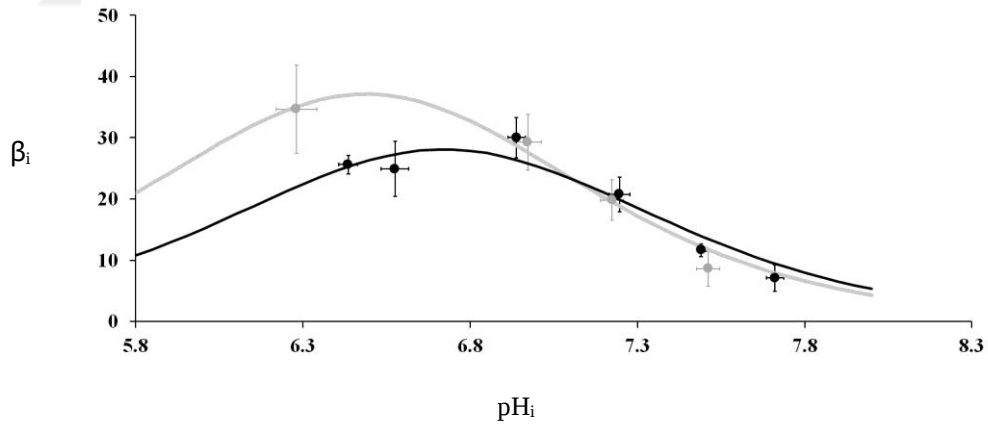
Şekil 3.1. HL-1 hücrelerinden asit uzaklaştıran mekanizmalar. A) HL-1 hücrendeki NHE izoformları ve NBCe1'in mRNA ekspresyonları. PCR ürünleri etidyum bromür içeren % 2 agaroz jelde ayrıştırıldı. B) HL-1 hücrelerinde pH duyarlı boyalar BCECF-AM ile elde edilen pH_i . Deney, pH_i 'sı 7,4 olan Hepes tamponlu tirod solüsyonunda yapıldı. HL-1 hücreleri ilk önce 20 mM NH_4Cl ile süperfüze edildi. Daha sonra NH_4Cl hızla uzaklaştırılınca hücreye asit yüklemesi olmaktadır (amonyum ön işlemi ile). Hücre asit yükünü atmaya başladığında ortamdan Na^+ uzaklaştırılıp yerine NMDG konuldu ve asit atımı durdu. Trasenin son kısmında süperfüzyona Na^+ geri konulduğunda asitten kurtulma bazal pH_i 'ye kadar devam etmektedir. C) Aynı hücre grubundan ard arda alınan kontrol ve NHE-1 inhibitörü zoniporid (1 μM) varlığında elde edilen asitten kurtulma eğrileri. Zoniporid hücrenin asit uzaklaştırmasını (dpH_i/dt) büyük oranda yavaşlattı. D) C'deki hücrelerden hesaplanan kontrol ve zoniporid varlığındaki (diğer) pH_i 'ye göre asit atım miktarı. Kontrol ve zoniporid varlığındaki asit atım miktarı arasındaki fark NHE-1'in attığı asit atımını göstermektedir.

3.2. HL-1 Hücrelerinde 48 Saatlik Hipoksik İnkübasyonun NHE Aktivitesine Etkisi

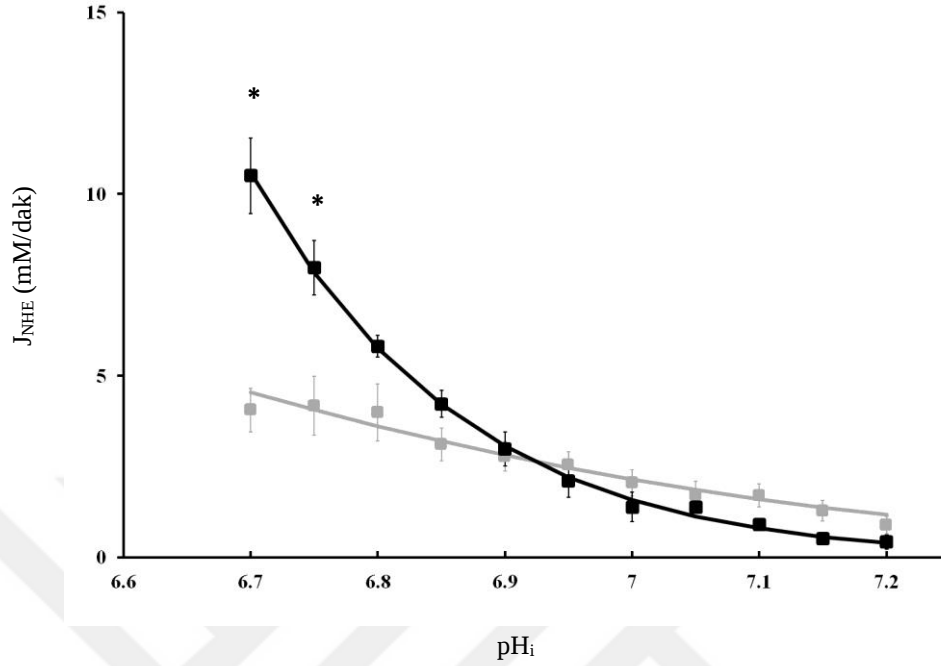
HL-1 hücrelerinde 48 saatlik hipoksinin NHE aktivitesi üzerindeki etkisini anlamak için hücreler % 3 PO₂ veya normokside (atmosferik PO₂) tutuldu. *Claycomb* hücre kültürü ortamının hipoksi yüzünden aside kaymasının önüne geçilerek pH'sı 7,4'de tutuldu. Hipoksik inkübasyondan sonra, hücreler normoksik kontrol hücreleri ile beraber pH duyarlı boya BCECF ile yüklendi. Hücreler daha sonra sürekli süperfüzyon ortamına alındı ve amonyum ön işlemi ile hücrelere asit yüklendi. Hücrelerin asit atma miktarı zamana bağlı asitten kurtulma eğrisinden hesaplandı. Deneyler HCO₃⁻ içermeyen Hepes tamponlu solüsyon ile yapıldığından bu koşullarda hücrelerden sadece NHE aktivitesi ölçüldü. Hipoksik hücrelerin, hipoksi *chamber*'ının açılmasından sonra yaklaşık 2 saat içerisinde kayıtları alındı. 48 saatlik hipoksi, hücrelerin NHE aracılı asitten kurtulma hızını (dpH_i/dt) yavaşlattı. Ancak, hipoksik ve normoksik kontrol hücrelerin bazal pH_i'si (~7,2) arasında fark gözlenmedi (Şekil 3.2). NHE aktivitesi (J_{NHE}) hücre içi doğal tamponlama kapasitesinin (β_i) bir fonksiyonudur (J_{NHE} = dpH_i/dt X β_i). β_i amonyumun kademeli olarak uzaklaştırılması ile hesaplandı. 48 saatlik hipoksi HL-1 hücrelerinde tamponlama kapasitesini artırdı (Şekil 3.3). Elde edilen eğriden kontrol ve hipoksik koşullardaki hücre içi tampon konsantrasyonları (mM, kontrol: 48,8; hipoksi: 64,5) ve tamponların pK_a değerleri (kontrol: 6,7; hipoksi: 6,48) hesaplandı. Bu tamponlama eğrileri ekstrapole edilerek NHE aktivitesinin hesaplanmasında kullanıldı. 48 saatlik hipoksi pH_i bağımlı NHE aktivitesini azalttı (Şekil 3.4). Sonuç olarak, 48 saat hipoksi ile hücrelerin tamponlama kapasitesinde artış olmasına rağmen, bu artış hipoksi ile indüklenen NHE aktivitesindeki yavaşlamayı açıklamamaktadır.



Şekil 3.2. 48 saat hipoksida (%3 PO₂, gri trase) veya normoksida (atmosferik PO₂, siyah trase) tutulan HL-1 hücrelerine amonyum ön işlemi ile asit yüklendikten sonra hücrelerin üst üste getirilmiş asitten kurtulma eğri örnekleri.



Şekil 3.3. Normoksik kontrol (siyah) ve 48 saat hipoksi (gri) gruplarında pHi'ye bağımlı hücre içi doğal tamponlama (β_i) değerleri. β_i ortalama değerleri birbirini takip eden yaklaşık 0,3 pH ünitelik dilimlerden hesaplandı (n=7-14). Grafikteki sürekli eğri metotta bahsedilen fizyolojik tamponlama denkleminde hesaplandı.

