TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEMELİ KÜLTÜR HÜCRELERİNDE HÜCRE İÇİ KALSİYUM SİNYALİNDE GÖREV ALAN ELEMANLARIN ENTEGRE BİR SİSTEM OLARAK İNCELENMESİ

Erol ÖZGÜR

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet UĞUR

2008- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEMELİ KÜLTÜR HÜCRELERİNDE HÜCRE İÇİ KALSİYUM SİNYALİNDE GÖREV ALAN ELEMANLARIN ENTEGRE BİR SİSTEM OLARAK İNCELENMESİ

Erol ÖZGÜR

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet UĞUR

2008- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 05/08/2008

Prof. Dr. Ongun ONARAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Mehmet UĞUR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Nuhan PURALI
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Aslıhan KÖKSOY
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay ii
İçindekiler iii
Önsöz iv
Simgeler ve Kısaltmalar v
Şekiller vi
Çizelgeler viii

1. GİRİŞ 1
1.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali 1
1.1.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi 1
1.1.2 Hücre içi Ca^{2+} Sinyalinin Oluşumu 2
1.1.3 Hücre içi Ca^{2+} Sinyalinin Temel Özellikleri 5
1.2 Hücre İçi Ca^{2+} Sinyalinin Matematiksel Modellenmesi 7
1.3 Çalışmanın Amacı 20
2. GEREÇ VE YÖNTEM 22
2.1 Deneysel Çalışma 22
2.1.1 Kültür Hücrelerinin Büyütülmesi 22
2.1.2 Geçici Transfeksiyon 22
2.1.3 Hücrelerin Fluo-3 Asetoksimetil Ester ile Yüklenmesi 23
2.1.4 Hücre İçi Ca^{2+} Derişiminin Ölçümü ve Data Analizi 23
2.1.5 IP_3 Derişiminin Ölçümü ve Data Analizi 25
2.1.6 Hücrelere Uygulanan Kimyasallar ve Yapılan Manipülasyonlar 26
2.2 Matematiksel Modelleme 27
3. BULGULAR 32
3.1 Ca^{2+} Pompalarının Ca^{2+} sinyaline etkileri 32
3.2 IP_3 Kinetiğinin Ca^{2+} Sinyaline Etkisi 36
3.3 Ca^{2+} Osilasyonları 37
3.4 Hücre Tipleri Arasında Ca^{2+} Sinyali Farkları 40
3.5. Kuantal Ca^{2+} Salımı: PMCA'nın rolü 42
3.6 Kuantal Ca^{2+} salımı: Hücre Tipleri Arasındaki Farklar 44
3.7 SERCA'nın Ca^{2+} Yanıtı Süresince Fonksiyonu 46
4. TARTIŞMA 48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 55
ÖZET 56
SUMMARY 57
KAYNAKLAR 58
EKLER 61
Ek-1 61
Ek-2 63
ÖZGEÇMİŞ 64

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, hücre içi kalsiyum sinyal mekanizmasının temel özellikleri, deneysel ve teorik açılardan incelenmiştir. Bu inceleme sonrası elde edilen bulgulardan yola çıkılarak oluşturulan matematiksel modeller yardımıyla, hücre içi kalsiyum sinyalininin özellikleri açıklanılmaya çalışılmıştır.

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımları ve destekleri için Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyofizik Ab.D. Öğretim Üyeleri ve Öğrencilerine, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Teknolojileri AR-GE Birimine ve Sevgili Aileme teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca sağladığı **Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu**'ndan faydalandığım Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu **TÜBİTAK'**a teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
ATP	Adenozin trifosfat
CCE	Kapasitatif Ca^{2+} Girişi
DAG	Diaçilgliserol
$[Ca^{2+}]_{ER}$	Endoplazmik Retikulum Ca^{2+} Konsantrasyonu
$[Ca^{2+}]_i$	Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonu
Ca^{2+}	Kalsiyum İyonu
CPA	Siklopiazonik asit
ER	Endoplazmik Retikulum
GPKR	G Proteini Kenetli Reseptör
GDP	Guanozin difosfat
GFP	Yeşil Floresans Protein
GTP	Guanozin trifosfat
IP_3	İnositol 1,4,5-trisfosfat
IP_3R	İnositol 1,4,5-trisfosfat Reseptörü
La^{3+}	Lanthanum İyonu
Mg^{2+}	Magnezyum İyonu
PIP_2	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfat
PKC	Protein Kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
PMCA	Plazma Membranı Ca^{2+} ATPaz
Po	Açılma Olasılığı
ROI	Region of Interest
RyR	Ryanodin Reseptörü
SERCA	Sarkoplazmik/Endoplazmik Retikulum Ca^{2+} ATPaz
SR	Sarkoplazmik Retikulum
TRP	Transient Reseptör Potansiyeli

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. GPKR etkili Ca^{2+} sinyali (Alberts ve ark., 2002). 5

Şekil 1.2. ER'nin dinamik yapısı. 8

Şekil 1.3. SERCA aktivitesinin $[Ca^{2+}]_i$ ve $[Ca^{2+}]_{ER}$ ile değişimi. 10

Şekil 1.4. SERCA modelleri. 11

Şekil 1.5. PMCA aktivitesinin ölçümü. 12

Şekil 1.6. IP_3R aktivitesinin $[IP_3]$ ile değişimi. 13

Şekil 1.7. IP_3R aktivitesinin $[Ca^{2+}]$ ile değişimi. 13

Şekil 1.8. De Young-Keizer modeli. 14

Şekil 1.9. Othmer-Tang Modeli. 15

Şekil 1.10. Sneyd-Dufour modeli. 16

Şekil 1.11. Swillens modeli. 17

Şekil 1.12. Dawson-Lea-Irvine modeli. 17

Şekil 1.13. *Stokastik* IP_3R simülasyonu. 18

Şekil 1.14. Tampon proteini parametrelerinin reseptör kanalı ağzı Ca^{2+} profiline etkisi. 20

Şekil 2.1. Hücre içi Ca^{2+} derişiminin ölçülmesi. 24

Şekil 2.2. IP_3 ölçümleri. 26

Şekil 2.3. Ca^{2+} kompartmanları akıları. 28

Şekil 2.4. Ca^{2+} değişimi denklemleri. 29

Şekil 2.5. Reseptör kanalı Ca^{2+} akısı ve Ca^{2+} değişim denklemleri. 30

Sekil 2.6. ***Kütle etkisi yasası.*** 31

Şekil 3.1. SERCA inhibisyonu sonucu $[Ca^{2+}]_i$ değişim kinetiği. 33

Şekil 3.2. SERCA ve PMCA'nın birlikte inhibisyonu. 34

Şekil 3.3. Pompa inhibisyonunun kısmi oluşu. 35

Şekil 3.4. IP_3 ile Ca^{2+} sinyali arasındaki ilişki. 36

Şekil 3.5. Uyarı şiddetinin Ca^{2+} yanıtına etkisi. 38

Şekil 3.6. SERCA inhibisyonunun osilasyonlara etkisi. 39

Şekil 3.7. Hücre Tipleri Arasında Ca^{2+} Sinyali Farkı. 41

Şekil 3.8. Kuantal Ca^{2+} salımına PMCA blokajının etkisi. 43

Şekil 3.9. Hücreler arası farkların kuantal Ca^{2+} yanıtına etkileri. 45

Şekil 3.10. Ca^{2+} yanıtı sırasında SERCA blokajının etkisi. 47

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Parametre arama kriterleri. 29

Çizelge 2.2. Hücre içi tampon proteinleri başlangıç değerleri ve parametreleri. 31

1. GİRİŞ

1.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

1.1.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi

Canlılarda gerçekleşen pek çok önemli olayda kalsiyum iyonları (Ca^{2+}) belirleyici rol oynamaktadır. Bu olaylar arasında hareket, kalp atışı, beynin bilgiyi işleyip hafızayı oluşturması, yumurtanın döllenme sonucu aktivasyonu, pankreatik hücrelerde salgılama, yaraların iyileşmesi, sillerin hareket frekansının koordinasyonu, karaciğer hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesi ve apoptoz sayılabilir. Ca^{2+}, hem hücre içi süreçlerde hem de hücreler arası etkileşimde önemli görevlere sahiptir.

Hücre içi Ca^{2+} sinyali, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun ($[Ca^{2+}]_i$) geçici bir şekilde artışından oluşur. Ca^{2+}, bu sinyal oluşturma özelliğinden dolayı, hücre için bir ikincil habercidir. Ca^{2+}, sinyali sadece bağlanma özellikleri veya basitçe ortamdaki varlığı ile taşıyamaz. Bu yüzden sinyal, enformasyon teknolojisindeki akım ve voltajın kullanımına benzer uzamsal ve zamansal formlarla iletilir.

Ca^{2+}'un bu şekilde çeşitli formlara sokulabilmesi, Ca^{2+} sinyalinde görev alan elemanların dinamikleri ile ilişkilidir. Bu elemanların aktiviteleri sonucu Ca^{2+}, hücrede birbirinden farklı pek çok sinyali, örneğin hormon bağlanması veya mekanik uyarıyı, doğru şekilde iletebilmektedir. Ca^{2+} sinyali, bu özelliğinden dolayı çok büyük bir çeşitlilik barındırmaktadır. Bu çeşitliliğin incelenip açıklanması, Ca^{2+}'un ikincil haberci olarak değerlendirilmesinde temel öneme sahiptir, ve bunun yöntemi de Ca^{2+} sinyalini düzenleyen elemanların incelenip bunların özelliklerinin ortaya konulmasıdır (Falcke, 2004).

1.1.2 Hücre içi Ca^{2+} Sinyalinin Oluşumu

Ca^{2+}'un hücre içinde sinyal molekülü görevi görebilmesinin sebebi, $[Ca^{2+}]_i$'nin, hem hücre dışı ortama, hem de hücre içinde Ca^{2+} depolayan yapılara göre çok düşük olmasıdır. Öyle ki hücre dışındaki $[Ca^{2+}]$'u yaklaşık olarak 10^{-3} M, Ca^{2+} depolarında, örneğin endoplazmik retikulumda (ER) 5 x 10^{-4} M civarlarında iken, $[Ca^{2+}]_i$ bu değerlerden binlerce kez daha düşük olan 10^{-7} M seviyelerindedir. Bu yüzden, hem hücre içi ile dışı arasında, hem de ER ile sitoplazma arasında, çok yüksek bir Ca^{2+} derişim farkı vardır. Bu fark, Ca^{2+} için çok büyük bir sürdürücü kuvvet oluşmasına sebep olur. Hem hücre zarı, hem de ER zarından Ca^{2+} geçişi, bu sürdürücü kuvvetin etkisi ile protein yapıdaki kanallardan olur. Bu kanallar, çoğunlukla kapalı durumda olup; voltaj, mekanik uyarı ya da ligand bağlanması ile aktive olur, ve Ca^{2+} geçirgenliği sağlarlar (Alberts ve ark., 2002).

Hücre dışından sitoplazmaya Ca^{2+} girişi sağlayan kanal tipleri şunlardır:

Voltaj Bağımlı Ca^{2+} kanalları: Bu kanallar, membran depolarizasyonu sonucu aktive olur. Bu aktivasyon kanalları Ca^{2+}'a geçirgen hale getirir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla çiftlenir. Bu kanallar, evrimsel olarak voltaj bağımlı sodyum ve potasyum kanalları ile ilişkilidir, ve 10 farklı voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalı alttipi bilinmektedir (Catterall ve ark., 2005).

Ligand Bağımlı Ca^{2+} kanalları: Bu kanallar, hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve Ca^{2+}'a geçirgen hale gelirler. Bu yüzden bu kanallar aynı zamanda birer reseptördür. Bu kanallara P2X pürinerjik reseptörleri veya nikotinik Asetilkolin (ACh) reseptörleri örnek verilebilir. Bu kanalların bazıları, Ca^{2+} dışındaki katyonlara da geçirgendirler, bu kanallar seçici olmayan katyon kanalları olarak adlandırılırlar (McKay ve ark., 2007; North, 2002).

Depo Boşalması ile Aktive olan Ca^{2+} Kanalları: Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre içi Ca^{2+} depoları, Ca^{2+} sinyali

sonucu, ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca^{2+} girişine sebep olurlar. Bu Ca^{2+} girişi, kapasitatif Ca^{2+} girişi (CCE) olarak da adlandırılır. Bu kanallara örnek olarak, transient reseptör potansiyeli (TRP) kanallarının bazıları gösterilebilir. Bu kanallar, depo boşalması ile aktive olup hem Ca^{2+} sinyalini, hem de hücre içi Ca^{2+} homeostazını düzenlerler. Bu kanalların bir diğer özeliği de lanthanum (La^{3+}) gibi üç değerlikli katyonlarla inhibe olmalarıdır (Putney ve ark., 2001).

Hücre içi Ca^{2+} depolarından Ca^{2+} çıkışını sağlayan yapılar ise şunlardır:

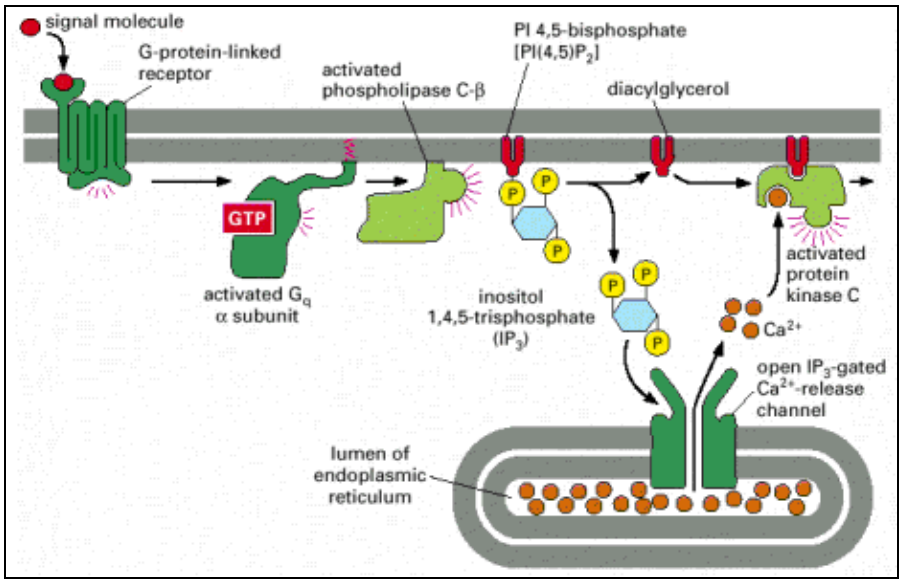
Ryanodin Reseptörleri: Kas hücrelerindeki ER'nin modifiye olmuş şekline *sarkoplazmik retikulum* (SR) ismi verilmektedir (Alberts ve ark., 2006). SR'dan Ca^{2+} salımını sağlayan kanal ise, ryanodin reseptörüdür (RyR). RyR'lerin aktivasyonu öncelikle voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarından hücre içine giren Ca^{2+} tarafından olmakta, bu reseptörler Ca^{2+} ile zaman içerisinde önce aktive, ardından inhibe olmakta, aktif halde iken Ca^{2+} kanalı özelliği göstermektedirler. İnhibisyon durumu [Ca^{2+}] biraz daha arttırıldığı zaman aşıldığı için, *adaptasyon* olarak adlandırılmaktadır (Keizer ve Levine, 1996). Reseptörlerin Ca^{2+} ile aktivasyonu, Ca^{2+} etkili Ca^{2+} salımı olarak (CICR) adlandırılmaktadır. Bu mekanizma, kas kasılmasını sağlayan temel unsurlardan biridir. RyR'ler, bu etkinin daha belirgin görülebilmesi için, kas hücrelerinde t-tübülleri çevresinde kümelenmişlerdir. Reseptörleri Ca^{2+} dışında kafein de aktive etmekte, ryanodin ise reseptörlere yüksek afinite ile bağlanıp, reseptörleri düşük geçirgenlikli bir duruma getirmektedir (Hille, 2001). Bunun dışında adenozin trifosfat (ATP), magnezyum (Mg^{2+}) ve protein-protein ilişkileri de bu reseptörün düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu reseptörün memelilerde üç alttipi bulunmaktadır ve kas hücreleri dışında özellikle sinir hücrelerinde de Ca^{2+} sinyalinde görev almaktadırlar (Laver, 2006).

İnositol 1,4,5-trisfosfat Reseptörleri: Hücre içi sinyal iletiminde en yaygın ikincil habercilerden biri olan inositol 1,4,5-trisfosfat (IP_3) etkisi ile aktive olup kanal özellikleri ile ER'den Ca^{2+} salımına yol açan reseptörler, inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü (IP_3R) olarak adlandırılmaktadır. Reseptörlerin protein yapısı, RyR'ler ile

belirgin şekilde benzerlik taşımaktadır. IP_3R'ler, IP_3, ve RyR'ler gibi Ca^{2+} ile aktive olmakta, yine RyR benzeri şekilde, fakat özellikle yüksek derişimdeki Ca^{2+} ile inaktif hale gelmektedir (Patel ve ark., 1999). Reseptörün IP_3'e adaptasyon gösterdiğine dair de bulgular vardır (Dufour ve ark., 1997) Reseptörün ayrıca ATP, fosforilasyon, ve FKBP12 ve kalmodülin gibi proteinler ile de etkileştiği ve bu proteinlerin reseptör fonksiyonunu düzenlediği bilinmektedir (Patel ve ark., 1999).

Uyarılabilir olmayan hücrelerde, Ca^{2+} sinyalini oluşturan temel mekanizma, IP_3 etkili Ca^{2+} salımıdır. Bu salımı sağlayan IP_3 molekülü, hücre zarında bulunan fosfaditil inositol 4,5-bifosfatın (PIP_2), fosfolipaz C (PLC) tarafından IP_3 ve diaçilgliserole (DAG) parçalanması ile oluşur. Başka bir sinyal molekülü olan DAG, hücrede önemli fonksiyonları olan protein kinaz C'yi (PKC) ve bazı TRP kanallarını aktive ederken, IP_3, IP_3R'lerden Ca^{2+} salımına yol açar.

IP_3 oluşumunu sağlayan PLC'nin çeşitli alttipleri arasında en önemlilerden birisi PLC-β'dır. Bu protein, G protein kenetli reseptörlerin (GPKR), dış ortamdan gelen ligandlarla etkileşmesi sonucu aktive olur. Çeşitli G proteini alttiplerinden biri olan G_q proteinleri ile kenet oluşturan reseptörler, ligandlar vasıtası ile uyarıldığında, heterotrimerik yapıda olan, Gα ve Gβγ altünitelerinden oluşan G_q proteinlerinde, uyarılmamış durumda guanozin difosfat (GDP) bağlı olan Gα altünitesinde, GDP/guanozin trifosfat (GTP) değiştokuşu yaşanır. Aktive olan Gα, PLC-β'yı aktive ederek IP_3 oluşumunu sağlamış olur. Bu süreçte GTP'nin GDP'ye hidrolizi, Gα'nın tekrar Gβγ ile bir araya gelmesine yol açar, bu sayede sinyal bir sonraki döngüye dek sonlanmış olur (Alberts ve ark., 2002). GPKR uyarımı sonucu oluşan Ca^{2+} sinyali Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. GPKR etkili Ca^{2+} sinyali (Alberts ve ark., 2002).

Aynı fonksiyona sahip, fakat farklı uyarılarla aktive olan başka PLC alttipleri de vardır. Bunlar, PLC-γ, PLC-δ ve PLC-ε proteinleridir. Bunlar arasında fonksiyonu en iyi açıklığa kavuşturulan PLC-γ, reseptör tyrosin kinazların dış ortamdan gelen uyaranlarla aktivasyonu sonucu aktive olmaktayken, PLC-δ'nın G_h kenetli reseptör aktivasyonu ve CCE ile aktive olduğu düşünülmektedir. PLC-ε'un ise, G_{12} ve G_s kenetli reseptörleri de içeren, birden fazla sinyal yolağını kullandığına dair bulgular vardır (Evellin ve ark., 2002).

1.1.3 Hücre içi Ca^{2+} Sinyalinin Temel Özellikleri

Hücre içi Ca^{2+} sinyalinin en önemli özelliklerinden birisi, geçici olmasıdır. $[Ca^{2+}]$, geçici bir süreliğine artmakta, daha sonra azalmaktadır. Elektiksel olarak uyarılabilir olmayan hücrelerde, her ne kadar hücre dışından sitoplazmaya giren Ca^{2+}'un da sinyale katkısı olsa da (Jan ve ark., 1998), Ca^{2+} sinyalini başlatan temel mekanizma, IP_3R'ler üzerinden oluşan Ca^{2+} salımıdır. Bu yüzden, Ca^{2+} sinyalinin özelliklerini belirleyen olgulardan biri, sitoplazmadaki IP_3 varlığıdır. IP_3, ya çeşitli fosfatazlar tarafından IP_2'ye defosforile edilerek, ya da başka bir sinyal molekülü olduğu düşünülen IP_4'e fosforile edilerek ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Alberts ve ark., 2002).

Ca^{2+} sinyali, geçicilik özelliğini, ortamda IP_3 varlığında da sürdürmektedir. Bu özelliği sağlayan iki temel mekanizma vardır. Bu mekanizmalardan birisi, IP_3R'nin aktivasyonunun, ortamda IP_3 varken bile geçici olmasıdır. IP_3R'leri, çevrelerindeki [Ca^{2+}] arttığı zaman inhibe olmaktadır. Ayrıca, reseptörlerin IP_3'e karşı da adaptasyon gösterdiği düşünülmektedir (Dufour ve ark., 1997) Bu iki mekanizma, Ca^{2+} sinyalinin geçiciliğine önemli katkıda bulunmaktadır.

Ca^{2+} sinyal mekanizmasının ilginç özelliklerinden birisi, Ca^{2+} yanıtlarının kuantal özellik göstermesidir. Submaksimal IP_3 konsantrasyonlarının yarattığı geçici IP_3R aktivasyonunun ardından, hem hücrelerde, hem de hücrelerden izole edilen, Ca^{2+} deposu özelliği taşıyan ve yüzeyinde IP_3R bulunduran veziküllerde, daha yüksek bir IP_3 konsantrasyonunda, reseptörler tekrar aktive olmaktadır. Bu olay, *kuantal Ca^{2+} salımı* olarak adlandırılmaktadır. Bu etkiyi açıklamak için temel düşünceler, IP_3R'lerin IP_3 varlığında adaptasyon geçirmesi, ya da kanal ağzındaki Ca^{2+} varlığından etkilenmeleridir (Dupont ve Swillens, 1996; Dufour ve ark., 1997).

IP_3 varlığında bile Ca^{2+} yanıtının geçici özellik göstermesini sağlayan ikinci mekanizma ise, sitoplazmada artan Ca^{2+} konsantrasyonunun, enerji kullanılarak, pompa ve değiştokuşçular aracılığı ile, azaltılmasıdır. Bu pompa ve değiştokuşçulardan Ca^{2+}'u tekrar hücre içi Ca^{2+} depolarına pompalayan ATPaz sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz (SERCA), hücre dışına pompalayan ise plazma membranı Ca^{2+} ATPaz (PMCA) olarak adlandırılır. Ca^{2+}'un hücre dışına atılmasına, sodyum-kalsiyum değiştokuşçusu da katkıda bulunur. Bütün bu süreçlerde, enerji kullanılır. Bunun sebebi, Ca^{2+}'un kosantrasyon gradientinin tersine hareketinin sağlanmasıdır (Alberts ve ark., 2002).

Ca^{2+} sinyaline ait bir diğer önemli özellik de, sinyalin çoğu zaman Ca^{2+} osilasyonları şeklinde olmasıdır. Bu osilasyonların tepe noktaları ve frekansları, uyarı cinsi ve şiddetine göre, değişmekte, ve hücrelerde farklı sonuçlara yol açmaktadır (Alberts ve ark., 2002). Yapılan araştırmalar, osilasyon görülmesinde ve özelliklerinde, uyarı şiddetinin ve SERCA aktivitesinin belirleyici olduğunu göstermiştir. Uyarı şiddeti azaldığı zaman, osilasyonların arttığı görülmüştür (Hajnoczky ve Thomas, 1997).

Ayrıca SERCA yüksek ekspresyonunun da, osilasyon sıklığını etkilediği gözlenmiştir (Falcke ve ark., 2003).

Ca^{2+} sinyalinin diğer bir özelliği ise, bazı hücrelerde, örneğin oosit, hepatosit, myosit ve pek çok diğer hücre türünde, Ca^{2+} dalgaları şeklinde yayılmasıdır. Bu dalgaların tepe noktası en fazla 1 μM olmakta, periyodik oldukları zaman frekansları 20 ile 250 s. arasında değişmektedir. Bu dalgalar, Ca^{2+} sinyalinin hem evrensel, hem de hücre tipine özgü karakteristiklerini yansıtmaktadır (Falcke, 2004).

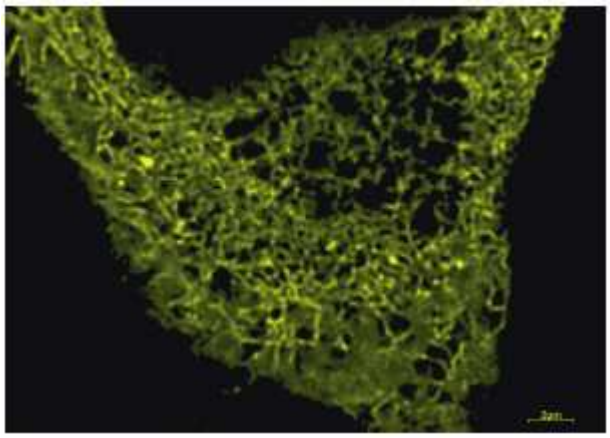
1.2 Hücre İçi Ca^{2+} Sinyalinin Matematiksel Modellenmesi

Ca^{2+}'un sinyal molekülü olarak önemi, Ca^{2+} sinyal mekanizmasının detaylı bir analizini gerekli kılmaktadır. Teorik analiz, özellikle osilasyonlar ve Ca^{2+} dalgaları gibi deneysel olarak gözlenen ama açıklanmasında eksiklikler olan olayların kavrayışında, değerli katkılar sağlamaktadır. Sadece osilasyon çeşitliliği bile, ancak detaylı modellerle açıklanabilecek, hücre için Ca^{2+}'un taşıyabileceği birbirinden farklı çok sayıda anlamı işaret etmektedir. Modelleme açısından günümüze kadar çok mesafe kat edilmiş olsa da, deneysel çalışmalarda olduğu gibi, modelleme açısından da daha yapılması gereken çok çalışma vardır.

Ca^{2+} sinyal mekanizmasını modellemeye yatkın kılan iki temel mekanizma vardır: İlk olarak, Ca^{2+} sinyalinin bir matematiksel model haline getirilebilecek basit bir kurgusu vardır, aynı zamanda sinyalin pek çok parametresi deneysel olarak tayin edilmiş durumdadır. Çoğu hücrede, IP_3R ve SERCA, Ca^{2+}'un depolardan salımı ve geri alımı için ana gövdeyi oluşturur. Bu yüzden, sadece bu iki eleman düşünülerek bir modelin temeli atılabilir. Bunların ardından Ca^{2+}'un hücreden dışarı atılması, hücre içi tampon proteinlerin sisteme etkisi gibi etkiler göz önüne alınabilir. Bazı varsayımlarla, hücre içi Ca^{2+} dinamikleri, matematiksel olarak bir türevsel denklem sistemi haline getirilebilir (Falcke, 2004).

Hücre içi Ca^{2+} sinyalinin modellenebilmesi için, içinde yer alan tüm elemanların davranışları hakkında bilgi sahibi olmak, ve bu davranışları matematiksel ilişkiler biçiminde açıklayabilmek gerekmektedir. Ca^{2+} sinyalinde görev alan elemanların özellikleri şu şekilde özetlenebilir:

ER: Ca^{2+} sinyalinde, hücre içi Ca^{2+} deposu görevi gören organeldir. ER Ca^{2+} konsantrasyonunun ($[Ca^{2+}]_{ER}$), 500 μM civarında olduğu, bu konsantrasyonun hücreden hücreye değişebildiği düşünülmektedir (Yu ve Hinkle, 2000; Mogami ve ark., 1998). ER'nin yapısı, sürekli şekil değiştiren tübüller şeklindedir. ER, bu yüzden dinamik bir yapıya sahiptir. ER'nin yapısı, Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. ER'nin dinamik yapısı. ER'nin yapısı, canlı HeLa hücrelerinde, ER'ye yönlendirilmiş yeşil floresans proteini (GFP) kullanılarak gösterilmektedir. Bu yapı sürekli değişmektedir (Demaurex ve Frieden, 2003).

$[Ca^{2+}]_{ER}$'yi ölçmek, $[Ca^{2+}]_i$ ölçümüne göre daha zordur. Bunun sebebi, ER'nin, sitoplazma içinde ayrı bir zarlı yapı oluşturması, ve Ca^{2+} indikatörlerini ER'ye yüklemenin zor olmasıdır. Bu güne dek iki farklı yöntemle $[Ca^{2+}]_{ER}$ ölçümü yapılmıştır. Bunlardan birisi, ER'deki yüksek Ca^{2+} derişiminin değişimini takip edebilecek *mag-fura* gibi düşük afiniteli Ca^{2+} indikatörlerini, patch clamp pipeti yardımı ile, veya fizyolojik sıcaklıklarda hücreye yükleyip bu indikatörlerin ER'ye lokalize olmasını beklemek, bir diğeri de Ca^{2+}'a bağlanınca luminesans veya fluoresans özellikleri değişen aquoerin veya cameleon proteinleri gibi proteinleri, ER yönlendirme sinyal sekansları yardımı ile, ER'deki Ca^{2+} derişimini ölçmek için kullanmaktır (Demaurex ve Frieden, 2003).

ER Ca^{2+} dinamikleri ve Ca^{2+} sinyaline katkısı üzerinde en önemli teorik problemlerden birisi, ER'nin labirentimsi yapısının, lokal Ca^{2+} derişim farklılıkları yaratıp yaratmayacağıdır, çünkü sürekli şekli değişen ve bazı yerlerde çok daralan tübüler yapı, Ca^{2+}'un organel içinde difüzyonunu sınırlayabilecek düzeydedir. Böyle bir fizyoloji, Ca^{2+} sinyalinin ortaya çıkışı ve sonlanışında etkili olabilir, çünkü bu durumda Ca^{2+} depolarının aslında önemli bir bölümü hala dolu iken, Ca^{2+} difüzyonu sınırlanacağından, depolardan Ca^{2+} çıkış hızı yavaşlayacaktır. Fakat bu konudaki önemli bir ayrıntı, ER'deki Ca^{2+}'un önemli bir bölümünün serbest olmadığı, başta *kalretikülin* olmak üzere, tampon proteinlere bağlı olduğudur. Bu konuda yapılan teorik çalışmalar, bu tampon proteinlerin ER'nin Ca^{2+} depolama kapasitasini artırmak dışında, $[Ca^{2+}]$'nun lokal olarak çevresine göre çok düşük ya da çok yüksek olmasını, yani lokal $[Ca^{2+}]$ gradientleri oluşmasını engellediğini, ER'nin tübüler yapısının Ca^{2+} sinyali üzerine etkisini azalttığını göstermiştir (Means ve ark. 2006).

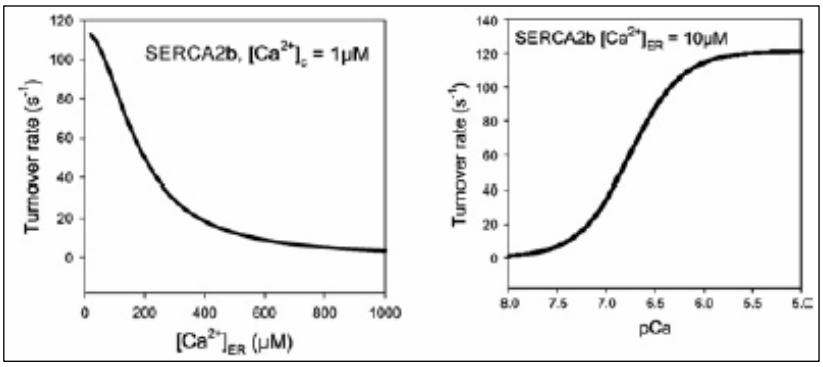
ER, Ca^{2+} sinyali modellenirken, bir kompartman olarak düşünülebilir. Bu kompartmandan, bir diğer kompartman olan sitoplazmaya Ca^{2+} geçişi, sitoplazma ve ER arasındaki $[Ca^{2+}]$ farkına ve kanal geçirgenliklerine bağlıdır. Ayrıca derişim farkı da Ca^{2+} sinyali boyunca sürekli değişeceği için, bu değişimin hızı ER ile sitoplazma hacimlerinin oranına bağlı olacaktır. ER'deki tampon proteinleri, ER'nin Ca^{2+} depolama kapasitesini artırdığı için konsantrasyon değişim hızı, bu durumdan da etkilenecektir.

Ca^{2+} Sızıntısı: Hücre içinde Ca^{2+}, ER'den sitoplazmaya doğru, IP_3R'ler ve RyR'ler tamamen bloke edilse bile, sürekli bir şekilde hareket etmektedir. Benzer şekilde, hücre dışı sıvıdan da sitoplazmaya, sızıntı şeklinde bir miktar Ca^{2+} girişi olduğu düşünülebilir. ER'den sitoplazmaya Ca^{2+} sızıntısı, SERCA'nın aktivitesinin *thapsigargin* ve *siklopiazonik asit (CPA)* gibi blokörler kullanılarak engellenmesi ile görünür olmaktadır. Bu da, SERCA'nın dinlenim durumunda aslında sürekli bir şekilde sızan Ca^{2+}'u depoya geri alabilecek şekilde çalıştığını göstermektedir. Ca^{2+} sızıntısı, hücre tipi ile değişmekle birlikte, bir dakikada ER'deki Ca^{2+} miktarını %22 civarında azaltabilmekte, pek çok hücrede de Ca^{2+}'un tamamen tükenmesi, birkaç dakikadan fazla sürmemektedir. ER'ye ribozomda sentezlenen proteinlerin geçişini

sağlayan *translokonların*, ve anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2'nin, Ca^{2+} sızıntısında rol oynadığı düşünülmektedir (Camello ve ark., 2002). Benzer bir Ca^{2+} sızıntısının hücre zarı üzerinden sitoplazmaya doğru da olduğu, ve bazal PMCA aktivitesinin de, bu sızıntıyı telafi edecek şekilde olduğu düşünülmektedir (Means ve ark., 2006).

SERCA: Sitoplazmadan ER'ye Ca^{2+} geri alımını sağlayan pompadır. ATP'yi ADP'ye yıkıp ortaya çıkan enerjiyi kullanarak Ca^{2+}'u konsantrasyon gradientine karşı ER'ye pompalar. Bazal aktivitesi, ER'den sitoplazmaya Ca^{2+} sızıntısını dengeleyecek şekilde düşünülebilir. Ca^{2+} sinyali süresince ise, çok daha hızlı bir şekilde Ca^{2+}'u depoya pompalamaya devam eder.

SERCA aktivitesi, hem sitoplazmik, hem de ER Ca^{2+} miktarından etkilenmektedir. Sitoplazmik $[Ca^{2+}]$ ile SERCA aktivitesi arasında sigmoidal bir ilişki bulunduğu, ayrıca SERCA aktivitesinin $[Ca^{2+}]_{ER}$'den de etkilendiği gösterilmiştir. Şekil 1.3'te SERCA aktivitesinin bu parametrelerle değişimi grafiğe dönüştürülmüştür.

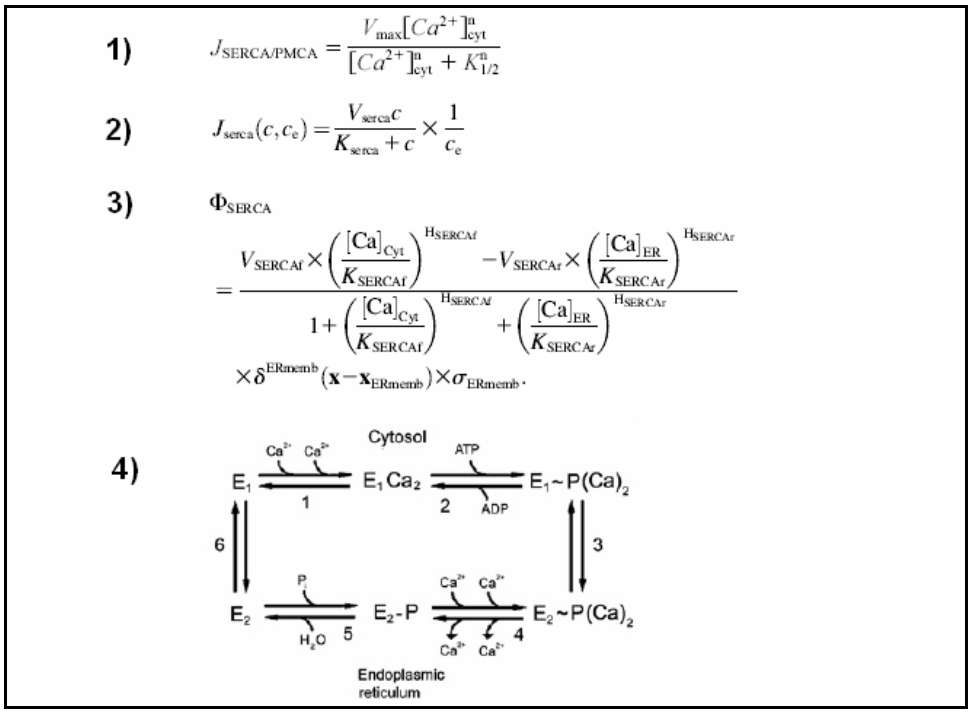


Şekil 1.3. SERCA aktivitesinin $[Ca^{2+}]_i$ ve $[Ca^{2+}]_{ER}$ ile değişimi. Solda ER Ca^{2+} derişimi arttıkça, SERCA aktivitesinin azaldığı, belli bir konsantrasyondan sonra aktivitenin durduğu gözlenmektedir. Sağda ise, sitoplazmik Ca^{2+} değişimi ile SERCA aktivitesinin ilişkisi gösterilmiştir. Grafik, bu özellikleri gösteren bir matematiksel modelin (Yano ve ark., 2006) farklı konsantrasyonlarda tahmin ettiği SERCA aktivitelerini göstermektedir.

SERCA'nın ER Ca^{2+}'undan etkilenmesinin sebebi, pompanın bir ileri, bir de geri modu olması, bu yüzden bir yandan ER'ye doğru Ca^{2+} pompalanırken, bir yandan da ER'den sitoplazmaya artan aktivite ile birlikte artan miktarda Ca^{2+} geçişine neden olmasıdır (Yano ve ark., 2004). Bu durumun bir diğer ifade ediliş biçimi de

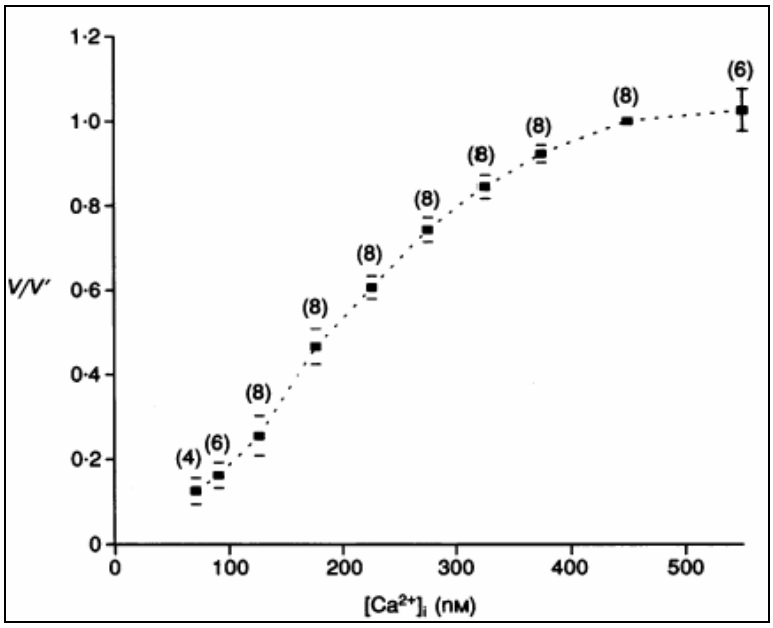
SERCA'nın aktivitesi ile ER'den sitoplazmaya Ca^{2+} sızıntısına katkıda bulunduğu, sızıntılı bir pompa özelliği taşıdığıdır. Bu sızıntının hızı, aynı zamanda ER Ca^{2+} miktarına da bağlıdır.