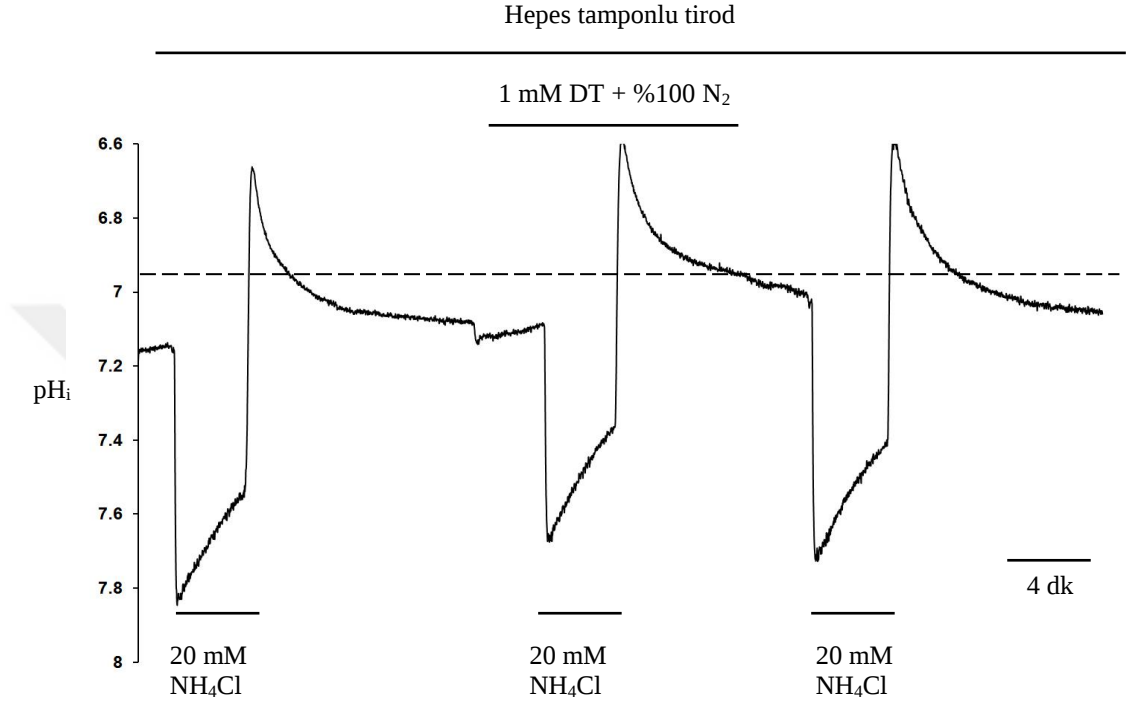


Şekil 3.4. pH_i'ye bağlı NHE aktivitesi. Ortalama NHE aktivitesi pH_i 6,7-7,2 aralığında ve 0,05'lik dilimlerde gösterildi. 48 saat hipoksik hücrelerden kayıt hipoksik *chamber*'in açılmasından ve hücrelerin atmosferik PO₂'ye maruz kalmasından sonra iki saat içerisinde alındı. 48 saat hipoksi (gri) normoksik kontrol (siyah) hücrelere göre NHE aktivitesini azalttı (n=6-11, * p<0,05).

3.3. HL-1 Hücrelerinde 10 Dakikalık Akut Anoksi ve 24 Saatlik Hipoksik İnkübasyonun NHE Aktivitesine Etkisi

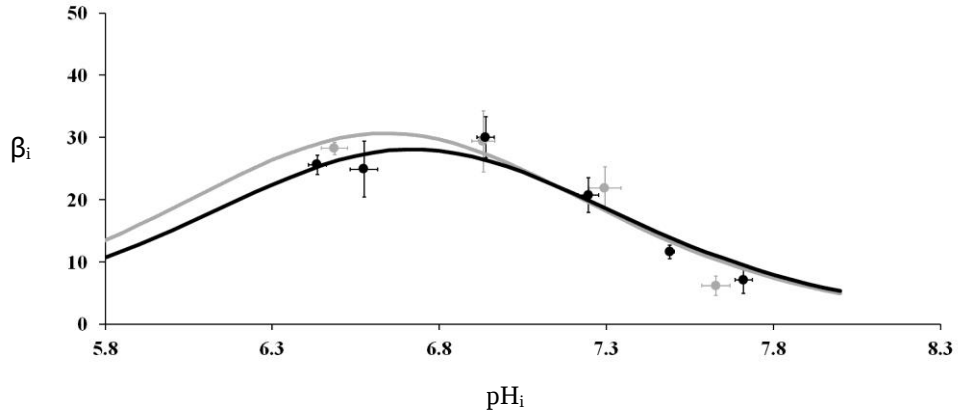
HL-1 hücrelerinde 48 saatlik hipoksik inkübasyon NHE aktivitesini azalttı. Bu etkinin başlama süresini tespit etmek amacı ile ilk olarak hücreler süperfüzyon ortamında 10 dk'lık anoksida (% 0 PO₂) tutuldu ve daha sonra NHE aracılı asitten kurtulma hızları ölçüldü. Akut anoksi için, N₂ ile sürekli gazlandırılan süperfüzyon ortamına O₂ süpürücüsü sodyum diatonit kimyasalı (1 mM, Sigma) eklendi. Şekil 3.5'de aynı hücre grubuna ard arda, 1. ve 3. sü normoksida, 2. si anoksida olmak üzere üç kere amonyum ön işlemi uygulanarak NHE aracılı asitten kurtulma hızları karşılaştırıldı. 10 dk.'lık akut anoksi NHE aracılı asitten kurtulma hızını yavaşlattı. Bu etki, hücreler tekrar normoksik tampon solüsyonu ile süperfüze edildiklerinde (sodyum diatonit uzaklaştırıldığında) ortadan kalktı. 48 saatlik hipoksik inkübasyon

sonrasında ise NHE aracılı asitten kurtulma hızındaki azalma yaklaşık 2 saat içerisinde geriye dönmedi. Bu sonuçlar akut anoksi ve 48 saatlik uzun süreli hipoksinin NHE aktivitesi üzerindeki etki mekanizmasının farklı olduğunu düşündürdü.

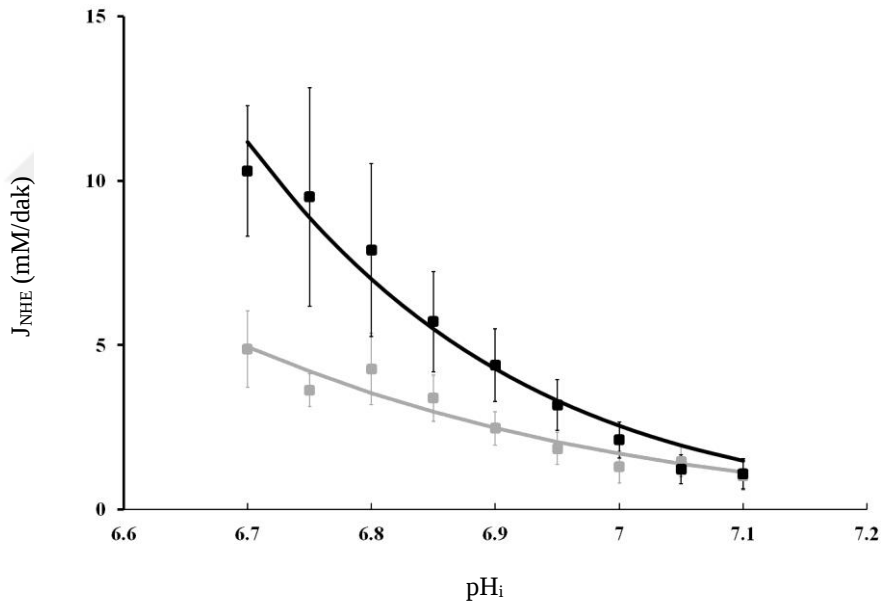


Şekil 3.5. HL-1 hüresinden ard arda alınan asitten kurtulma eğrileri. İlk eğri normoksik şartlarda (atmosferik PO_2 'de) alındı. İkinci eğride, ortamdan oksijen uzaklaştırılarak (1 mM sodyum diatonit (DT) + 100% N_2 ile gazlandırılan süperfüzyon solüsyonuna geçildi) hücre 10 dk. anoksida tutuldu. Anoksi bazal pH_i 'yi aside kaydırıldı. 3. eğri DT ortamdan yıkandıktan sonra tekrar normoksida elde edildi. Kesikli çizgi pH_i : 6,95'de anoksida asitten kurtulmanın durduğunu, normoksida (1 ve 3. eğriler) ise aynı pH_i 'de aktivitenin devam ettiğini göstermektedir.

Daha sonra, 48 saatlik uzun süreli hipoksida NHE aktivitesinde 2 saat içerisinde geriye dönmeyen yavaşlatıcı etkinin başlangıç zamanı araştırıldı. Bu amaçla 48 saatlik hipoksi deneyleri 24 saat için tekrarlandı. 24 saat hipoksi hücrelerin tamponlama kapasitesinde bir fark oluşturmadı (Şekil 3.6). 24 saatlik hipoksik inkübasyon sonrası ise NHE aktivitesinde yavaşlama eğilimi görüldü ancak bu fark her pH_i noktası için istatistiksel olarak karşılaştırıldığında normoksik kontrole göre anlamlı bulunmadı (Şekil 3.7). Böylece hipoksi ile indüklenen NHE üzerindeki etkinin tamponlama değişikliğinden bağımsız ortaya çıktığı ancak belirgin inhibisyonun ortaya çıkması için 48 saatlik hipoksik inkübasyon gerektiği anlaşıldı.