Hücre içi Ca^{2+} modellerinde SERCA modellenirken, bu güne dek farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yaklaşımların ilki, SERCA'nın $[Ca^{2+}]_i$ ile ilişkisini bir *Hill denklemi* ile açıklayıp, ER Ca^{2+}'unun etkisini bu denkleme bazı eklemeler yoluyla katmaktır (Sneyd ve ark., 2003; Means ve ark., 2006). Başka bir yaklaşım da, SERCA aktivitesinin hem ileri hem geri reaksiyonların olabildiği ve döngüsel bir şekilde kendisini tamamlayan bir şekilde şematize edilmesidir (Yano ve ark., 2004). Ayrıca, SERCA'yı Ca^{2+} tamponlama özelliğine sahip bir protein olarak kurgulayan, böylece Ca^{2+} sızıntısının aslında gerçekleşmediğini öne süren (Higgins ve ark., 2006), veya SERCA ile *kalretikulin* gibi ER proteinlerinin etkileştiğini varsayan modeller (Baker ve ark., 2002) de bulunmaktadır. Çeşitli SERCA modellerinden bazıları Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4. SERCA modelleri. 1) ER Ca^{2+}'nun etkisinin hesaba katılmadığı *Hill denklemi* şeklinde SERCA modeli, aynı zamanda PMCA için de kullanılmış. 2) $[Ca^{2+}]_{ER}$'nin etkisinin denkleme yansıtılması. 3) SERCA'nın ileri ve geri modunun olduğu durumda $[Ca^{2+}]_{ER}$'nin etkisinin denkleme farklı bir şekilde yansıtılması,. 4) İleri ve geri reaksiyonun mümkün olduğu termodinamik model.

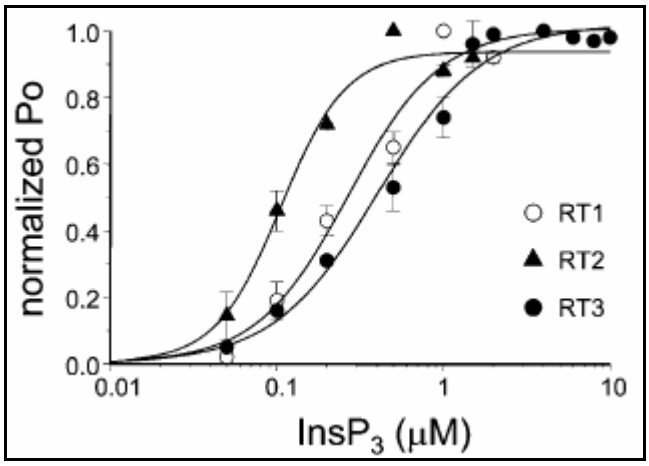
PMCA: Sitoplazmadan hücre dışına Ca^{2+} pompalayan bu pompa, genetik ve yapısal olarak SERCA'ya çok benzemektedir (Guerini ve ark., 2002). Bu pompanın aktivitesi, mM seviyelerinde La^{3+} varlığında engellenebilmektedir (Kwan ve ark., 1990). SERCA pompasının benzeri şekilde, $[Ca^{2+}]_i$'den sigmoidal şekilde etkilenmekte, ve Şekil 1.4'teki gibi aktivitesi *Hill denklemi* ile ifade edilebilmektedir. Şekil 1.5'te, PMCA aktivitesi ile ilgili deneysel bir çalışmanın sonucu olarak, $[Ca^{2+}]_i$ değişimi ile PMCA aktivitesinin maksimum PMCA aktivitesine göre değişimi gösterilmiştir.



Şekil 1.5. PMCA aktivitesinin ölçümü. İçinde Ca^{2+} indikatörü bulunan çok küçük bir damlacığa hapsedilen hücrede, simültane $[Ca^{2+}]_i$ ve damlacıktaki $[Ca^{2+}]$ ölçülerek, PMCA aktivitesi maksimum aktiviteye göre hesaplanmıştır (Camello ve ark., 1996).

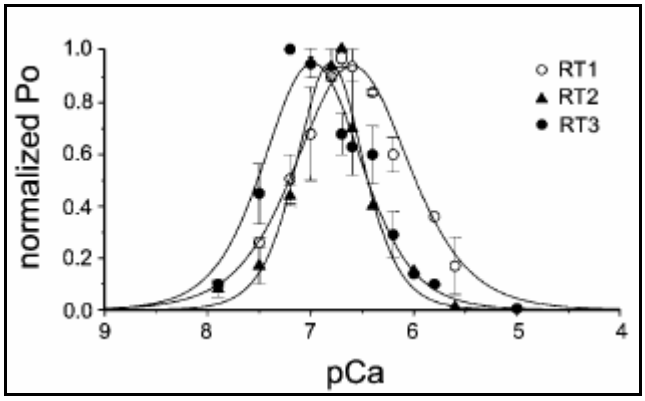
IP_3R: Ca^{2+} sinyalinin modellenmesindeki en kritik bileşen, IP_3R'dir. Bunun nedeni, IP_3R'nin, kompleks bir davranış biçimine sahip olmasıdır. Bu reseptör kanalın memelilerde üç alt tipi ve bazı splice variantları, homo veya heterotetramerik olarak bir araya gelerek fonksiyonel reseptörü oluştururlar (Monkawa ve ark., 1995). Her bir reseptör alttipinin kendine özgü bazı davranışları olsa da, ve heterotetramerik reseptörlerde bu özelliklerin birbirine eklenmesi reseptör regülasyonunda etkili olma ihtimali taşıyor olsa da (Patel ve ark., 1999), yine de bu alttiplerin hepsinin ortak özellikleri vardır, bu özellikler de reseptör davranışının modellenmesinde kullanılmaktadır.

IP_3R kanallarının açılma olasılığı (*Po*), [IP_3]'dan sigmoidal olarak etkilenmektedir. Üç alttipin de IP_3'ten etkilenme şekillerinin birbirlerine benzer olduğu gösterilmiştir. Şekil 1.6'da IP_3R alttiplerinin IP_3 ile etkileşiminin grafiği verilmiştir.



Şekil 1.6. IP_3R aktivitesinin [IP_3] ile değişimi. Her IP_3R izoformu için tek kanal *Po* farklı IP_3 konsantrasyonlarında hesaplanmış, elde edilen değerler maksimum *Po* değerine göre normalize edilmiştir. *Po*'nun [IP_3]'dan sigmoidal şekilde etkilendiği görülmektedir. pCa = 6.7 (Tu ve ark., 2005).

IP_3R kanallarının *Po*'nun Ca^{2+} ile etkileşimi ise, IP_3 ile olandan farklıdır. Ca^{2+} varlığı, *Po*'yu düşük konsantrasyonlarda olumlu yönde etkilerken, artan [Ca^{2+}], etkisini *Po*'da bir düşüş olarak göstermektedir. Bu etki, *çan şeklinde* bir etki olarak adlandırılmaktadır. IP_3R mekanizmasını kompleks hale getiren özelliklerden birisi, reseptörün depodan salınmasını sağladığı Ca^{2+}'un, reseptöre hem agonist, hem de antagonist olarak etki etmesidir. Bu etki, Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



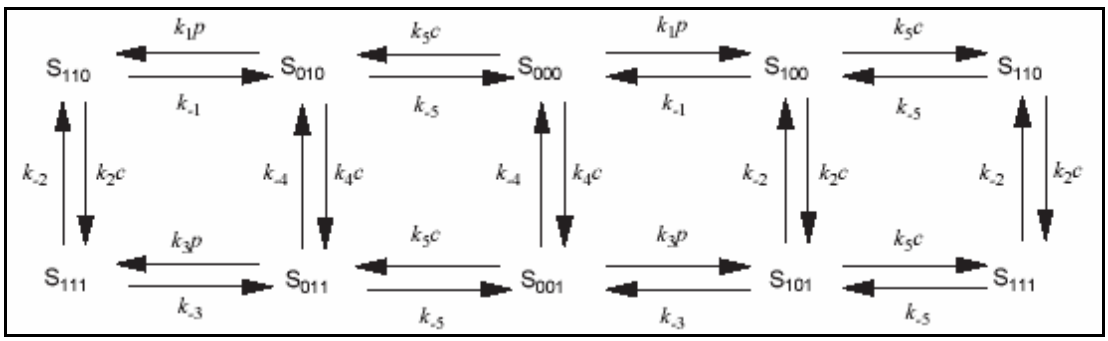
Şekil 1.7. IP_3R aktivitesinin [Ca^{2+}] ile değişimi. Her IP_3R izoformu için tek kanal *Po* farklı Ca^{2+} konsantrasyonlarında hesaplanmış, elde edilen değerler maksimum *Po* değerine göre

normalize edilmiştir. *Po*'nun [Ca^{2+}]'dan *çan şeklinde* etkilendiği görülmektedir. [IP_3] = 2 μM (Tu ve ark., 2005).

IP_3R'nin *kararlı durum (steady state)* davranışı hakkında günümüzde pek çok bulguya ulaşılmış olsa da, kinetik davranışını açıklamak için farklı özellikte pek çok IP_3R modeli geliştirilmiştir. Bu modeller kendi aralarında *deterministik* ve *stokastik* modeller olarak ikiye ayrılabilirler. *Deterministik modellerde* belli parametreler söz konusu olduğunda reseptörlerin *Po*'sunun kesin olarak bilineceği varsayılırken, *stokastik modeller*, parametrelerin etkisini göz ardı etmemekle birlikte, rastlantısal olayların da reseptörün *Po*'su üzerinde etkili olduğunu hesaba katar.

Bu güne dek ortaya konulmuş bellibaşlı IP_3R modelleri şu şekilde özetlenebilir:

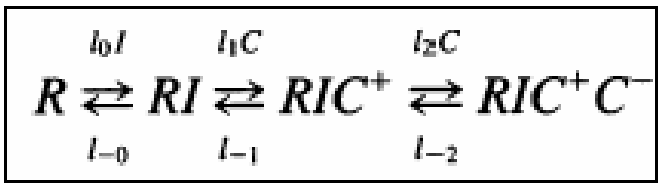
De Young-Keizer modeli: IP_3R'nin IP_3 ile aktive, Ca^{2+} ile de hem aktive hem inhibe olmasını, reseptörün IP_3 için bir, ve Ca^{2+} için biri aktivasyon biri inhibisyon sağlayan iki bağlanma bölgesi varsayarak açıklayan modeldir. Bu şekilde reseptörün *kararlı durum* datasını açıklayabilmekte, aynı zamanda kinetik olarak açılıp kapanmasını da taklit edebilmektedir (Sneyd ve Falcke, 2005). Kendisinden sonraki pek çok IP_3R modelini etkileyen bu model, Şekil 1.8'de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. De Young-Keizer modeli. Reseptörün IP_3 için bir, Ca^{2+} için iki bağlanma bölgesi bulunmakta, reseptörün 8 farklı *fazı* bulunmaktadır. Bu *fazlardan* sadece S_{110} olarak gösterilen, IP_3 ve aktivatör Ca^{2+} bağlı *faz* Ca^{2+} geçirgenliğine sahiptir. IP_3 "p" ile, Ca^{2+} "c" ile gösterilmiştir. Bu model tek bir altünite için olduğundan ve reseptör dört altüniteden oluştuğundan, *Po*, S_{110} *fazının* tüm *fazlara* oranının 4'üncü kuvvetidir (Sneyd ve Falcke, 2005).

Othmer-Tang modeli: De Young-Keizer modelinin, bazı bağlanmalar arasında yüksek *kooperativiteler* varsayılarak geliştirilmiş halidir. Model, reseptöre IP_3,

aktivatör Ca^{2+} ve inhibitör Ca^{2+}'un sıralı bir şekilde bağlandığını varsayar (Othmer ve ark., 1996). Bu model Şekil 1.9'da gösterilmiştir.



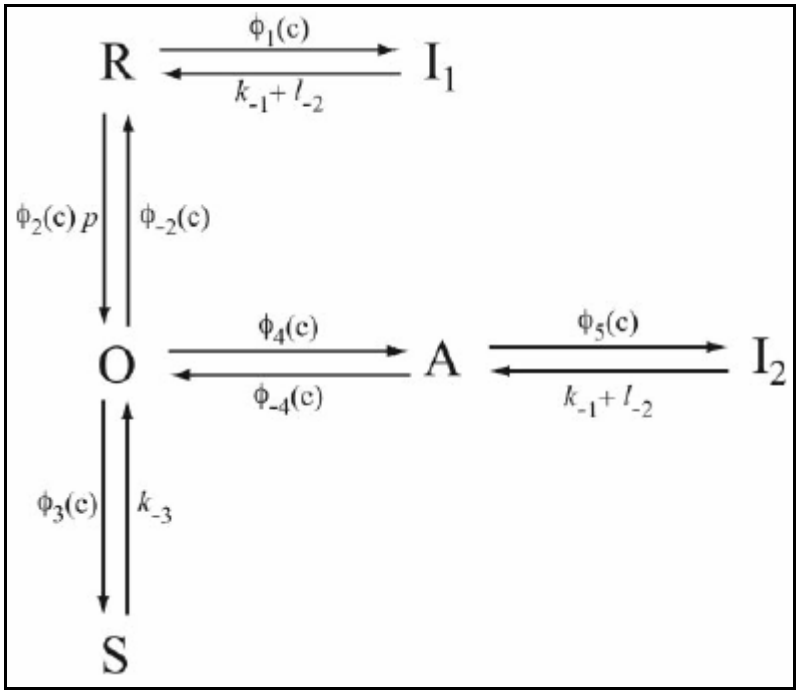
Şekil 1.9. Othmer-Tang modeli. Modelde I IP_3, C Ca^{2+} anlamına gelmektedir. R serbest reseptörü, RI IP_3 bağlı reseptörü, RIC^+ aktif reseptörü, RIC^+C^- inhibe reseptörü temsil etmektedir. Model, bu hali ile, De Young-Keizer modeline denktir (Othmer ve ark., 1996).

Bu reseptör modeli, hücre içi Ca^{2+} mekanizmasının modellenmesinde oldukça işlevselidir. Hem *kararlı durum* datasını, hem de hücre içi Ca^{2+} sinyalinin dinamik özelliklerini iyi derecede taklit etmekte, SERCA, PMCA gibi diğer elemanlarla birlikte kullanıldığı zaman, tüm hücre Ca^{2+} simülasyonlarında kullanılabilmektedir. Modeldeki bir diğer önemli özellik, *kuantal Ca^{2+} salımı* özelliği de göstermesidir.

Bu model, sahip olduğu pek çok olumlu özellikle birlikte, açıklamakta yetersiz kaldığı önemli noktalar vardır. Bunlardan en önemlisi, modelin inhibisyon özelliğini $[Ca^{2+}]_i$ arttığı zaman göstermesidir. Oysa, hücrelerden izole edilen ER veziküllerinde yapılan deneylerde, dış ortam $[Ca^{2+}]$ seviyesi EGTA gibi tamponlarla sabit tutulsa bile, reseptör aktivitesinin geçici olduğu, reseptörün inhibe duruma geçtiği gözlenmiştir (Dufour ve ark., 1997). Bu da, reseptörün modellenmesinde farklı yaklaşımların ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu yaklaşımlardan ilki reseptörün IP_3 ile adapte olması, ikincisi ise inaktivasyon için, ER'den çıkan Ca^{2+}'un kanal ağzındaki konsantrasyonunun etkili olmasıdır.

Sneyd-Dufour modeli: Veziküllerdeki IP_3R'lerin davranışını açıklamak için ortaya konulmuş olan bir modeldir. Reseptörlerin IP_3 varlığında adaptasyon gösterdiğini varsayar. Bunun dışında, reseptörün farklı *fazlar* arasında hız sabitlerinin, aslında sabit olmayıp, ligand konsantrasyonları ile değiştiği geçişler tanımlar (Sneyd ve Dufour, 2002). Bu model, IP_3 varlığında adaptasyon gösterdiği için, vezikül datasını açıklamak için kullanılabilir. Ayrıca, aynı model, hücre içi Ca^{2+} sinyalini

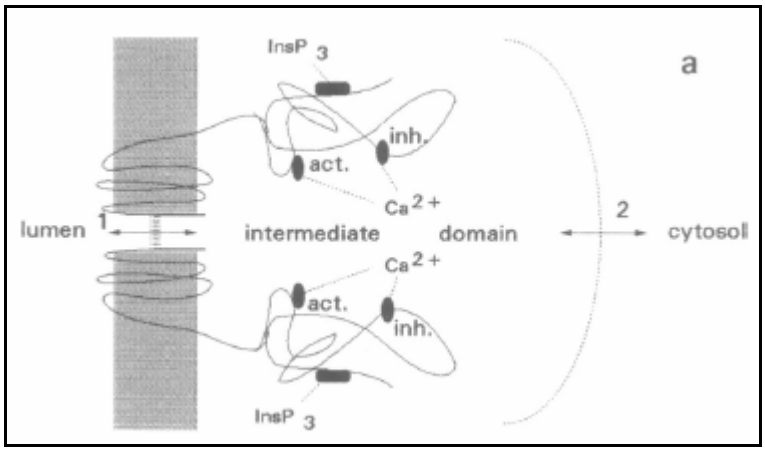
modellemede de kullanılmıştır (Sneyd ve ark., 2003). Model, Şekil 1.10'da gösterilmiştir.



Şekil 1.10. Sneyd-Dufour modeli. Önceki Ca^{2+} modellerine göre farklı olduğu iki nokta vardır: Birincisi, IP_3 ile inhibe olan S *fazına* sahip olması, ikincisi de hız sabitlerinin Ca^{2+} ile değişmesidir. Bunun dışında model, A *fazında* Ca^{2+} geçirgenliğine sahiptir (Sneyd ve Dufour, 2002).

Bu model, vezikül datasını açıklamakla birlikte, çalıştığı parametrelerle, kuantal yanıt verme özelliğine sahip olup olmadığı gösterilmemiştir.

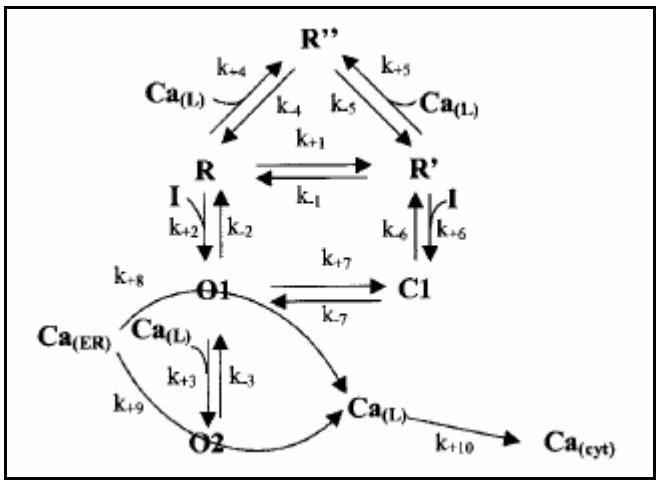
Swillens modeli: IP_3R'nin veziküllerde de inhibe olmasını açıklayan bir diğer yaklaşım olan, IP_3R ağzındaki Ca^{2+} ile inhibe olduğu fikri üzerine geliştirilmiş bir modeldir. Model, De Young-Keizer modeli üzerine kurulmuştur. Ca^{2+}'un reseptör kanalı ağzındaki birikimi, o bölgede ayrı bir kompartman varmış gibi gösterilmiştir. Bu sayede model hem vezikül datasını, hem de *kuantal* Ca^{2+} *salımını* açıklayabilmektedir (Swillens ve ark., 1994).



Şekil 1.11. Swillens modeli. Reseptör, De Young-Keizer modeli ile aynı mekanizma ile çalışmakla birlikte, Ca^{2+} aktivasyonu ve inhibisyonu, kanal ağzındaki Ca^{2+} ile olmaktadır (Swillens ve ark., 1994).