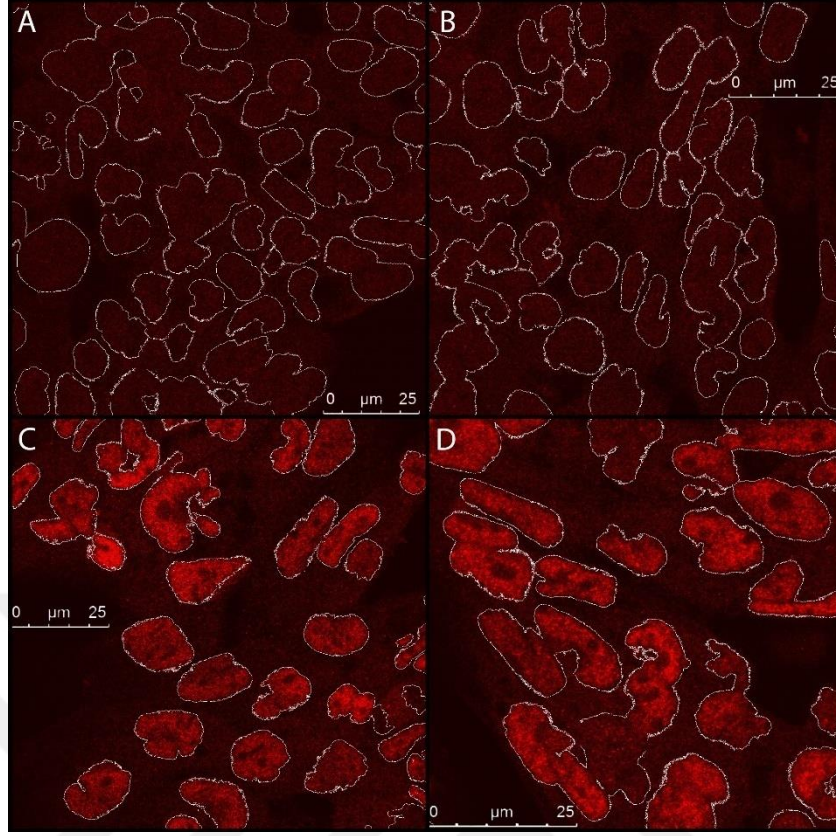
Şekil 3.6. 24 saat normoksik kontrol (siyah) ve 24 saat hipoksi (gri) gruplarında pH_i 'ye bağımlı hücre içi doğal tamponlama (β_i) değerleri. β_i ortalama değerleri birbirini takip eden yaklaşık 0,3 pH ünitelik dilimlerden hesaplandı (n=6-14). Grafikteki sürekli eğri metotta bahsedilen fizyolojik tamponlama denkleminde hesaplandı.



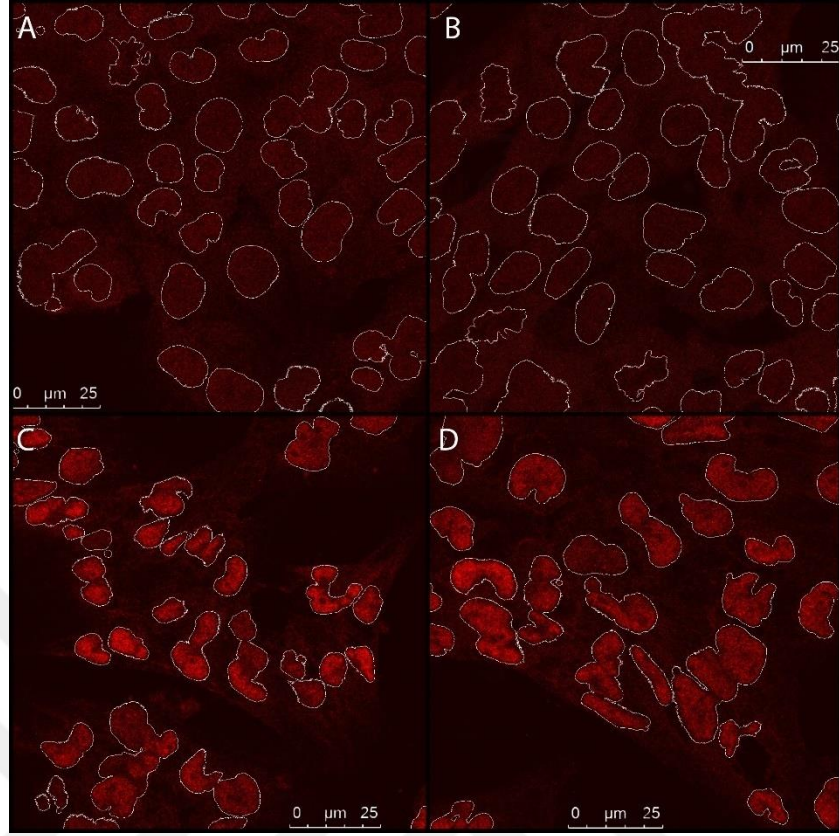
Şekil 3.7. pH_i 'ye bağımlı NHE aktivitesi. Ortalama NHE aktivitesi pH_i 6,7-7,1 aralığında ve 0,05'lik dilimlerde gösterildi. 24 saat hipoksik hücrelerden kayıt, hipoksik *chamber*'in açılmasından ve hücrelerin atmosferik PO_2 maruz kalmasından sonra iki saat içerisinde alındı. 24 saat hipoksi (gri) ile 24 saat normoksik kontrol (siyah) hücrelere göre NHE aktivitesi istatistiksel olarak değişmedi ancak inhibisyon eğilimi gözlemlendi (n=5).

3.4. HL-1 Hücrelerinde Hipoksi ve Normokside DMOG İnkübasyonunun Hücre İçi Hif-1 α Miktarına Etkisi

48 saatlik hipoksi ile NHE aktivitesindeki inhibisyonun mekanizmasını araştırmak amacıyla hücrelerde Hif-1 α miktarı ölçüldü. Hif-1 α hücrelerin hipoksiye verdiği yanıtta büyük rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Normokside Hif-1 α proteininin sürekli yıkıldığı, dolayısı ile hücre içinde birikmediği öne sürülmektedir. Hipokside ise, yıkımın durduğu ve daha sonra biriken Hif-1 α 'nın hücre çekirdeğine transloke olarak çeşitli genlerin ekspresyonunu etkilediği öne sürülmektedir. Ancak, yapılan çalışmalar bu proteinin çekirdekteki miktarının saatler içerisinde azaldığını bildirmektedir. Dolayısı ile, NHE-1 fonksiyonel inhibisyonunun gözlemlendiği 48 saatlik hipokside anlamlı Hif-1 α birikimi olmama olasılığı göz önünde bulundurularak kısa (5 saat) ve uzun (48 saat) süreli hipoksi sonrasında da hücre içi Hif-1 α birikimine bakıldı. Deneylerde hipoksi deney grubuna ek olarak normoksik koşullardaki hücreler ayrı bir deney grubu oluşturularak Hif-1 α 'nın yıkımından sorumlu olduğu öne sürülen prolil hidroksilaz enziminin inhibitörü dimetiloksalilglisin (DMOG) ile de inkübe edildi. Hücrelerdeki Hif-1 α miktarının belirlenmesi için immünofloresans yöntemi ile floresans işaretli antikorlar kullanıldı. Floresans şiddeti konfokal mikroskopta (Leica, SP5) ölçüldü. Ayrıca, hücrelerde çekirdeğin konumunu saptamak için DNA boyası yo-pro-1 kullanıldı. HL-1 hücrelerinde 5 saatlik hipoksi veya normokside 5 saatlik DMOG (1 mM) inkübasyonu çekirdekteki Hif-1 α miktarını anlamlı olarak artırırken, sitoplazmadaki miktarını değiştirmede (Şekil 3.8 ve 3.10). Normoksik kontrol hücrelerde çekirdek ve sitoplazma Hif-1 α miktarı arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 3.8 ve 3.9). Benzer şekilde, 48 saatlik hipoksi veya normokside DMOG inkübasyonu hücre çekirdeğinde Hif-1 α miktarını artırırken sitoplazmadaki miktarını etkilemedi (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Hipoksi veya normokside DMOG ile inkübasyon süresinin uzaması (48 saat) sitoplazmadaki Hif-1 α miktarını azaltırken çekirdek miktarını değiştirmede (Şekil 3.10).

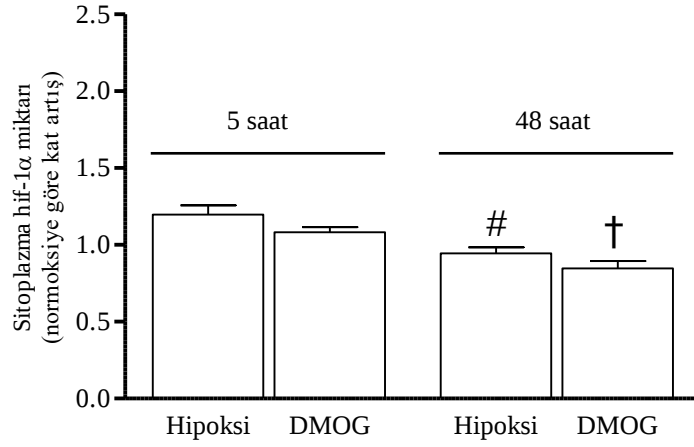


Şekil 3.8. HL-1 hücrelerinde 5 saatlik hipoksi ve normoksida DMOG (1 mM) inkübasyonu sonrasında hücre içi Hif-1 proteininin çekirdeğe translokasyonunu gösteren konfokal görüntüsü. Hücreler sırasıyla Hif-1 α birincil antikoru, Alexa flor 594 ikincil antikoru (kırmızı) ve 2,5 μ M Yo-Pro-1 DNA boyası ile inkübe edildi. Hücre çekirdek sınırları Yo-pro-1 sinyalinin filtrelendikten sonra gri skalaya (beyaz) dönüştürülmesi ile elde edildi. Normoksida 5 saat DMOG ile inkübe edilen hücreler (C) ve normoksik kontrol hücreleri (A). 5 saat hipoksida (% 3 PO₂) tutulan hücreler (D) ve normoksik kontrolleri (B) (n:3).

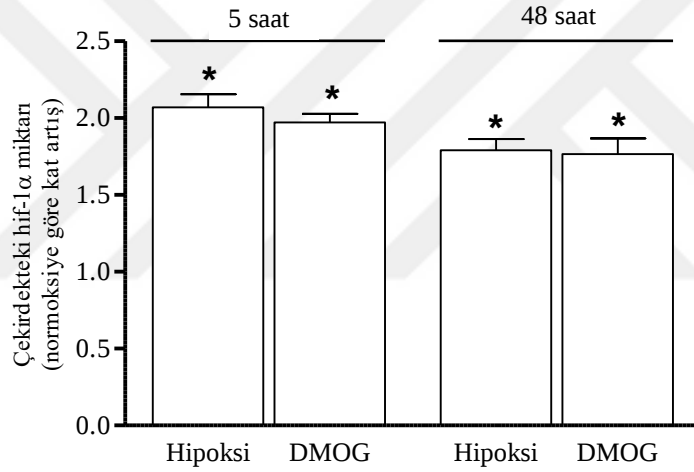


Şekil 3.9. HL-1 hücrelerinde 48 saatlik hipoksi ve normokside DMOG (1 mM) inkübasyonu sonrasında hücre içi Hif-1 proteininin çekirdeğe translokasyonunu gösteren konfokal görüntüsü. Hücreler sırasıyla Hif-1 α birincil antikoru, Alexa flor 594 ikincil antikoru (kırmızı) ve 2,5 μ M Yo-Pro-1 DNA boyası ile inkübe edildi. Hücre çekirdek sınırları Yo- pro-1 sinyalinin filtrelendikten sonra gri skalaya (beyaz) dönüştürülmesi ile elde edildi. Normokside 48 saat DMOG ile inkübe edilen hücreler (C) ve normoksik kontrol hücreleri (A). 48 saat hipokside (% 3 PO₂) tutulan hücreler (D) ve normoksik kontrolleri (B) (n:3).

A)



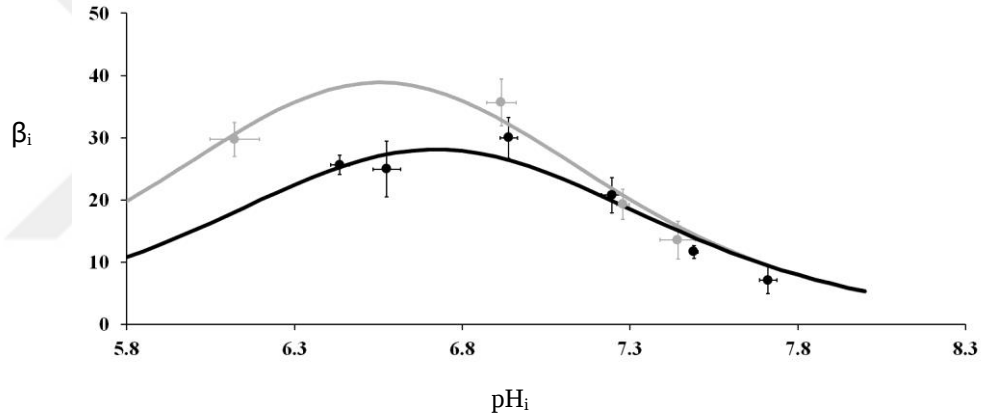
B)



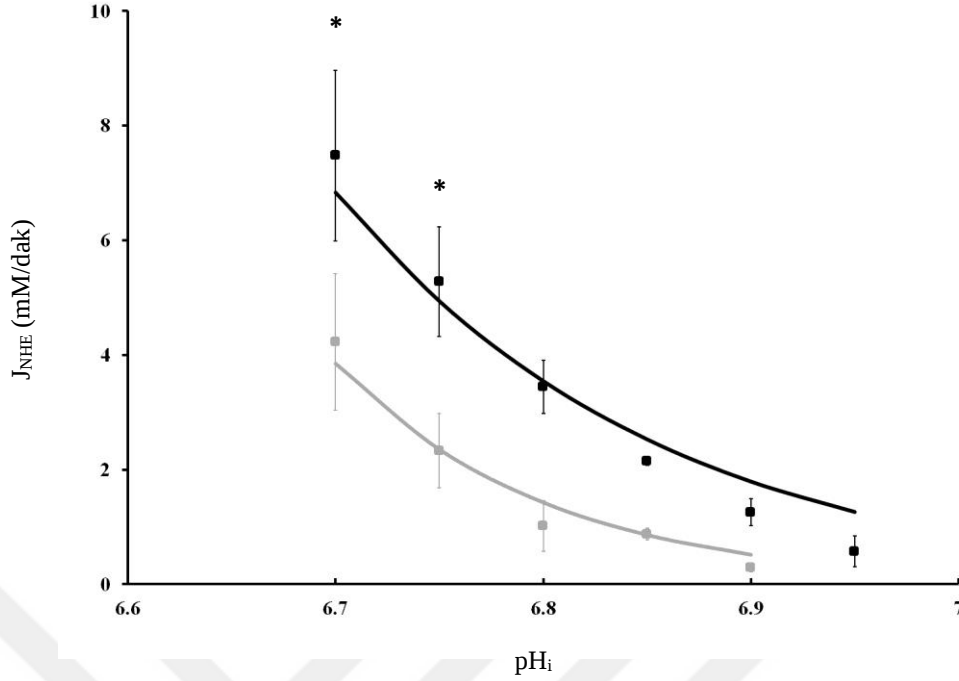
Şekil 3.10. HL-1 hücrelerinde hipoksi ve normokside DMOG inkübasyonu sonrasında sitoplazma (A) ve çekirdekteki (B) konfokal mikroskopta immüno Floresans birim alan başına düşen şiddet ölçümünden hesaplanan Hif-1α miktarları. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ve normoksiye göre normalize edilerek verilmiştir. # 5 saat hipoksiye göre, † 5 saat normoksi + DMOG'a göre, * normoksiye göre $P < 0,05$, $n=3$.

3.5. HL-1 Hücrelerinde Normoksida 48 Saatlik DMOG İnkübasyonunun NHE Aktivitesine Etkisi

HL-1 hücrelerinde normoksida 48 saatlik 1 mM DMOG inkübasyonu Hif-1 α 'yı çekirdeğe transloke ederek hipoksinin Hif-1 α üzerindeki etkisini taklit etti. DMOG inkübasyonunun NHE aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla ilk başta tamponlama kapasitesine olan etkisi ölçüldü. 48 saatlik DMOG inkübasyonu hücrelerin tamponlama kapasitesini hipoksiye benzer şekilde artırdı (Şekil 3.11). Tamponlama kapasitesindeki artışa rağmen, 48 saatlik DMOG inkübasyonu NHE aktivitesini hipoksiye benzer şekilde inhibe etti (Şekil 3.12).



Şekil 3.11. 48 saat normoksik kontrol (siyah) ve 48 saat normoksida 1 mM DMOG ile inkübe edilen (gri) gruplarda pH_i 'ye bağımlı hücre içi doğal tamponlama (β_i) değerleri. β_i ortalama değerleri birbirini takip eden yaklaşık 0,3 pH ünitelik dilimlerden hesaplandı (n=7-14). Grafikteki sürekli eğri metotta bahsedilen fizyolojik tamponlama denkleminin hesaplandığıdır.

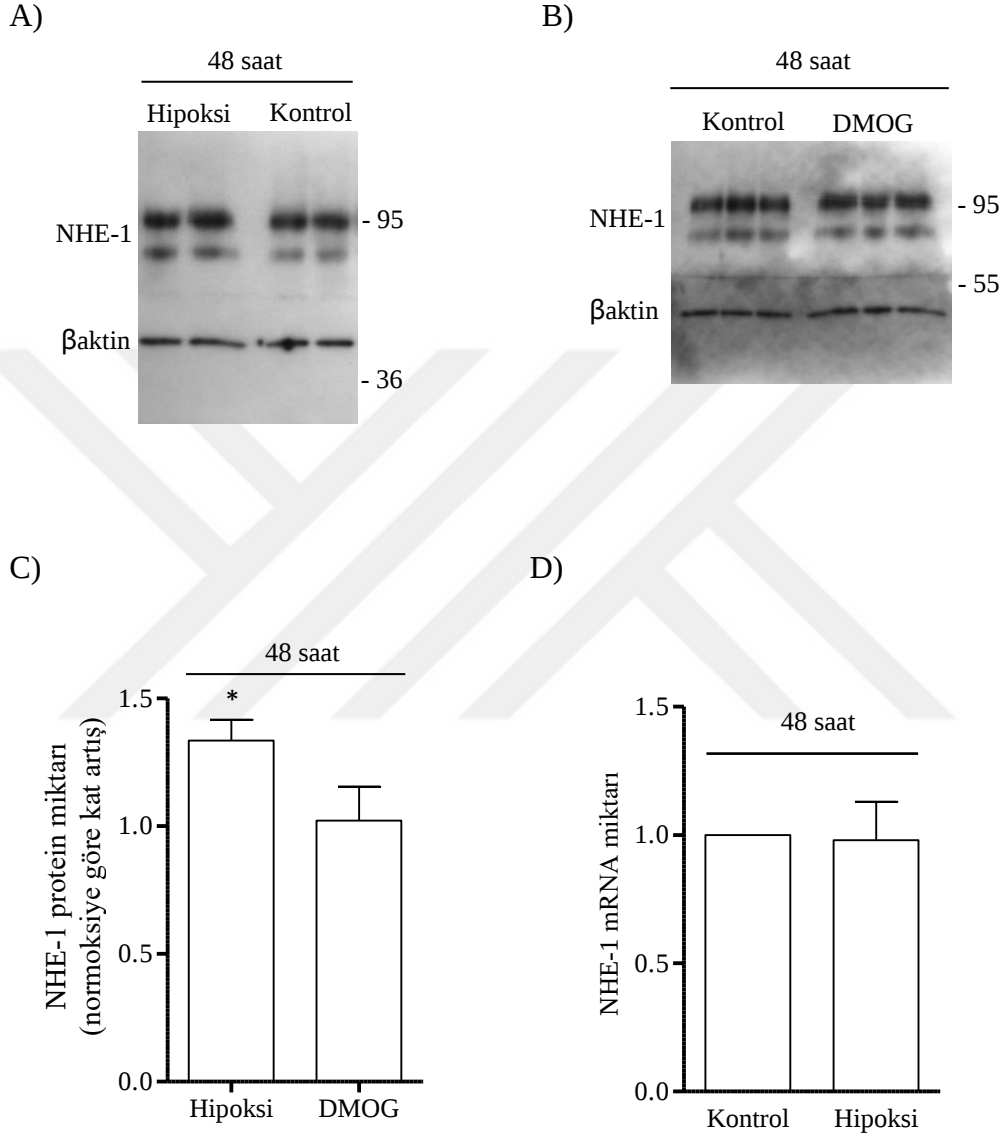


Şekil 3.12. pH_i'ye bağlı NHE aktivitesi. Ortalama NHE aktivitesi pH_i 6,7-6,95 aralığında ve 0,05'lik dilimlerde gösterildi. 48 saat normoksida 1 mM DMOG inkübasyonu (gri) 48 saat normoksik kontrol (siyah) hücrelere göre NHE aktivitesini azalttı (n=4, * P<0,05).