Swillens modeli bu şekli ile Ca^{2+} sinyalinin açıklanmasında oldukça işlevseldir. Bununla birlikte, modelin çalışması, bazı parametrelerin bazı değerleri almasına aşırı derecede bağımlıdır. Bu durum, modelin canlılık gibi kompleks bir sisteme uyacak esnekliğe sahip olmadığını göstermektedir. Bu da modelin önemli bir eksikliğidir.

Dawson-Lea-Irvine modeli: Hem adaptasyonu, hem de kanal ağzındaki Ca^{2+} etkisini hesaba katan bir modeldir. Bu sayede hem *kararlı durum* IP_3R datasıyla, hem vezikül datasıyla uyumludur, aynı zamanda *kuantal* Ca^{2+} *salımı* özelliği de göstermektedir (Dawson ve ark., 2003). Bu model, Şekil 1.12'de gösterilmiştir.



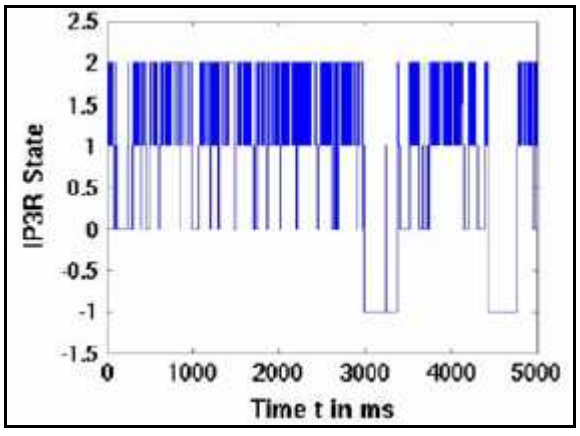
Şekil 1.12. Dawson-Lea-Irvine modeli. Bu modelde serbest reseptöre Ca^{2+} bağlandığı zaman reseptör iki ayrı *faza* geçebilmektedir. Bu *fazlardan* birisi IP_3 ile etkileşime girdiğinde reseptör açık hale gelmekte, ikincisinde ise inhibe hale gelmektedir. Ayrıca bu iki *faz*

arasında da geçiş bulunmaktadır. Açık *fazda* ikinci bir Ca^{2+} iyonu reseptöre bağlandığında, reseptörün geçirgenliği artmaktadır, yani iki açık *faz* bulunmaktadır. Modelin bir diğer özelliği, reseptörün sitoplazmik Ca^{2+}'dan değil, Swillens modeli gibi kanal ağzındaki Ca^{2+} konsantrasyonundan etkilenmesidir (Dawson ve ark., 2003).

Bu modelin de zayıf tarafları, reseptöre, deneysel olarak gözlenemeyen özellikler yüklenmiş olması, ve hücre içinde denenmemiş olması, Ca^{2+} sinyalinde görev alan elemanlarla etkileşiminin incelenmemiş olmasıdır.

Stokastik modeller: Her ne kadar IP_3R'lerinin davranışları çeşitli parametrelerin etkisi altında ve çok sayıda reseptör varlığında tahmin edilebiliyor olsa da, tek tek reseptörlerin açılıp kapanma olaylarında, rastlantısal etkiler belirleyici hale gelmektedir. Bu da *stokastik* IP_3R modellerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

Stokastik modellerin *deterministik* modellerden temel farkı, *fazlar* arası geçişte olasılıksal etkilerin olduğunu hesaplamanın içine katmalarıdır. Bu bağlamda, şimdiye kadar geliştirilen tüm *deterministik* modeller, *stokastik* hale getirilebilir. Model, kurulurken *deterministik* olarak kurulur, fakat bu modelle simülasyon yapılırken, rastlantısal parametrelerin, reseptörlerin *faz* değiştirmesi olaylarında etkili olması sağlanır (Sneyd ve Falcke, 2005). Şekil 1.13'de, *stokastik* bir simülasyonda, reseptörlerin *faz* değişimleri gösterilmiştir.



Şekil 1.13. *Stokastik* IP_3R simülasyonu. Şekilde bir IP_3R'nün, Sneyd-Dufour modeli benzeri altyapısı olan *stokastik* bir modelle gösterilip, bu reseptörün 2 μM IP_3 varlığında geçirdiği *faz* değişimleri gösterilmektedir (Means ve ark., 2006).

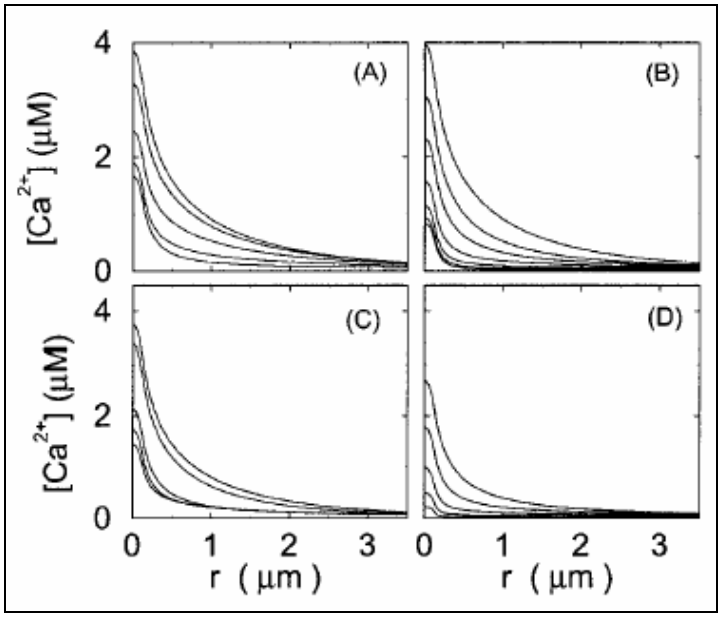
IP_3R'lerin önemli bir diğer özelliği, hücre içinde kümeler halinde bulunmasıdır (Mak ve ark., 2000). Bu kümelerdeki reseptörlerden herhangi birinin rastlantısal parametrelerin de etkisi altında aktivasyonu, büyük ihtimalle, diğer reseptör kanallarının da aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu da, Ca^{2+} salımının rastlantısal doğası için önemli bir olgudur, ve Ca^{2+} salımının *stokastik* modellenmesinin en ön plana çıkan özelliğidir. Bunun sebebi, eğer IP_3R'ler bağımsız olarak düşünülürse, tek bir reseptörün davranışı *stokastik* olsa bile, çok sayıda reseptörün davranışının kaçınılmaz olarak *deterministik* bir şekilde ortalama bir davranışa evrilecek olmasıdır. Oysa reseptörlerin kümeler halinde bulunduğu ve bir reseptörden çıkan Ca^{2+}'un yanıbaşındaki bir reseptörü etkilediği durumlarda, rastlantısal olaylar sistemde *deterministik* modellemeyle hesaplanamayacak dalgalanmalara, sapmalara yol açabilir. Yine de global Ca^{2+} olaylarında bu *stokastik* özelliğin ne kadar belirleyici olduğu tartışmalıdır.

IP_3R modellerinin bütününe dair en önemli eksiklik, hem *kararlı durum*, hem vezikül datasını, hem dinamik davranışı hem de *kuantal Ca^{2+} salımını*, hücre içinde bütünüyle açıklayan bir modelin henüz ortaya konulamamış olmasıdır. Böyle bir model, IP_3R'lerin fizyolojik öneminin tam olararak anlaşılmasında çok faydalı olacaktır (Sneyd ve Falcke, 2005).

Hareketli ve Sabit Ca^{2+} Tamponları: Hücre içindeki Ca^{2+}'un %99'u, hareketli veya sabit tampon proteinlere bağlıdır (Falcke, 2004). Bu proteinlerin ER'de olanları, ER'nin Ca^{2+} depolama kapasitesini artırmakta, aynı zamanda ER'nin tübüler yapısı yüzünden difüzyonun uzamsal sınırlanmasını engellemektedirler (Means ve ark., 2006). Sitoplazmada da tampon proteinler, Ca^{2+} bağlamakta, IP_3R'den çıkan Ca^{2+}'un uzamsal ve zamansal özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca Ca^{2+} indikatörleri de, hareketli Ca^{2+} tamponu gibi davranıp Ca^{2+}'un difüzyonunu etkilemektedir (Dargan ve Parker, 2003). Mitokondri de Ca^{2+} alımı yapma özelliğine sahip bir organeldir, ve davranışı Ca^{2+} tampon proteinlerini andırmaktadır. Mitokondri içi [Ca^{2+}], sitoplazmik Ca^{2+} değişimlerini takip etmekte, ve Ca^{2+} tepe değerlerini düşürmektedir (Falcke, 2004). Bu yüzden, aslında Ca^{2+} alım ve salım mekanizmaları kompleks olsa da,

mitokondri, Ca^{2+} sinyali modellemelerinde, tampon proteini gibi düşününülebilir (Means ve ark., 2006).

Tampon proteinleri ile ile ilgili yapılan teorik çalışmalar, kanal ağzı Ca^{2+} konsantrasyonu üzerinde, özellikle hareketli tampon proteinlerin belirleyici etkisi olduğunu göstermiştir. Bu etki, tampon proteinin Kd'si, miktarı, difüzyon hızı ve Ca^{2+}'a bağlanma ileri hız sabiti ile değişmektedir (Falcke, 2003). Tampon proteini parametrelerinin reseptör kanalı ağzı Ca^{2+} profiline yaptığı etki, Şekil 1.14'te gösterilmiştir.



Şekil 1.14. Tampon proteini parametrelerinin reseptör kanalı ağzı Ca^{2+} profiline etkisi. Aşağıdan yukarıya: A) Artan Kd, B) Azalan mobilite, C) Azalan ileri hız sabiti, D) Azalan konsantrasyon (Falcke, 2003).

Tampon proteinlerin hem Ca^{2+} depolama kapasitesini artırma özellikleri, hem de Ca^{2+} difüzyonuna etkileri, Ca^{2+} sinyali modellenirken göz önüne alınması gereken faktörlerdir.

1.3 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada hedeflenen, Ca^{2+} sinyalinde yer alan bütün elemanların hücre içinde bir arada nasıl çalıştığını açıklamaktır. Bu araştırma bu yüzden iki parçadan

oluşmaktadır, bu parçalardan ilki, deneysel olarak Ca^{2+} sinyali ile ilgili, bu sinyalde görev alan elemanların davranışlarını, diğer parametrelerden nasıl etkilendiklerini gösterecek data toplayıp, bu datalardan olgusal bir repertuvar oluşturmak; bu parçanın bütünleyeni olan ikinci parça ise, elde edilen datayı, matematiksel bir model çerçevesinde birleştirip, Ca^{2+} sinyali konusunda bir öngörü sağlayacak bir hücre içi Ca^{2+} modeli kurmaktır.

Hücre içi Ca^{2+} sinyali ile ilgili literatürde sayısız data mevcuttur. Bununla birlikte, bu data çok büyük oranda sistemin sadece bir parçasını açıklamak için toplanmış, hücre içi Ca^{2+} sinyaline dair bütünsel bir yaklaşım oluşturulmamıştır. Bu çalışmada ise, sistemde yer alan bütün elemanların, çok farklı koşullarda ne gibi davranışlar gösterdiği incelenmiş, bu sayede bir matematiksel modellemede rahatlıkla kullanılabilecek olgusal bir derleme oluşturulmaya çalışılmıştır. Ca^{2+} sinyalinde görev alan ve gözlenebilen elemanlardan Ca^{2+}, IP_3, SERCA ve PMCA davranışlarına birlikte bakılarak, bu elemanların birbirlerini ve Ca^{2+} sinyalini ne derece etkilediklerine dair deneysel bulgular oluşturulmaya çalışılmıştır.

Modelleme kısmı ise, çalışma için ayrı bir önem taşımaktadır. Çünkü amaçlardan birisi de, Ca^{2+} sinyali boyunca gözlenen gelişmeleri, matematiksel bir dille ifade edebilmek, bu sayede Ca^{2+} sinyali üzerinde teorik bir hakimiyet oluşturmak ve henüz yapılmamış deneylerin sonucunu da bu hakimiyet sayesinde öngörebilmektir. Bu süreçte hedeflenen, gerçeği bütün ayrıntıları ile olduğu gibi yansıtan bir model oluşturmaya çalışmaktansa, Ca^{2+} sinyal mekanizmasındaki temel ve genel olguları nedenleri ile birlikte açıklayacak minimal matematiksel bir model ortaya koyabilmektir. Çünkü model oluştururken amaç gerçeği taklit etmek değil, olgular arası kilit öneme sahip ilişkileri açığa çıkarmaktır, aksini yapıp gerçeği bire bir taklit eden matematiksel modeller de vardır (Means ve ark., 2006) ve bu modeller bir matematiksel modelde olması beklenen açıklayıcılıktan yoksundur. Literatürde bu niteliğe sahip bir matematiksel modelin henüz ortaya konulmamış olması, bu çalışmayı alanında anlamlı ve değerli kılmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Deneysel Çalışma

2.1.1 Kültür Hücrelerinin Büyütülmesi

Bu çalışmada HEK-293 ve önceden M_3 muskarinik reseptörü kalıcı olarak eksprese ettirilen LTK-8 kültür hücreleri kullanıldı. Kullanılan kültür hücreleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan sağlandı. Hücreler %10 fetal calf serum (FCS) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (GIBCO BRL Life Tech. NY, ABD) solüsyonu içinde, 37°C'de, uygun pH için %5 CO_2 içeren 75 cm^2'lik kültür flaskları içinde büyütüldüler. Hücreler yaklaşık % 100 konfluense geldikten sonra PBS (phosphate buffered saline)-EDTA içinde yaklaşık 5 dk. 37°C de bekletildikten sonra mekanik etki yardımı ile kaldırılıp, önceden hazırlanmış tabanlarına 2.4 cm çaplı cam lamel konulan 6'lık flasklara eşit miktarda dağıtıldı. Hücreler bu flasklarda aynı etüv koşullarında lamelin üzerine yapışarak büyütülmeye devam edildi, yeterli konfluense geldikten sonra deneye alındı. Deneyden önce hücreler, içerisinde büyütüldükleri 6'lık flaskta iken içinde bulundukları medium, içeriği 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Hepes ve 1 mM $6H_2OMgCl_2$ ve 1,5 mM $CaCl_2$ olan solüsyon ile (Banyo solüsyonu) bir kez yıkandılar ve floresans boya ile yüklenmeye hazır hale getirildiler.

2.1.2 Geçici Transfeksiyon

Hücreler 6'lık flaskta, %60-80 konfluenste iken, Ca-PO_4 yöntemi ile yapıldı. İki eppendorftan birine 240 μM $CaCl_2$ ve kuyu başına 4 μg plazmid, ötekisine ise 50 mM HEPES, 280 mM NaCl ve 1,5 mM Na_2HPO_4 (2 x HBS solüsyonu), iki eppendorf eşit hacimde olacak şekilde kondu. HBS solüsyonu sürekli bir biçimde yavaş devirde karıştırılırken, $CaCl_2$-plazmid solüsyonu damla damla HBS solüsyonunun üzerine eklendi. $CaPO_4$ kristallerinin oluşması için, karışım 30 dakika

37ºC de bekletildikten sonra, kuyulardaki hücrelerin üzerine eklendi. Hücreler, transfeksiyondan iki gün sonra deneye alındı.

2.1.3 Hücrelerin Fluo-3 Asetoksimetil Ester ile Yüklenmesi

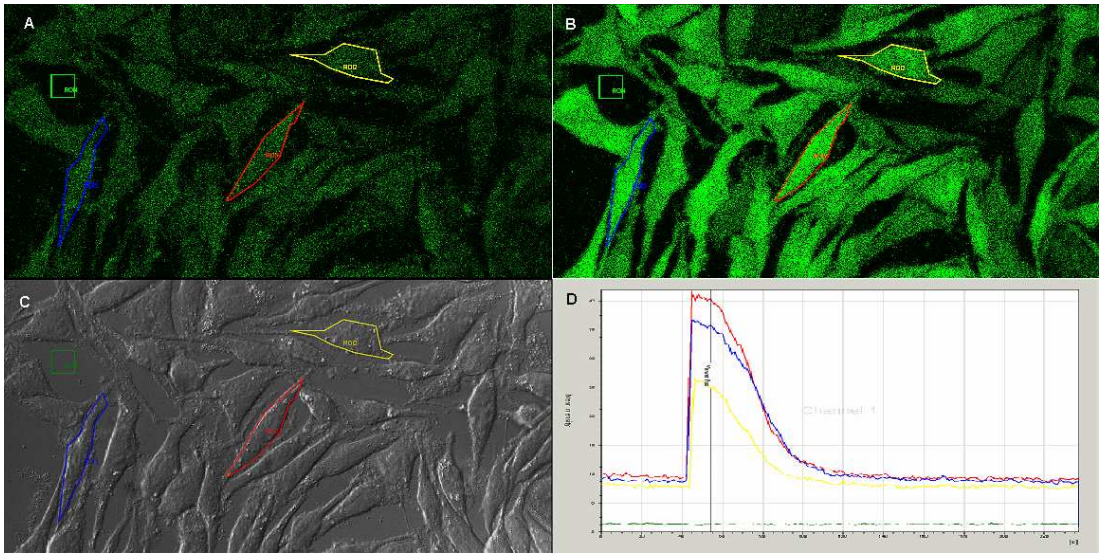
Hücreler her cam lamel için 2 µM Fluo-3 asetoksimetil ester (Fluo-3 AM) ve 1 µl pluoronic acid (%10) içeren 1 ml banyo solüsyonunda 24ºC'de 60-75 dk. bekletilerek yüklendiler. İnkübasyonun ardından geri plan (background) floresansını en aza indirebilmek için hücreler yine aynı solüsyon ile iki defa yıkanıp, ester formundaki boyanın tam metabolize olmasını sağlamak amacı ile 15 dk. daha oda sıcaklığında inkübe edildi.

2.1.4 Hücre İçi Ca^{2+} Derişiminin Ölçümü ve Data Analizi

Bu çalışmada yapılan deneylerde hücre içi Ca^{2+} derişimi, fluo-3 Ca^{2+} indikatörü kullanılarak, Leika TCS-SP5 konfokal mikroskop ile ölçüldü. İndikatörle önceden yüklenmiş olan hücrelerin üzerinde yetiştiği yuvarlak lameller, Sykes-Moore haznesi içine yerleştirilip, banyo solüsyonu ile iki kez yıkandıktan sonra mikroskoba yerleştirildi. İlk önce hücrelerin bulunduğu yüzeye, mikroskobun DIC (Differential Interference Contrast) özelliği ile, 60 X su immersiyon lensi kullanılarak odaklanıldı. Odak düzlemine, önceden %20 güçle açılmış argon lazer kaynağı ve hücrelerin yüklenme durumuna göre %2-12 arasında eksitasyon intensitesi kullanılarak, Ca^{2+} bağlı fluo-3'ü uyaran 488 nm dalgaboyundaki eksitasyon ışığı, lazer tarama yöntemi ile 400 Hz tarama frekansıyla örneğe gönderildi. 505-595 nm dalgaboyu aralığındaki emisyon ışığı ölçüm için toplandı. Eksitasyon ışığının örneğe ulaşıp, aynı yoldan geri dönen emisyon ışığının detektöre doğru yansıtılması için, 500 nm'den kısa dalgaboyunda ışığı geçirip, geri kalanı yansıtan RSP500 dikroik ayna kullanıldı. Hücre içindeki geniş bir derinlikten gelen emisyonu toplayabilmek için, *pinhole* açıklığı 5 airy birime getirildi. Bu şekilde, hücrelere yapılan uygulamalar ile değişen

$[Ca^{2+}]_i$, fluoresans yoğunluğundaki değişim olarak detektör tarafından deney boyunca bilgisayara gönderilip kaydedildi ve ekranda gözlendi.