3.6. HL-1 Hücrelerinde Hipoksi ve Normoksida DMOG İnkübasyonunun NHE Ekspresyonuna Etkisi

48 saatlik hipoksi veya normoksida DMOG ile inkübasyon hücrelerde ortak şekilde Hif-1 α birikimi, tamponlama kapasitesinde artış ve NHE aktivitesinde inhibisyon yapmaktadır. Bu sonuçlar, J_{NHE}'deki inhibisyonun Hif-1 α aracılı olduğunu düşündürdü. Hif-1 α bir transkripsiyon faktörü olduğundan doğrudan ya da dolaylı olarak genlerin ekspresyon artış veya azalışından sorumlu olabilir. HL-1 hücrelerinde asitten kurtulmanın zoniporid (NHE-1 inhibitörü) ile büyük ölçüde inhibe olmasından NHE-1'in ana izoform olduğu ile anlaşılmış idi. Gözlemlenen NHE aktivitesindeki inhibisyonun NHE-1'in gen ekspresyonundaki azalmaya bağlı olup olmadığını test etmek amacıyla NHE-1 protein ve mRNA miktarı ölçüldü. 48 saatlik hipoksi, NHE-1 mRNA seviyesinde bir değişiklik oluşturmazken, protein miktarında beklenen azalmanın aksine az miktarda artış oluşturdu. Benzer şekilde, normoksida

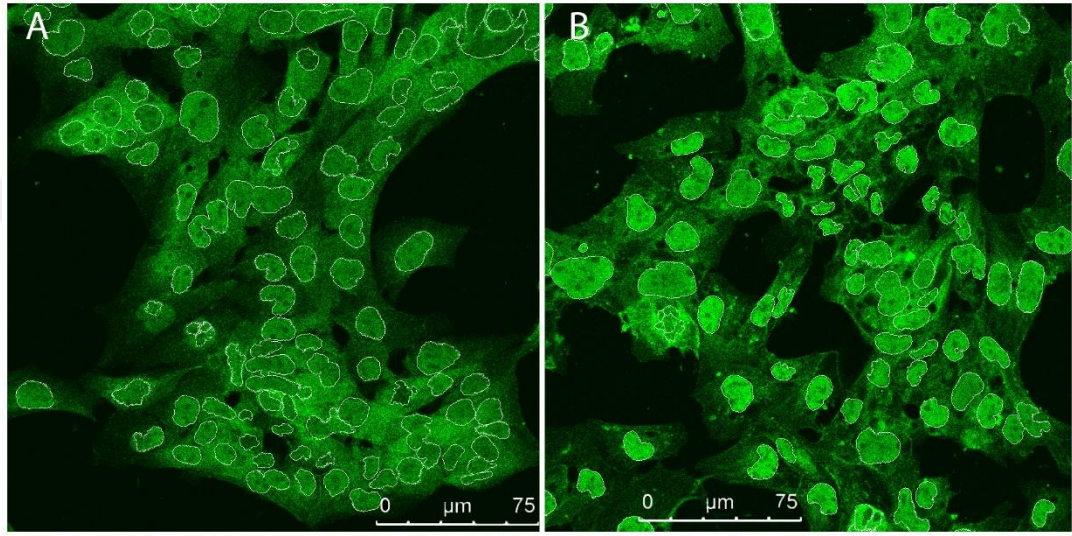
48 saatlik DMOG inkübasyonu da NHE-1 protein seviyesinde bir fark oluşturmadı (Şekil 3.13).



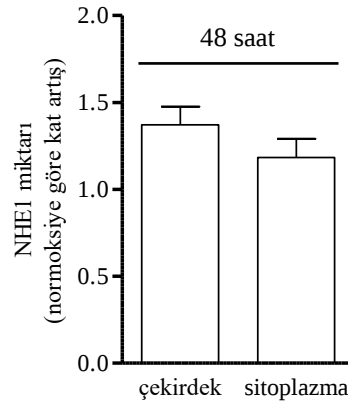
Şekil 3.13. HL-1 hücrelerinde 48 saatlik hipoksi (A) ya da normokside DMOG inkübasyonu sonrasında (B) NHE-1 (ana izoform) ve β -aktin (yükleme kontrolü)'e ait western blot (n=3-4, *p<0,05). Western blotların dansitometrik analizi (C). 48 saat hipoksi sonrasında RT-PCR'da elde edilen NHE-1 mRNA miktarı (D) (n=3).

NHE aktivitesinde gözlenen azalma, toplam protein (sitoplazmik ve membran) azalmasına bağlı gözükmemektedir. NHE-1'in toplam protein miktarında değişiklik olmadan membran fraksiyonunda bir azalma olması (internalizasyon)

gözlemlenen etkileri açıklayabilir. HL-1 hücresinde 48 saat hipoksinin NHE-1 lokalizasyonunda bir değişiklik oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla NHE-1 protein dağılımına immüno Floresans yöntemi ile bakıldı. 48 saatlik hipoksi hücredeki difüz NHE-1 dağılımını değiştirmezken, sitoplazma ve çekirdek NHE-1 floresans şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış oluşturdu (Şekil 3.14).



C)



Şekil 3.14. HL-1 hücrelerinde 48 saatlik normoksi kontrol (A) ile 48 saatlik hipoksi sonrası (B) NHE-1 proteininin lokalizasyonuna immüno Floresans görüntüler. 48 saatlik hipoksi NHE-1 lokalizasyonunu değiştirmeden sitoplazma ve çekirdeğe ait toplam floresans sinyalinde az miktar artış oluşturdu (C). Hücreler sırasıyla NHE-1 birincil antikoru, Alexa flor 594 ikincil antikoru (yeşil) ve 2,5 μ M Yo-Pro-1 DNA boyası ile inkübe edildi. Hücre çekirdek sınırları Yo- pro-1 sinyalinin filtrelendikten sonra gri skalaya (beyaz) dönüştürülmesi ile elde edildi (n=3).

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, memeli kalp hücresinde pH_i dengesinden sorumlu ana izoform olan NHE-1'in aktivitesine uzun süreli hipoksinin (48 saat) etki mekanizması ve bu etkide Hif-1 α 'nın rolü araştırıldı. Bu amaçla fare atrial tümör kökenli HL-1 hücreleri kullanıldı. Bu hücreler, memeli kardiyomiyositlerinin aksine, uzun süreli hipoksi çalışmaları için uygundur (Ambrose ve ark., 2014). Ayrıca, HL-1 hücrelerinin memeli kardiyomiyositlerine elektrofizyolojik açıdan en yakın hücre serisi olduğu düşünülmektedir (White ve ark., 2004). Bu hücrelerde, hücreden asit atımında NHE-1 değiş-tokuşunun katkısını belirlemek amacıyla NHE-1 selektif inhibitörü zoniporid kullanıldı. Zoniporidin insan NHE-1 aktivitesinin % 50'sini inhibe ettiği konsantrasyon 14 nM civarındadır ve diğer NHE izoformlarına yaklaşık 150 kat seçicilik gösterdiği bildirilmiştir (Tracey ve ark., 2003). Ön deneylerimizde, 0,1 μ M zoniporid NHE aktivitesinin % 59'unu, 1 μ M zoniporid ise % 78'ini inhibe etti. Konsantrasyon 30 μ M'a çıkartıldığında zoniporid spesifitesini kaybederek NHE aktivitesinin tamamını durdurdu. Dolayısı ile, memeli kardiyomiyositlerinde olduğu gibi (Kandilci ve ark., 2007; Kandilci ve ark., 2009), HL-1 hücrelerinde de NHE-1'in hücreden yüksek miktarda asit atımından sorumlu ana izoform olduğuna karar verildi. Bu nedenlerden dolayı, tez çalışmasında HL-1 hücreleri tercih edilmiştir. HL-1 hücrelerinde NHE-1 dışındaki asit atımından sorumlu diğer izoform NHE-8 olarak gözükmemektedir. Andersen ve ark. (2009) da HL-1 hücrelerinde NHE-1 ve NHE-8 izoformlarının eksprese olduğunu bildirmişlerdir. HL-1 hücrelerindeki diğer NHE izoformların ekspresyonlarına az miktarda eksprese olmaları, farklı dokulara özgül ekspresyon göstermeleri veya hücre içi organellerde bulunmalarından dolayı bakılmadı (Andersen ve ark., 2009; Gan ve ark., 1999; ve ark., 1999). Ayrıca, bulgularımıza göre HL-1 hücrelerinde NBCe1 ekspresyonu da bulunmaktadır.

Hipoksi çalışmalarında, hipoksinin hücre üzerindeki fonksiyonel etkileri değerlendirilirken hipoksinin derecesi, süresi ve nasıl oluşturulduğu kritik öneme sahiptir. Hipoksi, hücre büyümesini etkiler ayrıca hücrelerin bir bölümünü apoptosize bile götürebilir (Ambrose ve ark. 2014; Hu ve ark., 2010). Dolayısı ile

deneylerin normoksida hipoksiyi taklit eden ajanlarla da (DMOG gibi) tekrarlanabilir olması iyi bir stratejidir. Hipoksida oksijensiz solunumdan dolayı kültür ortam pH'sı aside kayabilmektedir. Bu durum normoksik kontrol hücreler ile aynı koşullarda deney yapılmasını zorlaştırmaktadır. Hulikova ve ark. (2013), kullandıkları hücre kültüründe normoksida (% 21 PO₂) başlangıçta ekilen hücre sayısı arttıkça, hücre kültürü ortamı değiştirilmediğinde 48 saat sonunda ortam pH'sının 7,4'den aside (~6,8) kaydığını ve hipoksik koşullarda (% 2 PO₂) ortamın daha da fazla asitleştiğini (~6,5) gözlemlemişlerdir. Bu bulgular, ön deneylerimizde ortam renk değişikliklerini takip ederek yaptığımız gözlemler ile uyumludur. Ön deneylerde hipoksik inkübasyon yöntemi geliştirilirken, ortam pH'sını aside kaydırmamak için başlangıçta az hücre (48 saat sonra % 80-100 yoğunluktan az olacak şekilde) ekildi. Bu yöntem, ortam pH'sının aside kaymasını durdurdu ancak az yoğunlukta hücre ekilmesi, HCO₃ içermeyen koşullarda hücrelerin bazal pH_i'si normalden (~ 7,2) aside kaydırıldı (Normoksi: 6,77±0,05, Hipoksi: 6,6±0,05, n=5). Az yoğunlukta ekilen hücrelerde bazal pH_i'nin aside kayması hücrelerin asit atan membran proteinlerini yeterli oranda eksprese etmeme olasılığını akla getirdi. Bu gözlemler olgun hücre fenotipinde normal NHE aktivitesi için % 80-100 yoğunluğun gerekli olabileceği şeklinde yorumlandı ve bu yöntemden vazgeçildi. Diğer bir yöntem olarak, hücreleri yeterli yoğunlukta ektikten sonra kültür ortam hacmini artırarak tampon kapasitesini artırmanın ortam pH'sını sabit tutabileceği düşünüldü. Ancak, kültür ortam hacmini artırırken solüsyon derinliğini de beraberinde artırmanın, hücrelerin inkübe edildikleri hipoksi şiddetini değiştirme olasılığı nedeni ile bu düşünceden vazgeçildi. HL-1 hücreleri metabolizma hızı yüksek kanser hücreleridir. Hücrelerin O₂'nin difüzyon ile hücrelere ulaşma hızından daha hızlı O₂ tüketmesi normoksik kontrol hücrelerini bile standart koşullardan çıkarıp hipoksik yapabilir. Böyle bir durum daha önceki bir çalışmada gözlemlenmiştir (Lynn ve ark., 2011). Ortam pH'sını nötr tutabilmek ve aynı zamanda % 80-100 yoğunlukta hücrelerde deney yapabilmek için hücreler öncelikle NHE aktivitesi ölçümüne uygun büyüklükte kırık camlara ekildi. Daha sonra yeterli yoğunluğa erişen hücreler 6'lık kuyulara kuyu başına 2 kırık cam olacak şekilde aktarıldı. Benzer şekilde, biyokimya deneyleri için de hücreler 60 mm'lik petri kabında 2 yuvarlak lamel olacak şekilde aktarıldı. Daha sonra hücreler 48 saat hipoksida inkübasyona alındı. Böylece, % 80-100 yoğunluktaki hücrelerde

ortamın pH'sı sabit tutuldu. Deneylerde, normoksi ve hipoksideki hücrelere eşit miktar asit yüklemesi yapılarak NHE aktive edildi. Bu şartlar altında, 48 saat hipoksi NHE aktivitesini inhibe etti. Sonuçlarımız, kanser hücre serilerinde 48 saatlik hipoksi ile NHE aktivitesinin inhibe olduğunu gösteren bir başka çalışma ile de uyumludur (Hulikova ve ark., 2013). 48 saat hipoksi hücrelerin tamponlama kapasitesini artırdı. NHE aktivitesi tamponlama kapasitesinin bir fonksiyonudur. Hipoksi ile tamponlama kapasitesindeki artışa rağmen NHE aktivitesi inhibe oldu. Hücrelerin 48 saat normokside DMOG ile inkübasyonu da NHE aktivitesinde inhibisyon ile tamponlama kapasitesinde benzer bir artış oluşturdu. Dolayısı ile gözlemlenen inhibisyon, tamponlama kapasitesindeki değişiklik ile açıklanamamaktadır. 24 saatlik hipoksi ise hücrelerin tamponlama kapasitesini değiştirmeden NHE aktivitesini azalttı ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu bulgu, hipoksi ile indüklenen NHE aktivitesindeki inhibisyonu gözlemlemek için en uygun hipoksi süresinin 48 saat olduğunu gösterdi.

HL-1 hücrelerinde NHE-1 aktivitesi 10 dk sodyum diatonit ile oluşturulan akut anoksi ile memeli kardiyomiyositlerinde olduğu gibi inhibe oldu (Kandilci ve ark., 2007; Kandilci ve ark., 2009). Bu inhibisyon dakikalar içerisinde geri döndü. 48 saatlik hipoksi veya normokside DMOG inkübasyonu ile NHE aktivitesinde gözlemlenen inhibisyon ise akut anoksideki inhibisyonun aksine normoksik şartlardaki deney süresi olan yaklaşık 2 saat boyunca geriye dönmedi. Bu durum akut anoksi ve uzun süreli hipoksideki NHE inhibisyon mekanizmalarının farklı olabileceğini düşündürdü. 48 saatlik hipoksi ile NHE'nin maksimum aktivitesinde (V_{max}) azalma olması, NHE'nin H^+ 'e afinitesinin değişmesi ile açıklanamayacak protein miktar değişikliklerini akla getirdi. 48 saatlik hipoksi, NHE-1 mRNA düzeyini etkilemeden protein miktarını beklenenin aksine artırdı. NHE-1 toplam (membran + sitoplazma) proteininde değişiklik olmadan hipoksinin fonksiyonel membran protein fraksiyonunda azalma (internalizasyon) oluşturup oluşturmadığını anlamak için hipoksi sonrasında NHE-1 immüno Floresansı ölçüldü. Normoksik kontrol hücrelerinde membran fraksiyonunun ayırt edilemediği homojen NHE-1 dağılımı gözlemlendi. NHE-1 immüno Floresansı çekirdekte de görüldü. Sıçan kardiyomiyositlerinde immüno Floresans yöntemle çekirdekte NHE-1 bulunduğu daha

önce de bildirilmiştir (Bkaily ve ark., 2004; Lawrence ve ark., 2010). Bu dağılıma benzer bir dağılım hipoksik inkübasyon sonrasında da gözlemlendi ve hipoksi ile NHE-1 internalizasyonuna ait görsel bir bulgu elde edilmedi. Ancak, çalışmamızda sadece membrandan gelen NHE-1 sinyali ölçülmediğinden görsel bulgularımız NHE-1 internalizasyonu olmadığının kanıtı değildir. Hipoksi ile toplam NHE-1 immünofloresans sinyalinde değişiklik olmaması western blot yöntemi ile elde ettiğimiz NHE-1 protein sonuçları ile uyumludur. Ayrıca, hipoksi ile indüklenen NHE-1 inhibisyonunun nedeni sadece NHE-1 ekspresyonunda azalma olsa idi, hipoksik hücrelerin bazal pH_i 'sinde aside kayma gözlemlenmesi gerekirdi. Ancak, HCO_3^- 'süz koşullarda NHE aktivitesinin ölçüldüğü deneylerde normoksik kontrol ve hipoksik hücrelerinin bazal pH_i 'leri arasında böyle bir fark görülmedi. 48 saat normokside DMOG ile inkübasyon da NHE-1 protein seviyesini değiştirmedir. Hipoksi ile NHE-1 protein seviyesinde beklenen azalma olmaması inhibisyon mekanizmasının protein ekspresyonundan bağımsız olduğunu göstermektedir. Bu bulguların aksine, Hulikova ve ark. (2013), yukarıda bahsedildiği gibi 48 saat hipoksinin sonunda ortam pH'sının aside kaydığı hücrelerden kaydedilen NHE aktivitesinde inhibisyon gözlemlenmiş ve bu inhibisyonun NHE-1 protein seviyesindeki azalmaya bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, normoksik koşullarda HCO_3^- miktarını azaltarak ortam pH'sını aside ($pH: \sim 6,6$) kaydardıklarında ise, NHE-1 protein miktarı değişmeden aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir. Böylece, 48 saat hipoksi ile NHE-1 aktivitesinde gözlenen inhibisyonun mekanizmasının NHE-1 protein seviyesindeki azalma olduğunu öne sürmüşlerdir. Sonuçlar arasındaki bu fark araştırmacıların kullandıkları kanser hücre serilerindeki mekanizmanın farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Shimoda ve ark., (2006), pulmoner arter düz kas hücrelerinin 48 saat % 4 hipokside inkübasyonunun NHE-1 mRNA'sını artırdığını bildirmiştir. Bu artışın mekanizmasının Hif-1 α 'nın doğrudan NHE-1 transkripsiyonunu artırması olduğunu öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda böyle bir bulgu elde edilmemiştir.