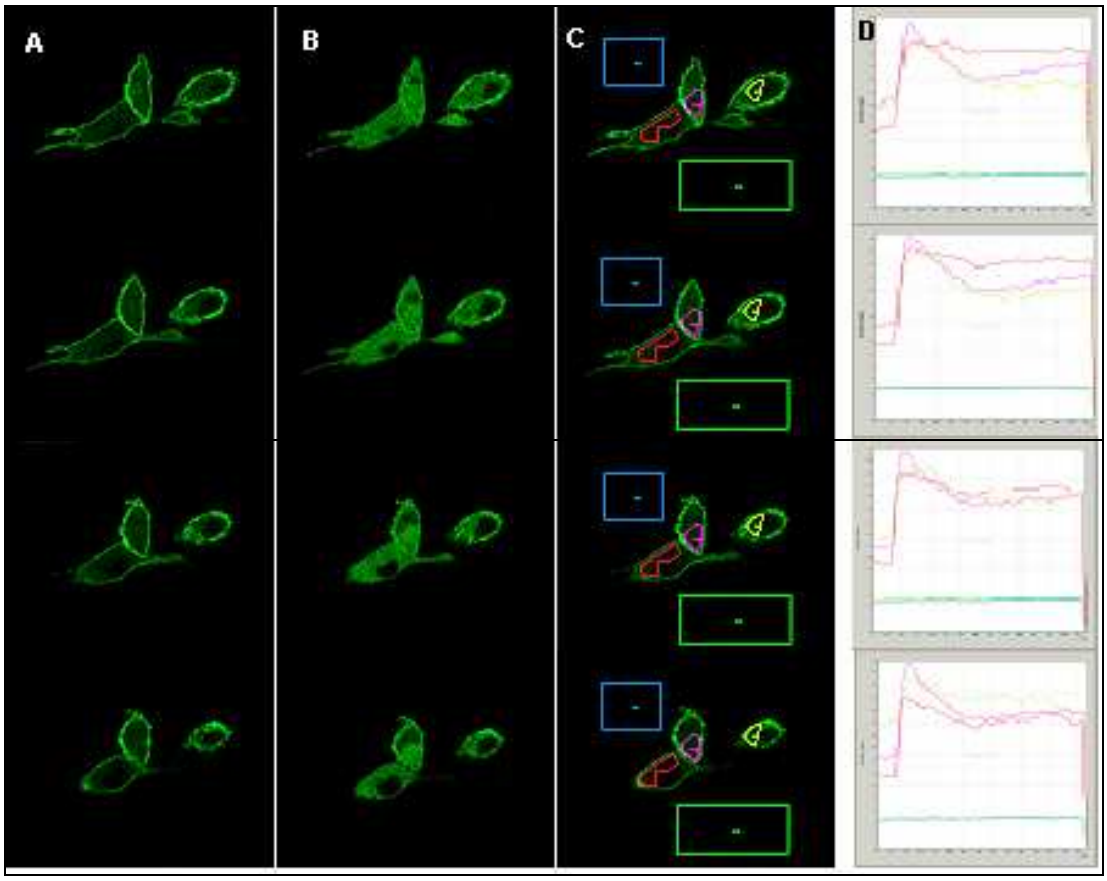
Deney sonunda veri analizi için LEICA'nın orijinal yazılımı yardımı ile, başlangıçtaki fluoresans kullanılarak, her hücrenin sınırı (Region of Interest, ROI) belirlendi. Deney boyunca her ROI için piksel başına ortalama intensite, program tarafından hesaplandı. Bu belirlemede daha kesin olabilmek için, hücrelerin DIC mikroskop ile alınan görüntülerinden de faydalanıldı. Ayrıca, background floresansı da, birkaç farklı bölgeden alınarak ölçüldü (Şekil 2.1) Fluo-3 ölçümünde intensite, hücre içindeki fluo-3 konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu için, hücrelerdeki farklı yüklenmenin etkisini ortadan kaldırabilmek amacıyla, tüm değerlerden background fluoresansı çıkartıldıktan sonra, tüm intensite değerleri, kendi bazal seviyelerine bölündü ve datalar bu normalizasyon kullanılarak değerlendirildi.



Şekil 2.1. Hücre içi Ca^{2+} derişiminin ölçülmesi. A) Hücrelerin sınırları, uyarı öncesi bazal floresans kullanılarak belirlendi. Bazal floresans dinlenim durumundaki sitoplazmik Ca^{2+} düşük olduğu için azdır. B) Hücrelerde sitoplazmik Ca^{2+} arttığı zaman, fluo-3 boyasının fluoresansı artar. Tüm deney boyunca bu şekilde ardışık resimler alındı. C) Hücrelerin sınırları, maximum floresans görüntülerinden ve DIC mikroskop görüntüsünden faydalanılarak doğrulandı. D) Her hücredeki ortalama intensitenin zamana bağlı olarak aldığı değer ölçüldü.

2.1.5 IP_3 Derişiminin Ölçülmesi ve Data Analizi

IP_3 derişiminin ölçümü, $PLC\delta_1$ de bulunan ve IP_3'e bağlanan Plekstrin Homoloji (PH) bölgesi eklenmiş GFP kullanılarak ($GFP\text{-}PH_{PLC\delta 1C}$) yapıldı. Bu protein, hücrelere transfekte edildikten iki gün sonra, hücreler deneye alındılar. Deneyler boyunca konfokal mikroskop kullanılarak IP_3 miktarı saptandı. Hücrelerden, z-ekseni boyunca en az 3 farklı kesit alınarak, bu kesitlerde 400 Hz frekansla lazer taraması yapıldı. *Pinhole* açıklığı, maksimum z-aksı çözünürlüğü sağlamak amacı ile, 1 airy birime (≈150 μm) getirildi. IP_3'a bağlanan $GFP\text{-}PH_{PLC\delta 1C}$'ı eksite etmek için argon lazerle 488 nm dalgaboyunda yapılan taramada, 505-595 nm dalgaboyları arasındaki emisyon ışığı PMT tarafından toplandı. Sitoplazmadaki IP_3 miktarındaki artışı tespit etmek için, kesitlerin sitoplazmik bölümlerinde ROI'ler çizildi. Bu ROI'lerdeki ortalama intensite artışı, her hücre için en geniş alana sahip ROI den alındı (Şekil 2.2). ROI'lerin analizi yapılırken, her zaman noktasındaki intensitenin baseline intensitesinden farkı, maksimum intensitenin baseline intensitesinden farkına bölündü. Bu şekilde, farklı hücrelerde, farklı zamanlarda ve farklı uyarılarla yapılan deneylerdeki IP_3 oluşumu, niteliksel bir şekilde karşılaştırılabilir hale geldi.



Şekil 2.2. **IP_3 ölçümleri. A)** Uyarılmamış hücrelerden z- ekseni boyunca eşit zaman aralıklarıyla kesitler alındı. Bu şekilde bir zaman noktasında alınan ardışık z- ekseni kesitleri görülmektedir. Bu hücrelerde GFP-$PH_{PLC\delta1C}$ ile oluşan floresansın hücre zarına sınırlı olduğu izlenmektedir. **B)** Agonist uygulanması sonrası hücrelere oluşan IP_3 artışı, bu kesitlerde hücre zarına sınırlı olan floresansın sitoplazmik bölgede de artması şeklinde gözlendi. **C)** Bu hücrelerde en geniş sitoplazmik alana uyacak şekilde, ancak hücre zarını ve çekirdeği dışlayacak şekilde ROI'ler çizildi ve ortalama floresans zaman boyunca ölçüldü. **D)** Bu ROI'lerden ölçülen ortalama ışık şiddetinin zamanla değişim grafiği görülmektedir. Her grafik farklı bir z- kesitinde her üç ROI deki zamanla oluşan floresan değişikliğini göstermektedir.

2.1.6 Hücrelere Uygulanan Kimyasallar ve Yapılan Manipülasyonlar

Bütün deneyler oda sıcaklığında, nominal Ca^{2+}'suz solüsyonda yapılmıştır. Ca^{2+}'suz solüsyon kullanılmasının sebebi, CCE mekanizmasının Ca^{2+} sinyaline etkisini ortadan kaldırmak iken, solüsyonun nominal Ca^{2+}'suz olması ise, Ca^{2+} çelatörlerinin La^{3+} gibi diğer maddelerle de etkileşmesi yüzündendir.

Hücrelerdeki GPKR yolağını harekete geçirmek için, farklı dozlarda ACh, M_3 reseptörlerini uyarmak için kullanılmıştır.

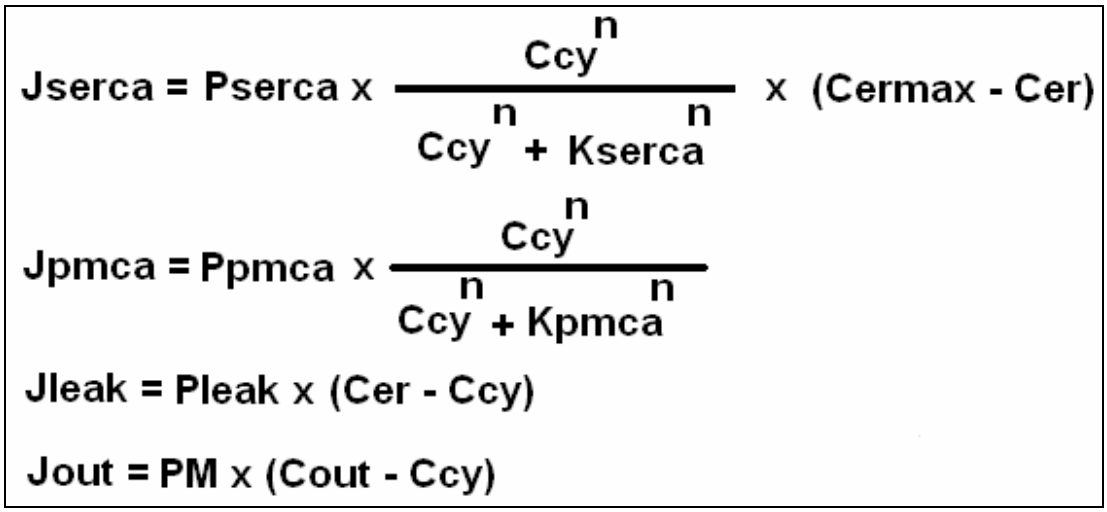
SERCA inhibisyonu için 20 μM CPA, PMCA inhibisyonu için ise 1 mM La^{3+} kullanılmıştır. Tüm kimyasallar, önceden banyo solüsyonu konmuş olan hazneye, ölçüm sırasında, mikropipet ile eklenmişlerdir.

2.2 Matematiksel Modelleme

Matematiksel modelleme yapılırken, hücre içinde yaşanan tüm değişimler, türevsel denklemler şeklinde ifade edilmiştir. Bu türevsel denklem sistemi, bileşiminde adi türevsel denklemlerin sayısal çözümünü yapan hazır programlar bulunan MATLAB yazılımı tarafından, belirlenen başlangıç koşullarına göre sayısal olarak çözdürülmüş, böylece sistemdeki zamana bağımlı değişkenlerin zamanla değişimleri, verili başlangıç değerleri ve parametrelerin etkisinde simüle edilmiştir.

Başlangıç olarak iki kompartmanlı basit bir sistem oluşturulmuş, bu iki kompartmandan birisi ER, diğeri ise sitoplazma olarak düşünülmüş, kompartmanların içindeki Ca^{2+} konsantrasyonları buna göre tayin edilmiştir. Bu kompartmanlar arası iki şekilde Ca^{2+} geçişi olabilir: ER'den sitoplazmaya Ca^{2+} sızıntısı, ve sitoplazmadan ER'ye SERCA tarafından Ca^{2+} geri alımı. Sitoplazmadan da hücre dışına sürekli PMCA ile Ca^{2+} atılırken, aynı anda hücre dışından sitoplazmaya doğru Ca^{2+} girişi yaşanmaktadır. Dinlenim durumunda, dış ortamda yaklaşık 1.5 mM Ca^{2+} varken, SERCA aktivitesi Ca^{2+} sızıntısına, PMCA aktivitesi de dış ortamdan Ca^{2+} girişine eşit olmalıdır. Bu, model için sınırlayıcı bir koşuldur.

SERCA-, PMCA-, ER- Ca^{2+} sızıntısı- ve membran Ca^{2+} sızıntısı-akı denklemleri, şekil 2.3 deki şekilde kurgulanmıştır:



Şekil 2.3. Ca^{2+} kompartmanları akıları. İki kompartmanlı hücre modelinde dinlenim durumu için, 4 ana Ca^{2+} akısından söz edilebilir: SERCA akısı (Jserca), PMCA akısı (Jpmca), ER Ca^{2+} sızıntısı (Jleak) ve hücre zarı Ca^{2+} sızıntısı (Jout). Bu akıların büyüklüğünü belirleyen parametreler ise şunlardır: Ccy, $[Ca^{2+}]_i$; Cer, $[Ca^{2+}]_{ER}$; Cout, dış ortam $[Ca^{2+}]$; Cermax, SERCA tarafından ER'ye Ca^{2+} geri alım üst sınırı; Kserca, SERCA Kd'si; Kpmca, PMCA Kd'si; n, *Hill katsayısı* (SERCA ve PMCA için farklı); Pserca, SERCA miktar katsayısı; Ppmca, PMCA miktar katsayısı; Pleak, ER sızıntı katsayısı; PM, hücre zarı sızıntı katsayısı.

Bu şekilde kurulan denklemlerde, **Jserca** değeri **Jleak** değerine, **Jpmca** değeri de **Jout** değerine eşit olmasını sağlayacak şekilde, literatürdeki bazı parametreler ve deneysel ölçümler de göz önüne alınarak, rastgele parametreler yaratılmıştır. Daha sonra bu yaratılan rastgele parametrelerle simülasyonlar yapılarak, bunların arasından, deney koşullarındaki gibi, dış ortam Ca^{2+}'u nominal Ca^{2+}'suz seviyeye getirildiği zaman, deney datasına kinetik olarak benzer şekilde, $[Ca^{2+}]_i$'de ve $[Ca^{2+}]_{ER}$'de çok belirgin düşüşler yaratmayan, aynı zamanda da, SERCA, PMCA ve ikisi birlikte bloke edildiği zamanki davranışa paralel kinetik davranışlara yol açan parametre kümelerine ulaşılmaya çalışılmıştır. Bu parametre kümeleri oluşturulurken göz önüne alınan başlangıç kriterleri, Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

SERCA ve PMCA inhibisyonları modellenirken, özellikle SERCA'nın maksimum inhibisyonunun zamanla geliştiği, ve her iki inhibisyonun da pompaları tamamen inhibe etmediği göz önüne alınmış, bu sebeple pompa parametrelerinin inhibe duruma geçmesi, zamana bağlı olarak simüle edilmiş, ve simülasyon sonuçlarından yola çıkılarak, inhibisyonun pompaları 1/15 aktiviteye düşürdüğü varsayılmıştır.

Parametre	Açıklama	Değer	Kaynak	Bağımlılıklar
Cer	ER Ca^{2+} konsantrasyonu	500 µM	Means ve ark., 2006	-
Ccy	Sitoplazma Ca^{2+} konsantrasyonu	0,1 µM	Means ve ark., 2006	-
Ver	ER hacmi	0-500 μm^3 (9 μm^3)	-	-
Vcy	Sitoplazma hacmi	0-500 μm^3 (450 μm^3)	-	-
Kserca	SERCA Kd	0-1 µM (0,11 µM)	-	-
Kpmca	PMCA Kd	0.1-0.35 µM (0,32 µM)	Camello ve ark., 1996	-
Pserca	SERCA miktar katsayısı	0-100 (0,05)	-	-
Ppmca	PMCA miktar katsayısı	0-100 (2)	-	-
nserca	SERCA *Hill* katsayısı	1-6 (4)	-	-
npmca	PMCA *Hill* katsayısı	1-4 (2)	Camello ve ark., 1996	-
Pleak	ER sızıntı katsayısı	rastgele (0,2)	-	Jleak = Jserca
PM	Hücre zarı sızıntı katsayısı	rastgele (5,9 x 10^{-6})	-	Jout = Jpmca
Cermax	SERCA tarafından ER Ca^{2+} geri alım üst sınırı	500-750 µM (651 µM)	Yano ve ark., 2004	-
Cout	Dış ortam Ca^{2+} konsantrasyonu	1 µM	-	Nominal Ca^{2+}'suz solüsyon

Çizelge 2.1. Parametre arama kriterleri. Çizelgede parametre aranırken kullanılan sınır değerler ve kullanılan parametreler gösterilmiştir. Parantez içinde simülasyonlarda kullanılan değerler gösterilmiştir.

Bu simülasyonlarda kullanılan türevsel denklemler şunlardır:

$$\frac{dCer}{dt} = -Jleak + Jserca$$

$$\frac{dCcy}{dt} = (Jleak - Jserca) \times \frac{Ver}{Vcy} - Jpmca + Jout$$

Şekil 2.4. Ca^{2+} değişimi denklemleri. Hacimler arası farkın derişim değişim hızına etkisi, iki kompartmanın hacimsel oranının ikinci denkleme katsayı olarak eklenmesi ile hesaba katılmıştır.

Ca^{2+}'un iki kompartman bünyesinde değişimi için gerekli parametreler bu şekilde belirlendikten sonra, reseptör kanalının sisteme etki etmesi için, reseptör kanalından geçen Ca^{2+} akısı denkleme şu şekilde eklenmiştir:

$$Jip3 = Pip3 \times Po \times (Cer - Ccy)$$

$$\frac{dCer}{dt} = -Jleak + Jserca - Jip3$$

$$\frac{dCcy}{dt} = (Jleak - Jserca + Jip3) \times \frac{Ver}{Vcy} - Jpmca + Jout$$

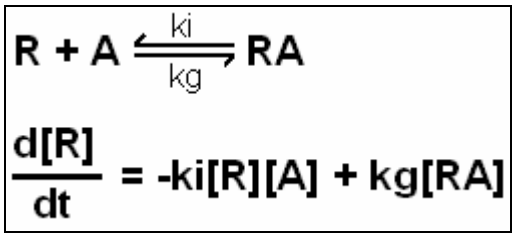
Şekil 2.5. Reseptör kanalı Ca^{2+} akısı ve Ca^{2+} değişim denklemleri. *Po*, ortam parametrelerine ve reseptör modeline göre değişmektedir. Ayrıca reseptör kanalından geçen Ca^{2+} akısı, reseptör miktar katsayısından (Pip3) ve iki kompartman arası derişim farkından da etkilenmektedir.

Bu denklemle yapılan simülasyonlarla, modelin deneysel data ile uyumlu davranıp davranmadığı incelenmiştir. Bu simülasyonlarda, Othmer-Tang reseptör modeli kullanılarak, ve bu reseptör modeli için literatürde ölçülmüş *kararlı durum* değerlerini göz önüne olmak kaydıyla, rastgele parametreler aranarak, bu matematiksel modelin, Ca^{2+} sinyalinde hangi derecede açıklayıcı olduğu incelenmiştir. Kullanılan modelde; açılma olasılığı, zamanın, $[Ca^{2+}]$ ve $[IP_3]$'nun bir fonksiyonudur. Aynı zamanda, Ca^{2+} geçirgenliğine sahip *fazın* miktarının, tüm fazlara oranının da bir fonksiyonudur. Bu yüzden Po'nun zamanla değişimi, geçirgen *fazın* zamanla değişimi ile orantılıdır.

$\boldsymbol{Po = f(t,[IP_3],[Ca^{2+}],S_{open}/S_{tot});}$ şeklinde gösterilebilir.

Bu çalışmada bu modelin seçilmesinin nedenleri, Othmer-Tang modelinin matematiksel işlem yönünden basitliği ve aynı parametrelerle farklı fizyolojik olayları açıklayabilme özelliği olmasıdır. Bununla birlikte, model orjinal parametreleri ile değil, hücre datasına daha iyi uyum sağlayan, arama sonucu bulunan bir parametre seti ile kullanılmıştır. Literatürden, sadece modelleme ile ilgili fikir alınmıştır.

IP_3R modelinde, *fazlar* arası geçişler de, $[IP_3]$ ve $[Ca^{2+}]$ etkileri ile, türevsel denklemler şeklinde ifade edilebilmektedir. Bu ifade oluşturulurken, fizikokimyadaki *kütle etkisi yasası* kullanılır. Bu yasa, şu şekilde gösterilebilir:



Sekil 2.6. ***Kütle etkisi yasası.*** Reseptörlere agonist bağlandığı zaman reseptör *faz* değiştirir. Bu bağlanmanın ileri ve geri hız sabitleri biliniyorsa, *faz* değişimi zamana göre takip edilebilir.