Bu tez çalışmasında hipoksi ile indüklenen NHE-1 inhibisyonunda Hif-1 α 'nın rolünü anlamak için normokside hücrelerde Hif-1 α birikimi yapan PHD enzim inhibitörü DMOG kullanıldı. Hif-1 α , hücrelerin hipoksiye verdiği yanıtta büyük rol oynadığı için hipoksiyi taklit etmek amacıyla kullanılmaktadır (Ambrose ve ark.,

2014; Natarajan ve ark., 2007). Normoksik koşullarda Hif-1 α proteininin PHD enzimi aracılığıyla proteozomda hızla yıkıldığı, hipokside ise yıkımının azalarak sitoplazmada biriktiği ve çekirdeğe transloke olduğu ileri sürölmektedir (Ke ve Costa, 2006). PHD enzimindeki Fe⁺² bağlanma bölgelerine kobalt klorür, nikel klorür ve deforoksamın (DFO) gibi bazı metallerin bağlanması ile de PHD enziminin inhibe olduğu ve Hif-1 α birikimine yol açtığı ileri sürölmüştür (Weidemann ve Johnson, 2008; Vassilopoulos ve Papazafiri, 2005). Bu tez çalışmasında, Hif-1 α miktarı ölçümü için immünofloresans yöntemi tercih edilmiştir. Aynı yöntem ile, HL-1 hücrelerinde 24 saat hipoksi (% 2 PO₂) ya da normokside aynı süre DFO inkübasyonunun çekirdekteki Hif-1 α miktarını sırasıyla 14 ve 7,4 kat artırdığı bilinmektedir (Ronkainen ve ark., 2007). Bizim bulgularımız ise, 48 saat hipoksi ve normokside DMOG inkübasyonunun çekirdekte Hif-1 α miktarında 2 kat artış olduğunu göstermektedir. Hipoksinin saatler içerisinde hızla çekirdekte biriktiği daha sonra hipoksi devam etmesine rağmen çeşitli yolaklar ile Hif-1 α 'nın yıkıldığı öne sürölmüştür (Ambrose ve ark., 2014). Ronkainen ve ark. (2007) ile bizim bulgularımız karşılaştırıldığında, hipoksi ile indüklenen Hif-1 α miktarında görölen artış farkının nedeninin bu mekanizma olabileceğini düşöndürdü. Ancak bulgularımız, 5 saatlik hipoksi veya normokside DMOG inkübasyonun da çekirdekteki Hif-1 α miktarını 2 kat artırdığını göstermektedir. Dolayısı ile hipoksi süresine bağlı Hif-1 α miktarındaki azalma mekanizması bulgularımız ile uyumlu değildir.

Bu tez çalışması, HL-1 hücrelerinde NHE aktivitesinin uzun süreli hipoksi ile Hif-1 α aracılı inhibe olduğunu öne sürmektedir. Bu inhibisyonda NHE-1 protein seviyesindeki değişiklikler rol oynamamaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmasından elde edilen bulgular NHE-1'in Hif-1 α tarafından regüle edilebileceğini ortaya koymaktadır. Elde edilen sonuçlar, Hif-1 α 'nın bu etkisinin NHE-1 ekspresyonu üzerinden gerçekleşmediği desteklemektedir. Hif-1 α 'nın NHE-1 internalizasyonuna etkisini anlamak için membrandaki NHE-1'in işaretleneceği biyotinleme deneyleri yapılacaktır.

Hipoksi aynı zamanda hücre canlılığını etkilediğinden ileride hipoksinin pH_i dengesinden sorumlu NBC aktivitesi üzerine etkisine de bakılması planlanmaktadır.

Ayrıca, bu tez çalışmasında Hif-1 α 'nın rolünü göstermek için kullanılan DMOG hücredeki PHD dışındaki diğer dioksigenaz enzimlerini de inhibe ettiğinden etkisi spesifik değildir. Dolayısı ile, NHE-1'in Hif-1 α tarafından regüle edildiğini tam olarak gösterebilmek için Hif-1 α gen ekspresyonunun susturulduğu deneyler yapılması gerekmektedir.

ÖZET

HL-1 hücrelerinde Na^+/H^+ değiş-tokuşusunun regülasyonunda hipoksi ile indüklenen faktörlerin rolünün incelenmesi

Miyokard iskemisi, hipertrofi ve kalp yetmezliği gibi kardiyak patolojilerde hipoksi oluşmaktadır. Hipoksik koşullarda hücre içi pH (pH_i) aside kaymaktadır. Hücre içinde oluşan asitin hücreden atımında ve pH_i regülasyonunda asit atan proteinler önemli rol oynamaktadır. NHE-1, memeli kardiyomiyositinde pH_i regülasyonundan sorumlu ana proteindir. Memeli kardiyomiyositlerinde hipoksinin asit atan mekanizmalar üzerine etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, fare atrial tümör kökenli HL-1 hücrelerinde, hipoksinin NHE aktivitesi üzerindeki etkisi araştırıldı. HL-1 hücrelerinden NHE aktivitesi pH duyarlı boya BCECF ($5 \mu\text{M}$) kullanılarak ölçüldü. 48 saatlik hipoksi (% 3 PO_2) NHE aktivitesini azalttı. Bu inhibisyon hipoksi ile indüklenen doğal tamponlama kapasitesi veya NHE-1 protein düzeyi değişikliklerine bağlı değildi. NHE aktivitesinde azalmada Hif-1 α 'nın rolünü araştırmak amacıyla ilk başta hipoksinin hücredeki Hif-1 α miktarına etkisi incelendi. HL-1 hücrelerinde 48 saatlik hipoksi veya normoksida hücrelerde Hif-1 α birikimi yapan dimetiloksalilglisin (DMOG) ile inkübasyon hücre çekirdeğindeki Hif-1 α immünofloresansını artırdı. Normoksida 48 saat DMOG (1 mM) inkübasyonu hipoksinin tamponlama kapasitesi ve NHE-1 protein düzeyi üzerine etkilerini taklit etti ve NHE aktivitesini azalttı. Bu sonuçlar HL-1 hücrelerinde NHE aktivitesindeki azalmanın Hif-1 α bağımlı olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hipoksi, Hipoksi ile indüklenen faktörler, HL-1 hücresi, Sodyum/Hidrojen değiş-tokuşu

SUMMARY

The investigation of the role of hypoxia induced factors in the regulation of Na^+/H^+ exchanger in HL-1 cells

Cardiac pathologies such as myocard ischemia, hypertrophy and cardiac failure cause hypoxia. Under hypoxic conditions, intracellular pH (pH_i) becomes acidic. Acid extruding proteins play an important role in removing the acid formed intracellularly and pH_i regulation. NHE-1 is the main protein responsible from pH_i regulation in mammalian cardiomyocytes. The effect of hypoxia on acid extruding mechanisms in mammalian cardiomyocytes has not been fully understood. In the present thesis, the effects of hypoxia on NHE activity in mice atrial tumor derived HL-1 cells is studied. NHE activity from HL-1 cells were measured using pH sensitive dye BCECF (5 μM). 48 hours of hypoxia (PO_2 % 3) decreased the NHE activity. This inhibition was not due to intrinsic buffering capacity induced by hypoxia or NHE-1 protein level changes. In order to examine the role of Hif-1 α in NHE activity decrease, firstly the effect of hypoxia on cellular Hif-1 α level was investigated. Under 48 hours of hypoxia or normoxia in HL-1 cells, the incubation with dimethyloxalylglycine (DMOG) that causes Hif-1 α accumulation increased Hif-1 α immunofloresans in cell nucleus. 48 hours of DMOG (1 mM) incubation at normoxia mimicked the buffering capacity of hypoxia and its effects on NHE-1 protein levels, and decreased the NHE activity. These findings suggest that the decrease in NHE activity in HL-1 cells may be Hif-1 α dependent.

Key words: Hypoxia, Hypoxia induced factors, HL-1 cell, Sodium/Hydrogen exchange

KAYNAKLAR

- AMBROSE LJA, ABD-JAMİL AH, GOMES RSM, CARTER EE, CARR CA, CLARKE K, HEATER LC (2014). Investigating mitochondrial metabolism in contracting HL-1 cardiomyocytes following hypoxia and pharmacological HIF activation identifies HIF-dependent and independent mechanisms of regulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. **19**: 574-585
- AMİTH SR ve FLİEGEL L (2013). Regulation of the Na/H Exchanger (NHE1) in Breast Cancer Metastasis. *American Association for Cancer Research* **73** (4): 1259-1264
- BAUMGARTNER M, PATEL H, BARBER DL (2004). Na/H exchanger NHE1 as plasma membrane scaffold in the assembly of signaling complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**: 844–850
- BKAİLY H, NADER M, AVEDANİAN L, JACQUES D, PERRAULT C, ABDEL-SAMAD D, D'ORLEANS-JUSTE P, GOBEIL F, HAZZORİ KM (2004). Immunofluorescence revealed the presence of NHE-1 in the nuclear membranes of rat cardiomyocytes and isolated nuclei of human, rabbit, and rat aortic and liver tissues. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **82**: 805-811
- BORON WF ve DE WEER P (1976). Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. *The Journal of General Physiology* **67**: 91-112
- BORSİ E, TERREGNA C, BRİOLİ A, TACCHETTİ P, MARTHELLO M, CAVO M (2014). Treapeutic targeting of Hypoxia and Hypoxia Inducible Factor 1 alpha in Multiple Myeloma. *Translational Research* **165** (6): 641-650
- CAVET ME, AKHTER S, MURTAZINA R, DE MEDINA FS, TSE CM, DONOWITZ M (2001). Half-lives of plasma membrane Na/H exchangers NHE1–3: plasma membrane NHE2 has a rapid rate of degradation. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**: C2039–C2048
- COX GA, LUTZ CM, YANG CL, BİEMESDERFER D, BRONSON RT, FU A, ARONSON PS, NOEBELS JL, FRANKEL WN (1997). Sodium/Hydrogen Exchanger Gene Defect in Slow-Wave Epilepsy Mutant Mice. *Cell* **91**: 139–148
- DYCK JRB, FLİEGEL L (1995). Specific activation of the Na⁺/H⁺ Exchanger gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* **270** (18): 10420-10427
- FLİEGEL L (2005). The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **37**: 33–37
- FLİEGEL L, WALSH MP, SINGH D, WONG C, BARR A (1992). Phosphorylation of the C-terminal domain of the Na⁺/H⁺ exchanger by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* **282**: 139-145
- GAN XT, CHAKRABARTİ S, KARMAZYN M (1999). Modulation of Na/H exchange isoform1 mRNA expression in isolated rat hearts. *Am. J. Physiol.* **277** (46): H993–H998
- GOSS GG, WOODSIDE M, WAKABAYASHİ S, POUYSSEGUL J, WADDELL T, DOWNEY GP, GRİNSTEİN S (1994). ATP Dependence of NHE-1, the ubiquitous isoform of the Na⁺/H⁺ antiporter. *The Journal of Biological Chemistry* **269** (12): 8741-8748

- GUÏSSART C, LÌ X, LEHEUP B, DROUOT N, MONTAUT –VERİENT B, RAFFO E, JONVEAUX P, ROUX AF, CLAUSTRES M, FLİEGEL L, KOENİG M (2015). Mutation of SLC9A1, encoding the major Na⁺/H⁺ exchanger, causes ataxia-deafness Lichtenstein–Knorr syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **24**: 463–470
- HU S, HUANG M, LÌ Z, JİA F, GHOSH Z, LİJKWAN MA, FASANARO P, SUN N, WANG X, MARTELLİ F, ROBBİNS RC, WU JC (2010). MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation* **122**: 124-131
- HULİKOVA A, HARRİS AL, VAUGHAN-JONES RD, SWİETACH P (2013). Regulation of intracellular pH in cancer cell lines under normoxia and hypoxia. *Journal of Cellular Physiology.* **228**: 743-752
- KANDİLCİ HB, LEEM CH, VAUGHAN-JONES RD (2007). Acute anoxia attenuates sodium-hydrogen exchange activity in isolated mammalian ventricular myocytes. Experimental Biology, Washington D.C., ABD, 27 Nisan-02 Mayıs 2007. *Faseb Journal* **21** (6): A1281-A1282.
- KANDİLCİ HB, LEEM CH, SWİETACH P, VAUGHAN-JONES RD (2009). Hypoxic sensitivity of the sodium-hydrogen exchanger in isolated mammalian ventricular myocytes. The role of intracellular ATP. BPS toplantısı, Londra, İngiltere, 15-17 Aralık 2009. *pA2 online* **7** (4): Bildiri No: 48
- KARMAZYN M, GAN XT, HUMPHREYS RA, YOSHİDA H, KUSUMOTO K (1999). The Myocardial Na-H Exchange Structure, Regulation, and Its Role in Heart Disease. *Circ Res.* **85**: 777-786
- KE Q ve COSTA M (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology.* **70**: 1469-1480
- LAWRENCE SP, HOLMAN GD, KOUMANOV F (2010). Translocation of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1) in cardiomyocyte responses to insulin and energy-status signalling. *Biochem. J.* **432**: 515–523
- LAZDUNSKİ M, FRELİN C, VİGNE P (1985). The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol* **17** (11): 1029-42
- LEE B, SYKES BD, FLİEGEL L (2013). Structural and functional insights into the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **61**: 60-67
- LEEM CH, LAGADİC-GOSSMANN D, VAUGHAN-JONES RD (1999). Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. *Journal of Physiology* **517** (1): 159-180
- LİU Y, BASU A, LÌ X, FLİEGEL L (2015). Topological analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochimica et Biophysica Acta* **1848**: 2385–2393
- LUCİEN F, BROCHU-GAUDREAU K, ARSENAULT D, HARPER K, DUBOİS CM (2011). Hypoxia-Induced Invadopodia Formation Involves Activation of NHE-1 by the p90 Ribosomal S6 Kinase (p90RSK). *PLoS ONE* **6**(12): e28851

- LYNN SG, LAPRES JJ, STUDER-RABELER K (2011). Oxygen monitoring in cell cultures. *Gen Engin Biotech News* **31(6)**: 52-53
- MURER H, HOPFER U, KINNE R (1976). Sodium/Proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem. J.* **154**: 597-604
- NAKAMURA N, TANAKA S, TEKO Y, MITSUI K, KANAZAWA H (2005). Four Na⁺/H⁺ Exchanger isoforms are distributed to golgi and post-golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *The Journal of Biological Chemistry* **280** (2): 1561-1572
- NATARAJAN R, SALLOUM FN, FISHER BJ, OWNBY ED, KUKREJA RC, FOWLER AA (2007). Activation of hypoxia inducible factor-1 via prolyl-4 hydroxylase-2 gene silencing attenuates acute inflammatory responses in postischemic myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: 1571-1580
- NIEDERER SA, SWIETACH P, WILSON DA, SMITH NP, VAUGHAN-JONES RD (2008). Measuring and modeling chloride-hydroxyl exchange in the guinea-pig ventricular myocyte. *Biophys J* **94** (6):2385-2403
- PARKER MD, MYERS EJ, SCHELLING JR (2015). Na⁺-H⁺ exchanger-1 (NHE1) regulation in kidney proximal tubule. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**: 2061-2074
- PFAFFL MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* **29** (9): 2002-2007
- POOLE RC, HALESTRAP AP, PRICE SJ, LEVI AJ (1989). The kinetics of transport of lactate and pyruvate into isolated cardiac myocytes from guinea pig. Kinetic evidence for the presence of a carrier distinct from that in erythrocytes and hepatocytes. *Biochem J* **264** (2): 409-418
- PROVINCE P, GRIGUER CE, HAN X, LOUIS BN, SHAYKH HF. Chapter 3, Evolution of The Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications. Edited by Terry Lichter
- RONKAINEN VP, RONKAINEN JJ, HANNINEN SL, LESKINEN H, RUAS JL, PEREIRA T, POELLINGER L, VUOLTEENAHO O (2007). Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *The FASEB Journal* **21**: 1821-1830
- SHIMODA LA, FALLON M, PISARCİK S, WANG J, SEMENZA GL (2006). HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**: 941-949
- SLEPKOV ER, RAINEY JK, SYKES BD, FLIEGEL L (2007). Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem. J.* **401**: 623-633
- SNABAITIS AK, CUELLO F, AVKIRAN M (2008). Protein kinase B/Akt phosphorylates and inhibits the cardiac Na⁺/H⁺ Exchanger NHE1. *Circ Res* **103**: 881-890
- SUN B, LEEM CH, VAUGHAN-JONES RD (1996). Novel chloride-dependent acid loader in the guinea-pig ventricular myocyte: part of a dual acid-loading mechanism. *J Physiol* **495** (1): 65-82

- TRACEY WR, ALLEN MC, FRAZIER DE, FOSSA AA, JOHNSON CG, MARALA RB, KNIGHT DR, GUZMAN-PEREZ A (2003). Zoniporide: a potent and selective inhibitor of the human sodium-hydrogen exchanger isoform 1 (NHE-1). *Cardiovasc Drug Rev* **21** (1): 17-32
- UĞUR O ve JONES TLZ (2000). A proline-rich region and nearby cysteine residues target XL α s to the golgi complex region. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 1421–1432
- WAKABAYASHI S, BERTRAND, IKEDA T, POUYSSEGUR J, SHIGEKAWA M (1994). Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H⁺-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective. *The Journal of Biological Chemistry* **269** (18): 13710-13715
- WANG R, ZHANG P, LI J, GUAN H, SHI G (2016). Ubiquitination is absolutely required for the degradation of hypoxia inducible factor - 1 α protein in hypoxic conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **470**: 117-122
- WANG GL, JIANG BH, RUE EA, SEMENZA GL (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 5510-5514
- WEIDEMANN A ve JOHNSON RS (2008). Biology of HIF-1 α . *Cell Death and Differentiation* **15**: 621-627
- WHITE SM, CONSTANTIN PE, CLAYCOMB WC (2004). Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**: H823-H829
- WU D, POTLURI N, LU J, KIM Y, RASTINEJAD F (2015). Structural integration in hypoxia-inducible factors. *NATURE* **524**: 303-319
- VAUGHAN- JONES RD, SPITZER KW, SWIETACH P (2009). Intracellular pH regulation in heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **46**: 318–331
- VASSILOPOULOS A ve PAPAZAFIRI P (2005). Attenuation of oxidative stress in HL-1 cardiomyocytes improves mitochondrial function and stabilizes Hif-1 α . *Free Radical Research* **39** (12): 1273–1284

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Gül

Soyadı: ŞİMŞEK

Doğum yeri ve tarihi: Alaca-1986

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi, Morfoloji Kampüsü,
Biyofizik Anabilim Dalı, Sıhhiye/ANKARA

II- Eğitimi

Lisans: (2004-2008) Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Fizik Bölümü

Ortaöğretim: (2000-2003) Şehit Nedim Tuğaltay Lisesi

İlköğretim: (1992-2000) Denizhan İlköğretim Okulu

Yabancı dil: İngilizce

III- Bilimsel Etkinlikleri

Proje: SBAG-133S466 numaralı 'Kardiyomiyositlerde endoplazmik retikulum stresi, hücre içi serbest Zn regülasyonu ve mitokondri arasındaki çapraz ilişkinin kalp fonksiyon bozukluğu patolojisindeki rolünün incelenmesi' TÜBİTAK projesinde bursiyer (2 ay süre ile) (Yürütücü: Prof. Dr. Belma TURAN)