Modelleme çalışmasında, ayrıca, tampon proteinlerin de sisteme nasıl etkide bulunduğu incelenmiştir. Bu incelemede bir adet ER tampon proteini (*kalretikulin*), iki adet de sitoplazmik tampon proteini (*kalmodulin* ve mitokondri) varsayılmıştır. Tampon proteinlerin ER'de ve sitoplazmadaki konsantrasyonları, termodinamik ve kinetik parametreleri, literatürdeki değerler (Means ve ark., 2006) baz alınarak, aranıp, dataya uyumlu olan parametre setleri kullanılmıştır. Tampon proteinlerin de Ca^{2+} ile ilişkilerinde, *kütle etkisi yasası* modellemede kullanılmıştır. Tampon proteini parametre literatür değerleri, arama aralıkları ve kullanılan değerler Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

	Literatür Değeri	Arama Aralığı	Kullanılan Değer
[*kalretikulin*]	3,6 mM	1,8-5,4 mM	3,5106 mM
[*kalmodulin*]	5,9 µM	5-105 µM	32,427 µM
[*mitokondri*]	4,24 mM	2-6 mM	4,5638 mM
Kd kalret.	2 mM	1-3 mM	2,1893 mM
Kd kalmo.	2,6 µM	0,5-3,1 µM	1,5343 µM
Kd mito.	2,828 µM	1,5-5 µM	4,0343 µM
k+ kalret.	0,1/µM.s	0-10/µM.s	2,6011/µM.s
k+ kalmod.	160/µM.s	0-230/µM.s	12,054/µM.s
k+ mito.	0,0079/µM.s	0-0,009/µM.s	0,002863/µM.s

Çizelge 2.2. Hücre içi tampon proteinleri başlangıç değerleri ve parametreleri. Literatürden alınan değerler (Means ve ark., 2006), özellikle kinetik parametrelerin ölçümünde hata yapılabileceği göz önüne alınarak, aramaya sokulmuşlardır.

Tüm reseptör simülasyonlarında, kısa bir zaman için $[IP_3]$, sıfır değerinde tutulmuş, daha sonra, osilasyon yanıtları için 0.1 µM, diğer yanıtlar için 1 µM seviyesine getirilmiştir. Deneylerde agonist uyarısı sürdüğü sürece $[IP_3]$'nun değişmediğine dair bulgular olduğu için, simülasyonlarda $[IP_3]$ değiştirilmemiştir.

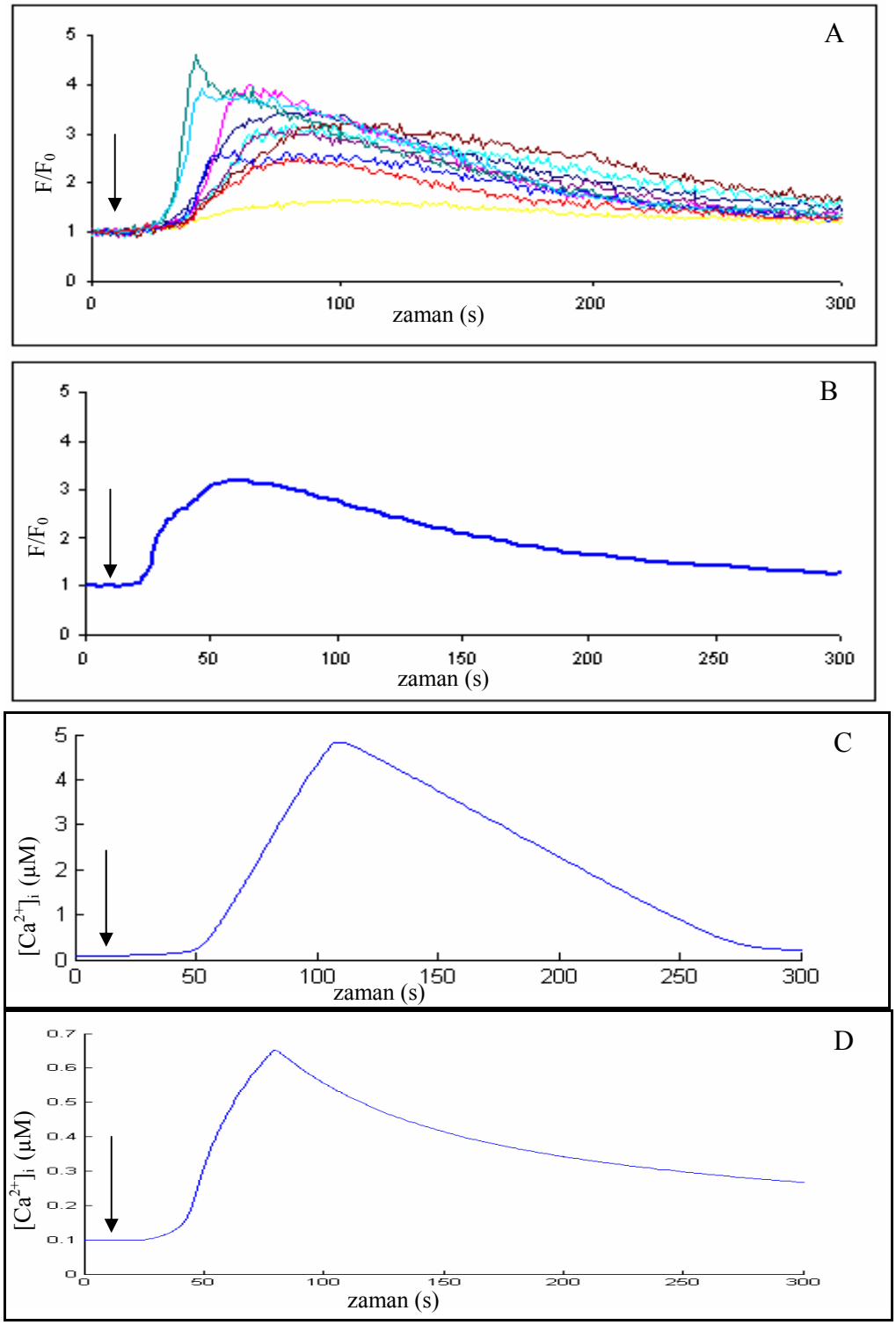
3. BULGULAR

3.1 Ca^{2+} Pompalarının Ca^{2+} sinyaline etkileri

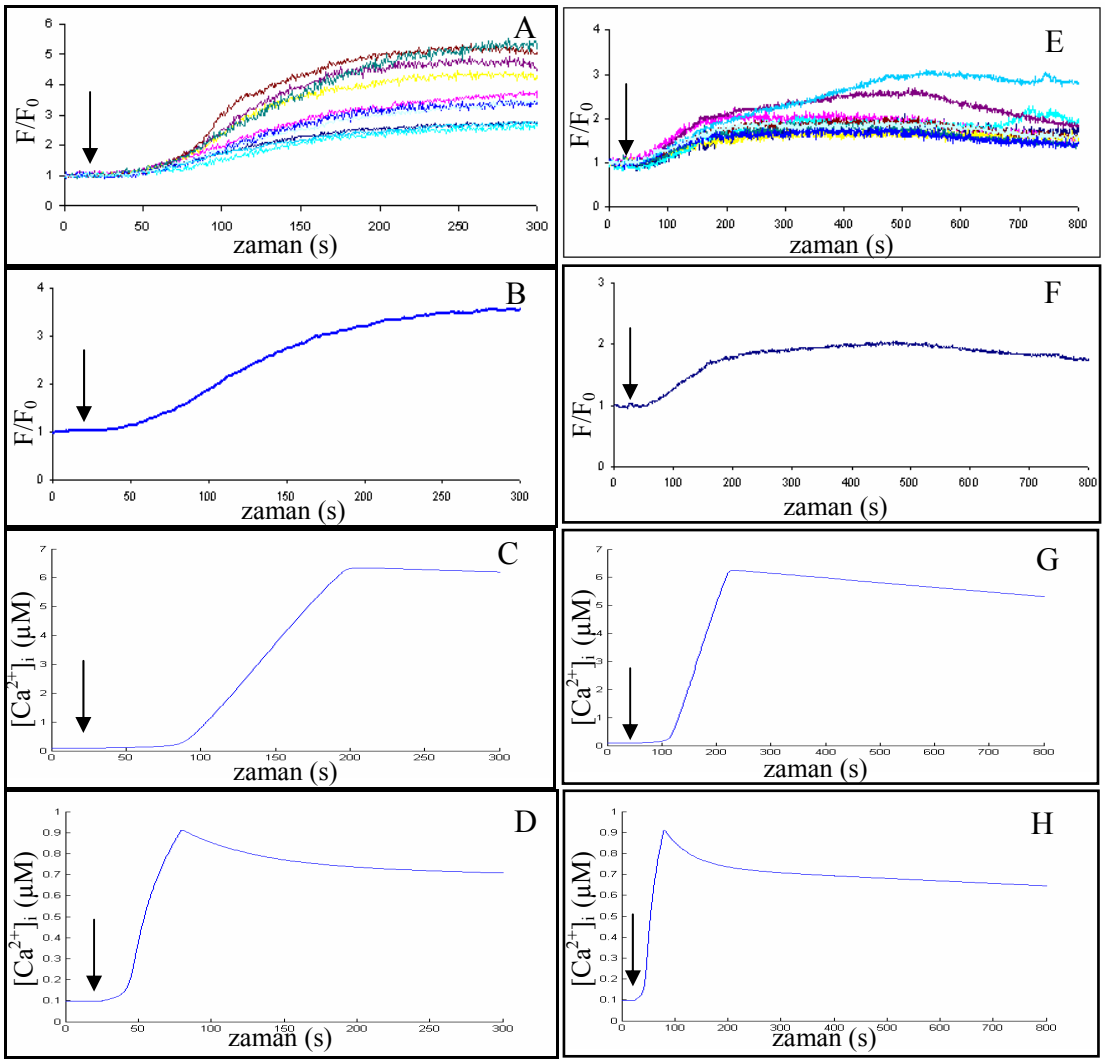
Ca^{2+} sinyalinin düzenlenmesinde, Ca^{2+} pompalarının belirleyici etkisi bulunmaktadır. Bu etki sadece dış uyaraların etkisi ile oluşan $[Ca^{2+}]_i$ artışını dengelemekten ibaret değildir. Aynı zamanda Ca^{2+} sinyalinin uzamsal-zamansal şekillenmesi için de, bu pompaların aktiviteleri önemlidir.

Hücre içi Ca^{2+} sinyalinin modellenmesi söz konusu olduğunda, pompa davranışlarının modellenmesi, bu yüzden önem taşımaktadır. Çünkü eğer hakkında diğer bileşenlere göre daha fazla bilgi birikimi olan pompa davranışları gerçekçi şekilde modellenebilirse, sistemin daha kompleks olan IP_3R gibi bileşenlerinin modellenmesi daha kolay olacaktır. Bu yüzden ilk önce pompaların, sistemin bütününe ne şekilde etki ettiği incelenmiştir. Bunun için ilk önce 20 μM CPA kullanılarak SERCA bloke edildiğinde $[Ca^{2+}]_i$ değişiminin ne şekilde olduğu incelenmiştir (Şekil 3.1). Ardından SERCA ve PMCA, 20 μM CPA ve1 mM La^{3+} kullanılarak aynı anda engellenmiş ve $[Ca^{2+}]_i$ değişimi takip edilmiştir (Şekil 3.2). Bu deneyler sırasında, uygulanan kimyasallara rağmen, pompaların tamamen inhibe edilemediğine dair bulgulara rastlanmış (Şekil 3.3), ve bu durum modelleme aşamasında göz önünde tutulmuştur.

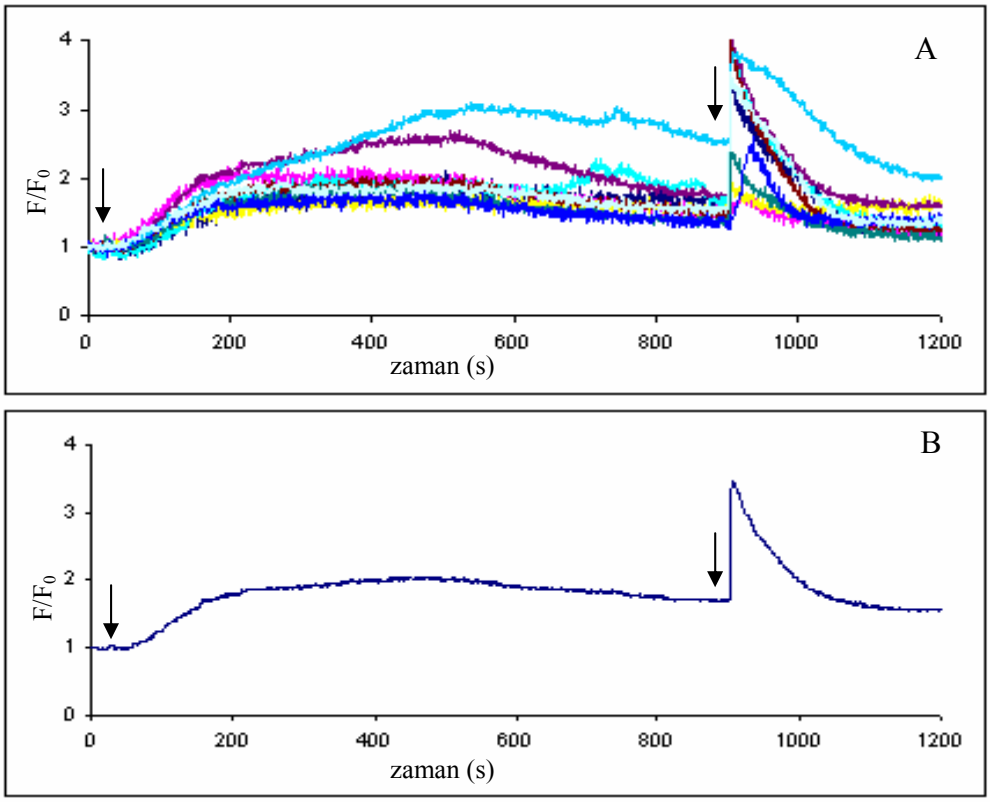
Modelleme yapılırken, Tablo 2.1'de verilen değer aralıklarında, rastgele parametrelerle simülasyonlar yapılmış, bu simülasyonlar arasından deneysel bulguların kinetik davranışına benzerlik gösterenlerin parametre kümeleri, sonraki simülasyonlarda kullanılmak üzere saklanmıştır. Şekil 3.1 ve 3.2'de ayrıca bu parametre kümelerinden, daha sonraki simülasyonlarda hücre içi Ca^{2+} sinyalini açıklamakta kullanılan tampon proteinsiz ve tampon proteinli pompa parametre kümeleri ile yapılan simülasyonlar da gösterilmiştir.



Şekil 3.1. SERCA inhibisyonu sonucu $[Ca^{2+}]_i$ değişim kinetiği. Şekide HEK-293 hücrelerine 20 µM CPA uygulaması ile SERCA'nın bloke edimesi sonucu hücre içi Ca^{2+} depolarının boşalması ve bu nedenle oluşan $[Ca^{2+}]_i$ değişiminin kinetiği gösterilmektedir. **A.** Bir deney sonucu 10 farklı hücredeki $[Ca^{2+}]_i$ değişimi. **B.** Aynı deneydeki tüm hücrelerin ortalama $[Ca^{2+}]_i$ değişimi. **C.** Simülasyonlarda kullanılan pompa parametreleri ile hesaplanan $[Ca^{2+}]$ değişimi. **D.** Tampon proteinlerinin hesaplamaya eklenmesi ile yapılan simülasyon sonucu. CPA uygulaması şekil üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 3.2. SERCA ve PMCA'nın birlikte inhibisyonu. SERCA ve PMCA pompaları, 20 µM CPA ve 1 mM La^{3+}'un aynı anda uygulanması ile, birlikte bloke edilmişlerdir. **A-B:** $[Ca^{2+}]_i$ artışının kinetiği. **C-D:** $[Ca^{2+}]_i$ artışının tamponsuz ve tamponlu simülasyonu. **E-F:** $[Ca^{2+}]_i$'nun 10 dk.'dan uzun süre yüksek kalışı. **G-H:** $Ca^{2+}]_i$'nun 10 dk.'dan uzun süre yüksek kalışının tamponsuz ve tamponlu simülasyonu. Kimyasalların uygulanma zamanları şekilde gösterilmiştir.



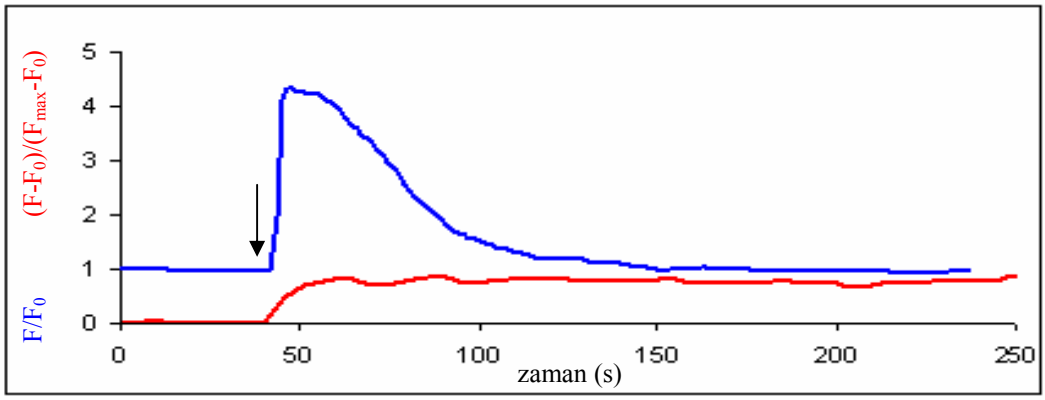
Şekil 3.3. Pompa inhibisyonunun kısmi oluşu. Şekilde, HEK-293 hücrelerinin SERCA ve PMCA pompalarının 20 µM CPA ve 1 mM La^{3+} ile aynı anda bloke edildikten 15 dk. Sonra uygulanan 10^{-6} M ACh dozu ile oluşan $[Ca^{2+}]_i$ artışı görülmektedir. **A.** 10 ayrı hücrenin $[Ca^{2+}]_i$ değişimi. **B.** Deneydeki tüm hücrelerin ortalama yanıtları. Kimyasalların uygulanma zamanları şekilde gösterilmiştir.

3.2 IP_3 Kinetiğinin Ca^{2+} Sinyaline Etkisi

Ca^{2+} sinyalinin başlaması için IP_3R'lerin IP_3 tarafından Ca^{2+}'a geçirgen hale getirilmeleri gerekmektedir. Bu yüzden IP_3 oluşumunun kinetiği Ca^{2+} sinyalinin şekillenmesinde belirleyici etkiye sahiptir, ayrıca modellemede de göz önüne alınması gereken bir faktördür.

Bu bileşenin sistemi nasıl etkilediğini gözlemleyebilmek için, geçici olarak GFP-$PH_{PLC\delta1C}$ transfekte edilen LTK-8 hücrelerinde, IP_3 ölçümü yapıldı. Bu ölçüm, paralel olarak yapılan Ca^{2+} ölçümü ile birlikte, Ca^{2+} yanıtının geçiciliğinde, IP_3 derişim kinetiğinin bir etkisi olmadığını, üretilen IP_3 miktarının hücre içinde uzun bir süre sabit kaldığını gösterdi (Şekil 3.4).

HEK-293 hücrelerinde bu ölçümü açıklayamadığımız bir nedenden dolayı yapamasak da, LTK-8 hücrelerinde net olarak görülen IP_3 miktarının değişmiyor oluşu nedeniyle, simülasyonlarda IP_3 konsantrasyonunun agonist uyarısı boyunca sabit kaldığı varsayıldı.

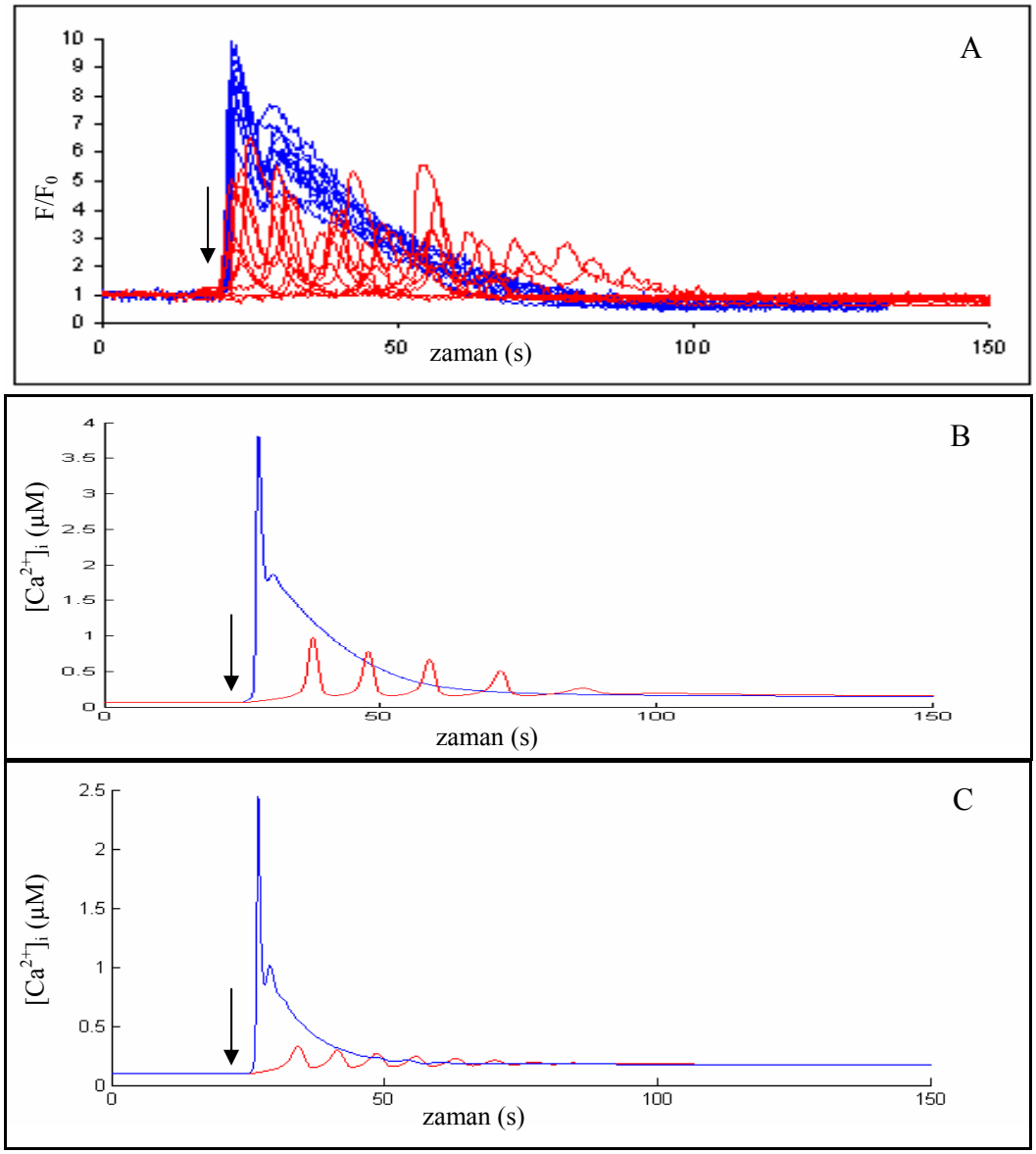


Şekil 3.4. IP_3 ile Ca^{2+} sinyali arasındaki ilişki. Şekilde, LTK-8 hücrelerine $10^{-6,5}$ M ACh uygulaması sonucu oluşan IP_3 ve Ca^{2+} yanıtlarının ortalamaları, aynı grafikte gösterilmiştir. Ca^{2+} değişimi mavi renkte, IP_3 ise kırmızı renkte betimlenmiştir. Şekilde görüleceği gibi Ca^{2+} dinlenim durumuna dönmüş, IP_3 ise arttığı miktarda uzun süre sabit kalmıştır. Agonist uygulaması şekilde gösterilmiştir.

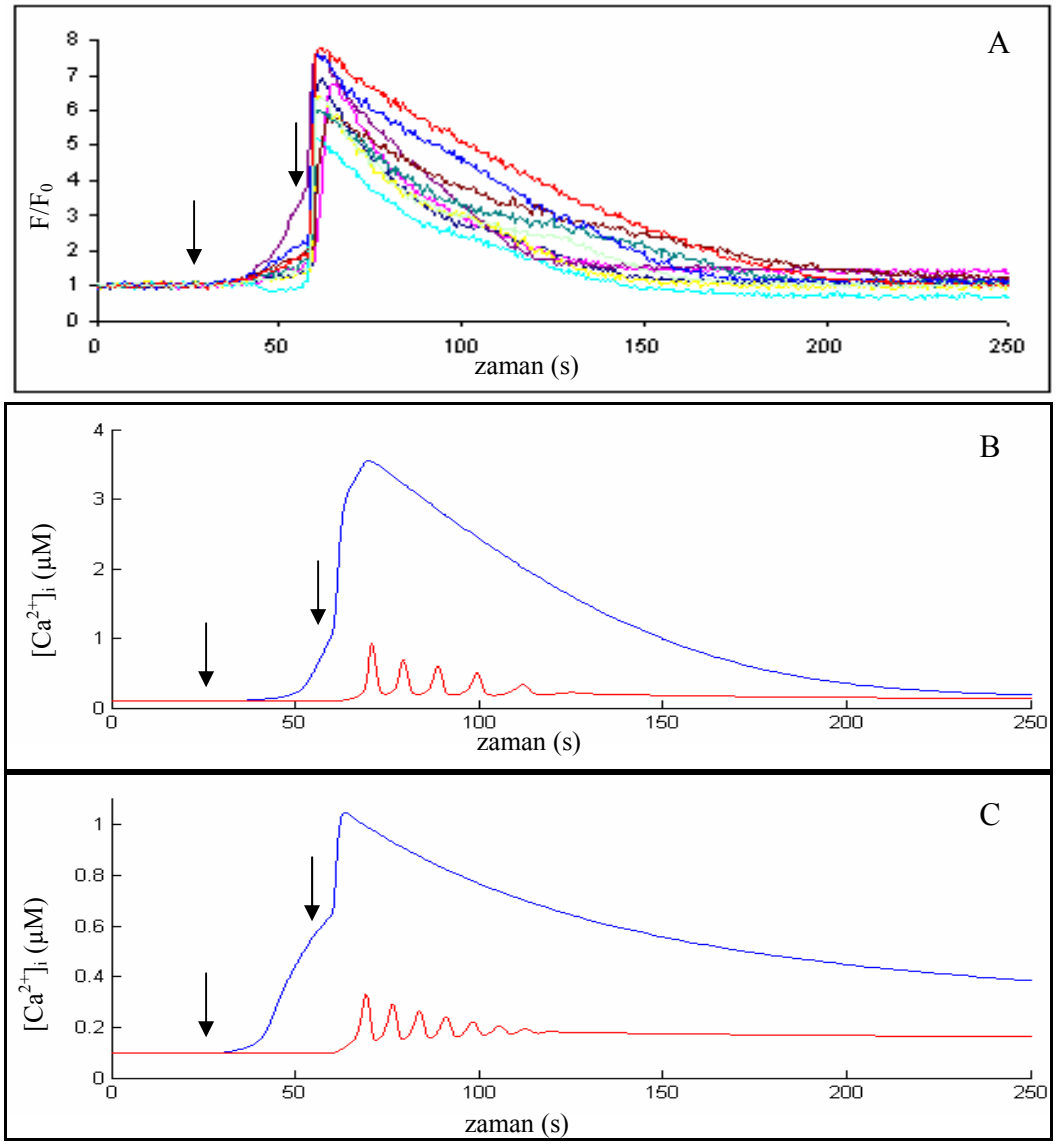
3.3 Ca^{2+} Osilasyonları

Ca^{2+} sinyalinin en önemli özelliklerinden bir tanesi, Ca^{2+} osilasyonlarıdır. Ca^{2+} osilasyonlarının oluşumunda belirleyici olduğu bilinen faktörler, uyarı şiddeti ve SERCA aktivitesidir. Osilasyonlar uyarı şiddeti az olduğunda ortaya çıkmakta, agonist dozunun artışı ile uyarı şiddeti artırıldığında ise, yerlerini daha uzun süreli ama geçici bir $[Ca^{2+}]_i$ artışına bırakmaktadırlar (Şekil 3.5). Agonist uygulamasından $[Ca^{2+}]_i$ artışı gözlenmeyecek kadar kısa süre önce CPA kullanılarak SERCA pompası bloke edildiği zaman ise, osilasyonlar ortadan kaybolmaktadırlar (Şekil 3.6).

Othmer-Tang IP_3R modeli kullanılarak yapılan simülasyonlarda, Ca^{2+} sinyalinin osilasyon özelliği ve bu özelliğin uyarı şiddeti arttığında ortadan kalkması gösterilmiştir. Bu simülasyonlarda, hücreler kısa süre dinlenim durumunda tutulduktan sonra, düşük uyarı şiddeti olarak 0,1 μM IP_3, yüksek uyarı şiddeti olarak da, 1 μM IP_3 uygulaması simüle edilmiştir (Şekil 3.5). Ayrıca, uyarıdan kısa süre önce SERCA blokajı da simüle edilip, osilasyonları ortadan kaldırıcı özelliği gösterilmiştir (Şekil 3.6). Benzer simülasyonlar, Othmer-Tang IP3R modelinin ortamda tampon proteinleri varken çalıştırılmasıyla da yapılmıştır.



Şekil 3.5. Uyarı şiddetinin Ca^{2+} yanıtına etkisi. Şekilde, iki farklı agonist dozunun, ya da iki faklı IP_3 konsantrasyonunun, HEK-293 hücrelerindeki Ca^{2+} yanıtının şekli üzerindeki etkisi görülmektedir. **A.** 10^{-7} M (kırmızı), veya 10^{-4} M (mavi) ACh uygulaması ile oluşan, 10'ar ayrı hücreden alınan Ca^{2+} yanıtları. **B.** 0,1 µM (kırmızı) ve 1 µM (mavi) IP_3'ün etkisinin, Othmer-Tang IP_3R modeli kullanılarak simüle edilmesi. **C.** 0,1 µM (kırmızı) ve 1 µM (mavi) IP_3'ün etkisinin, Othmer-Tang IP_3R modeli kullanılarak ve tampon proteinleri göz önüne alınarak simüle edilmesi. Kimyasalların uygulanma zamanları şekilde gösterilmiştir.



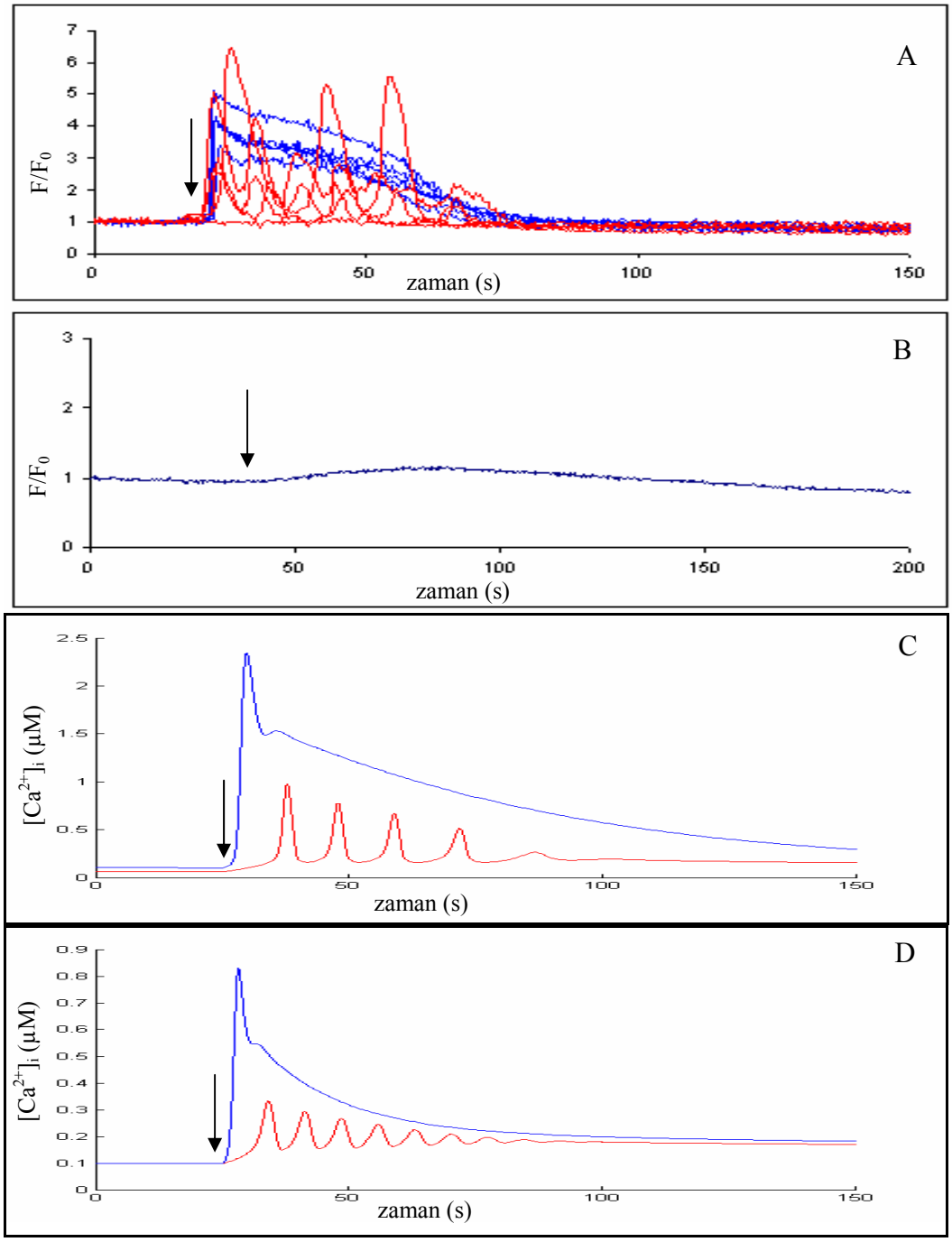
Şekil 3.6. SERCA inhibisyonunun osilasyonlara etkisi. Agonist uygulamasından kısa bir süre önce 20 µM CPA ile SERCA'nın bloke edilmesi, Ca^{2+} osilasyonlarını ortadan kaldırmaktadır. **A.** HEK-293 hücrelerinde 10^{-6} M ACh uygulamasından 30 s. önce CPA uygulamasında, 10 ayrı hücrenin $[Ca^{2+}]_i$ değişimi gösterilmiştir. **B.** 0,1 µM IP_3 uygulaması, Othmer-Tang IP_3R modeli kullanılarak, 25 s. önce SERCA blokajı ile (mavi) veya blokaj olmadan (kırmızı) simüle edilmiştir. **C.** 0,1 µM IP_3 uygulaması, Othmer-Tang IP_3R modeli kullanılarak, ve tampon proteinler eklenerek, 25 s. önce SERCA blokajı ile (mavi) veya blokaj olmadan (kırmızı) simüle edilmiştir. Kimyasalların uygulanma zamanları şekilde gösterilmiştir.

3.4 Hücre Tipleri Arasında Ca^{2+} Sinyali Farkları

LTK-8 hücreleri ile HEK-293 hücreleri arasında, Ca^{2+} osilasyonları konusunda temel bir fark bulunmaktadır, bu fark da, LTK-8 hücrelerinde, HEK-293 hücrelerine göre Ca^{2+} osilasyonlarının, düşük agonist dozlarında bile görülmüyor oluşudur. Bu fark, Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

Bu durumun olası nedenlerinden bir tanesi, HEK-293 hücreleri ile LTK-8 hücrelerinin SERCA aktivitelerinin, yani Ca^{2+}'un uzaklaştırılmasında SERCA'nın etkisinin farklı olmasıdır. Bu olası bir açıklamadır, çünkü SERCA inhibisyonu, LTK-8 hücrelerinde, HEK-293 hücrelerindeki kadar belirgin $[Ca^{2+}]_i$ artışına neden olamamaktadır (Şekil 3.7).

Bu hipotezin modelleme ile açıklanıp açıklanamayacağını görmek için, modelde kullanılan SERCA parametresi, ve aynı zamanda Ca^{2+}'un depodan sızıntı sabiti, azaltılarak simülasyonlar yapılmıştır. Bu simülasyonlarda, SERCA aktivitesi azaltıldığında, Ca^{2+}'un osilasyon özelliğini kaybettiği görülmüştür (Şekil 3.7). Bu durum, hem tampon proteinsiz, hem de tampon proteinli simülasyonlarda görülmüştür. Tampon proteinli simülasyonlarda ayrıca IP3R yoğunluğu artırılıp, ER hacmi azaltılmıştır.



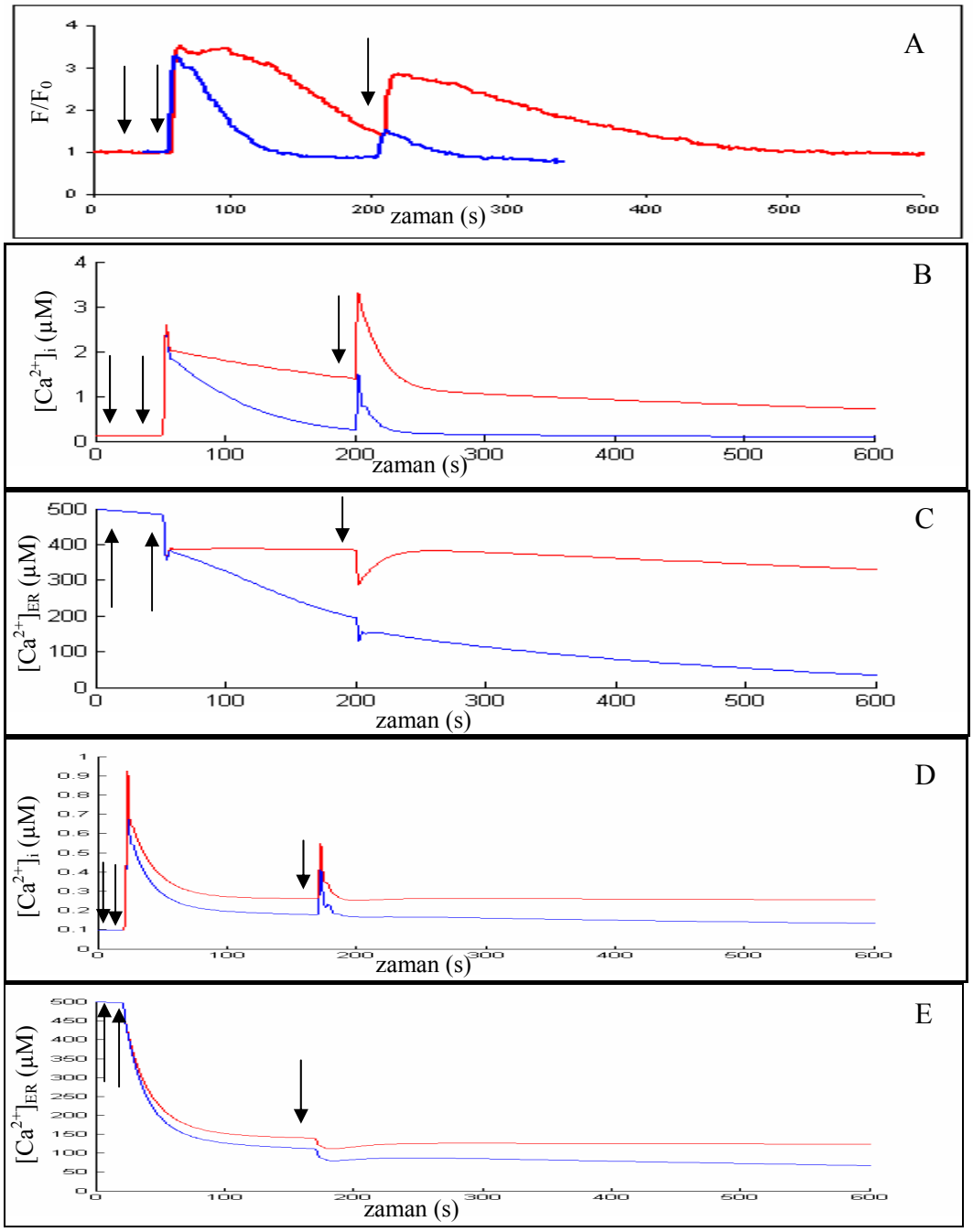
Şekil 3.7. Hücre Tipleri Arasında Ca^{2+} Sinyali Farkı. LTK-8 hücrelerinde Ca^{2+} osilasyonları, HEK-293 hücrelerine kıyasla neredeyse hiç görülmemektedir. Bunun sebebi, iki hücre tipinde SERCA'nın Ca^{2+} sinyaline etkisinin farklı olması olabilir. **A.** HEK-293 hücrelerinin 10^{-7} M ACh'a verdikleri yanıt (kırmızı) ile, LTK-8 hücrelerinin, 10^{-8} M ACh'a verdikleri yanıtın (mavi) aynı grafik üzerinde karşılaştırılması. **B.** LTK-8 hücrelerine 20 µM CPA uygulanması. **C.** Othmer-Tang IP_3R modeli kullanılarak, HEK-293 (kırmızı) ve LTK-8 (mavi) hücresinin 0,1 µM IP_3 etkili Ca^{2+} sinyalinin simülasyonu. **D.** Othmer-Tang IP_3R modeli kullanılarak, ve tampon proteinlerin etkisi hesaplanarak, HEK-293 (kırmızı) ve LTK-8 (mavi) hücresinin 0,1 µM IP_3 etkili Ca^{2+} sinyalinin simülasyonu. Kimyasalların uygulama zamanları, şekil üzerinde gösterilmiştir.

3.5. Kuantal Ca^{2+} Salımı: PMCA'nın rolü

Kuantal Ca^{2+} salımının özellikleri ile ilgili olarak, ilk önce LTK-8 hücrelerinde kuantal Ca^{2+} salımının özellikleri ile ilgili deneyler yapıldı. Bu deneylerde, ikinci yanıtın, ilk yanıta göre daha zayıf olduğu gözlendi (Şekil 3.8).

Bu duruma dış ortamda Ca^{2+}'un olmadığı, bu yüzden kapasitatif Ca^{2+} girişinin de olamadığı deney koşullarında, Ca^{2+}'un önemli bir bölümünün PMCA tarafından hücre dışına atılmasının sebep olup olmadığını test etmek için, PMCA'nın La^{3+} ile inhibe olduğu koşullarda, kuantal yanıt deneyleri tekrarlandı, ve ikinci yanıtın büyük ölçüde güçlendiği gözlendi (Şekil 3.8).

Othmer-Tang IP_3R modeli ve LTK-8 parametreleri kullanılarak yapılan simülasyonlarda, PMCA inhibisyonu simüle edildiğinde, deneylere benzer davranış görüldü. Ayrıca bu simülasyonlara göre $[Ca^{2+}]_{ER}$'nin de, PMCA inhibe olduğunda daha yavaş azaldığı gözlendi. Bu da ikinci kuantal yanıt ile depo doluluğu arasındaki ilişkiyi göstermiş oldu (Şekil 3.8). Bu ilişki hem tampon proteinsiz, hem de tampon proteinli simülasyonlarda gözlendi.

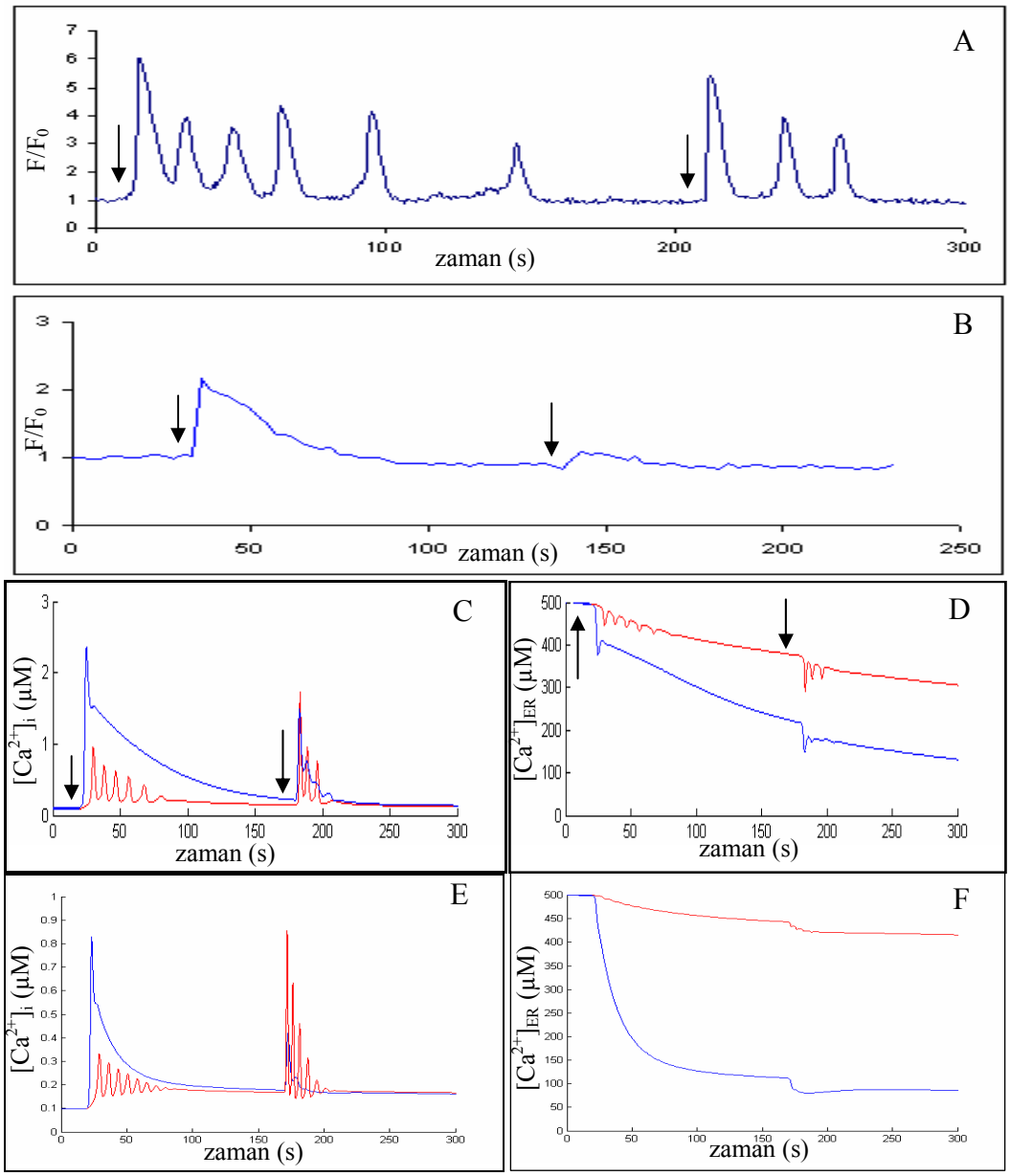


Şekil 3.8. Kuantal Ca^{2+} salımına PMCA blokajının etkisi. Kuantal Ca2+ salımında, ikinci yanıtlar, ilk yanıtlara göre zayıf olmaktadır. Bunun sebebi, ilk Ca^{2+} yanıtından sonra, Ca^{2+} depolarının önemli derecede boşalması, dış ortamda Ca^{2+} olmadığı için kapasitatif Ca^{2+} girişinin bu boşalmayı telafi edemeyişdir. **A.** LTK-8 hücrelerinde 1 mM La^{3+} varlığında (kırmızı) ve yokluğunda (mavi) $10^{-6,5}$ M ve 10^{-4} M ile oluşturulan kuantal Ca^{2+} yanıtları. **B.** Othmer-Tang IP_3R modeli ve LTK-8 hücre parametreleri ile, PMCA blokajı varlığında (kırmızı) ve yokluğunda (mavi), 0,1 µM ve 1 µM IP_3 etkili Ca^{2+} simülasyonları. **C.** B'deki simülasyon sonucu, $[Ca^{2+}]_{ER}$ değişimi. **D-E:** B ve C'deki simülasyonların, tampon proteinler eklenerek yapılması. Kimyasalların uygulanma zamanları, şekilde gösterilmiştir.

3.6 Kuantal Ca^{2+} salımı: Hücre Tipleri Arasındaki Farklar

HEK-293 ve LTK-8 hücreleri arasında, yanıt şekilleri ile birlikte, kuantal Ca^{2+} salımı şekillerinde de farklılıklar bulunmaktadır. Bu farkların arasında, HEK-293 hücrelerinde kuantal Ca^{2+} yanıtında ikinci yanıtın LTK-8 hücrelerinin aksine, ilk yanıt kadar yüksek olması sayılabilir (Şekil 3.9). Bunun sebebi, PMCA'nın kuantal yanıtlardaki etkisine benzer biçimde, LTK-8 hücrelerinde depoların HEK-293 hücrelerine göre daha hızlı boşalması olabilir. HEK-293 hücrelerinde ikinci yanıtın da ilk yanıt gibi osilasyon şeklinde olması, bu ihtimali güçlendirmektedir (Şekil 3.9).

Othmer-Tang IP3R modeli kullanılarak yapılan simülasyonlarda da, bu farkın sebebi, Ca^{2+} depolarının, LTK-8 hücrelerinde, HEK-293 hücrelerine göre daha hızlı boşalması olarak görülmektedir (Şekil 3.9). Bu durum hem tampon proteinsiz hem tampon proteinli simülasyonlarda görülmektedir.

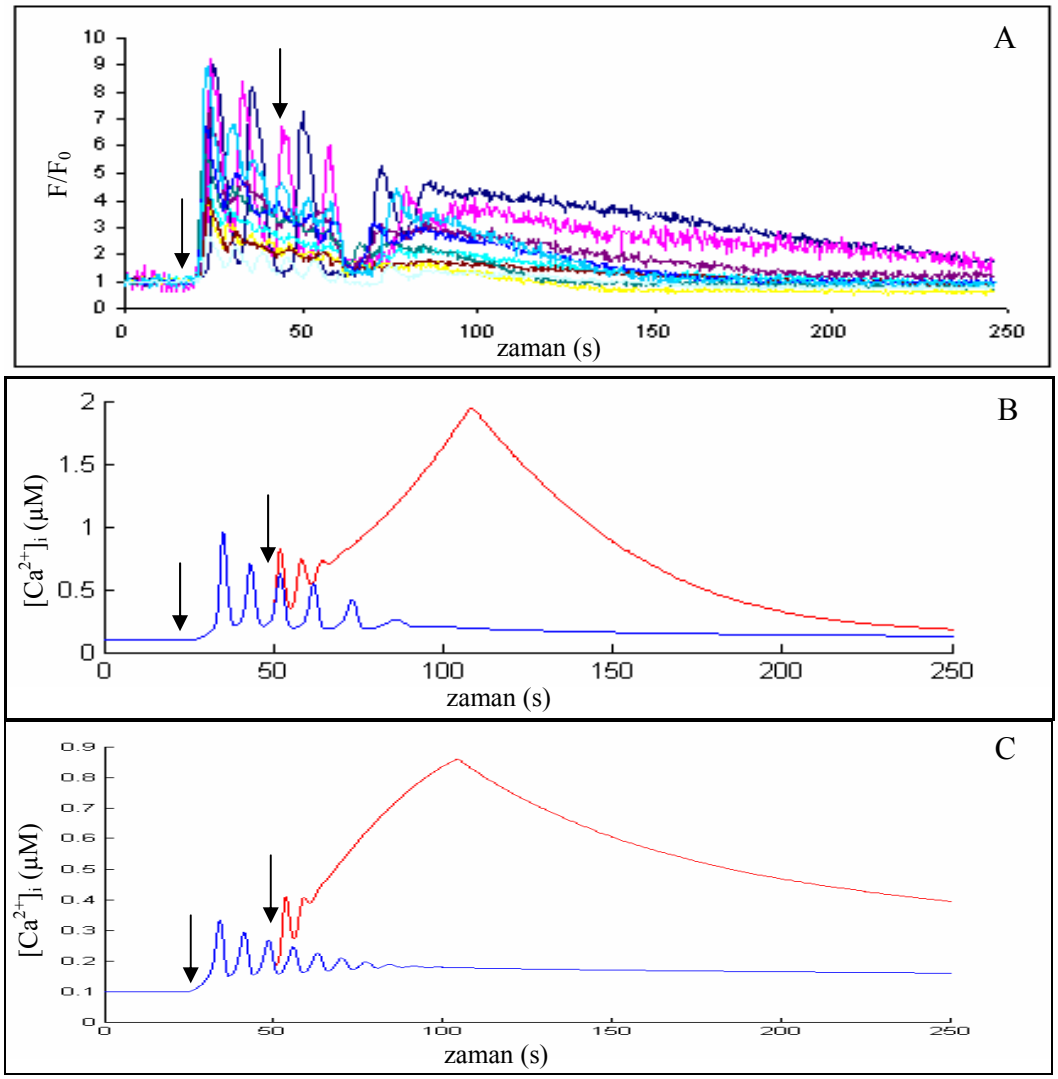


Şekil 3.9. Hücreler arası farkların kuantal Ca^{2+} yanıtına etkileri. Şekilde, HEK-293 ve LTK-8 hücreleri arasındaki kuantal yanıtların farkı gösterilmiştir. **A.** HEK-293 hücrelerine, 10^{-6} M ve 10^{-4} M ACh uygulaması, tek hücre $[Ca^{2+}]_i$ değişimi. **B.** LTK-8 hücrelerine, 10^{-6} M ve 10^{-4} M ACh uygulaması, tek hücre $[Ca^{2+}]_i$ değişimi. **C.** Othmer-Tang IP_3R modeli kullanılarak HEK-293 (kırmızı) ve LTK-8 (mavi) hücre parametreleriyle, 0,1 µM ve 1 µM IP_3 konsantrasyonları ile simüle edilen Ca^{2+} yanıtları. **D.** C'deki simülasyona göre $[Ca^{2+}]_{ER}$ değişimi. **E-F:** C ve D'deki simülasyonların, tampon proteinler hesaba katılarak yapılması. Kimyasalların uygulama zamanları şekilde gösterilmiştir.

3.7 SERCA'nın Ca^{2+} Yanıtı Süresince Fonksiyonu

SERCA'nın faaliyetinin Ca^{2+} sinyali boyunca ne derecede etkili olduğu, osilasyonlara hangi aşamada katkıda bulunduğu konusunda fikir sahibi olabilmek için, HEK-293 hücrelerinde agonist uygulamasından kısa bir süre sonra, Ca^{2+} osilasyonları sürerken CPA kullanılarak SERCA bloke edildi. Bu inhibisyon, Ca^{2+} yanıtının geçici bir şekilde durmasına sebep oldu, ve bu duraklamayı, depodan hızlı bir Ca^{2+} çıkışı takip etti (Şekil 3.10).

Othmer-Tang IP3R modeli, bu olguyu açıklamakta yetersiz kaldı. Modelin tahmin ettiği davranış, inhibisyonun ardından, kesintisiz bir depodan Ca^{2+} çıkış hızı artışı oldu. Simülasyona tampon proteinlerin eklenmesi de bu durumu değiştirmedi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Ca^{2+} yanıtı sırasında SERCA blokajının etkisi. SERCA'nın Ca^{2+} osilasyonları sürerken inhibe edilmesi, Ca^{2+} yanıtında bir duraklamaya neden olmaktadır. **A.** HEK-293 hücrelerinde 10^{-6} M ACh uygulamasının 30 s. ardından 20 µM CPA uygulanmıştır. Şekilde, 10 ayrı hücrenin yanıtı görülmektedir. **B.** Othmer-Tang IP_3R modeli kullanılarak SERCA inhibisyonu (kırmızı), inhibisyonsuz simülasyonla (mavi) kıyaslanmış, simülasyonun olguyu taklit etmediği görülmüştür. **C.** Othmer-Tang IP_3R modeli ve tamponların etkisi kullanılarak SERCA inhibisyonu (kırmızı), inhibisyonsuz simülasyonla (mavi) kıyaslanmış, simülasyonun olguyu taklit etmediği görülmüştür. Kimyasalların uygulanma zamanları şekil üzerinde gösterilmiştir.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Ca^{2+} sinyalinin bazı temel özelliklerinin ortaya konulmasına, ve bu ortaya konulan özelliklerin, bir matematiksel model etrafında bir araya getirilmesine çalışılmıştır.

Ca^{2+} sinyali, en genel anlamda, doğrusal olmayan bir sistemdir, yani; içindeki bileşenlerin oluşturduğu etkiler, sisteme etki güçleri ile doğrusal olmayan bir şekilde yön vermektedir, bu nedenle de bu sistemin açıklanabilmesi için, elemanların sisteme olan etkilerini ve birbirleri ile olan ilişkilerini çok iyi anlamak gerekmektedir. Bu da ancak iyi bir matematiksel model oluşturmakla mümkün olabilir.

Bu çalışmada yapılan deneylerde, pek çok ilginç bulguya ulaşılmıştır. Pompaların kimyasal uygulamalarına rağmen tamamen inhibe olmamaları, farklı hücre tiplerinin Ca^{2+} sinyalinde farklı davranışlar gösteriyor olmaları, kuantal Ca^{2+} yanıtlarına PMCA blokajının etkisi, yanıt sırasında SERCA inhibisyonunun Ca^{2+} salımında duraklamaya sebep olması, bu bulgular arasında sayılabilir. Fakat bu bulguları esas değerli kılacak olan, bütün bu fenomenlerin, matematiksel ilişkiler şeklinde yeniden oluşturulabilmesi olacaktır.

Deneyler sırasında dış ortamda Ca^{2+} olmaması, kapasitatif Ca^{2+} girişinin sistemi etkilememesi için gereklidir. Fakat bu yöntem, iki farklı noktadan eleştiriye açıktır. Birinci olarak, hücrelerin Ca^{2+}'suz ortamda fizyolojilerinin nasıl etkileneceği bir sorundur. Bununla birlikte, Ca^{2+}'suz ortamda hücrelerin deney yapılan süre zarfında bulunmasının, hücrelerde ciddi bir Ca^{2+} kaybına sebep olmadığı literatürde gösterilmiştir (Yu ve Hinkle, 2000). PMCA aktivitesine rağmen Ca^{2+}'un hücre dışına hızlı bir şekilde kaçmayışı, PMCA'nın bazal aktivitesinin düşüklüğü ile açıklanabilir. Bir diğer eleştiri de, dış ortamda nominal olarak bulunan Ca^{2+}'un etkisi ile ilgili olabilir. La^{3+}'un PMCA blokajı yapabilmesi için, ortamda EGTA gibi Ca^{2+} çelatölerinin olmaması gerekmektedir, çünkü bu çelatörler Ca^{2+}'dan önce La^{3+}'u tutmaktadırlar. Bu nominal Ca^{2+}, en fazla birkaç μM olabilir ve bu konsantrasyon,

1,5 mM civarı olan fizyolojik konsantrasyona göre çok az olduğundan, hücreleri neredeyse hiç etkilemeyecektir. PMCA blokajı için kullanılan La^{3+}'un ise, bazı GPKR'ler üzerinden oluşan Ca^{2+} yanıtlarını bloke ettiği bilinmekle birlikte, laboratuvarımızda yapılan deneyler sonucu M_3 muskarinik reseptörlerin bu inhibisyondan etkilenmedikleri gözlenmiştir (Süzgün, 2008), ve deneysel süreçte M_3 reseptörleri uyarılarak Ca^{2+} sinyali başlatılmıştır.

Ca^{2+} sinyali ve bileşenleri ile ilgili bu güne dek, bazıları tezin giriş kısmında örneklenen, pek çok model oluşturulmuştur, literatürde de bu modelleri, özellikle IP_3R'nin modellenmesini özetleyen çalışmalar bulunmaktadır (Sneyd ve Falcke, 2005). Bu alanda pek çok ilerleme kaydedilmesine rağmen, Ca^{2+} sinyalini bütün özellikleri ile birlikte açıklayıcı bir şekilde anlatan bir tüm hücre Ca^{2+} modeli, henüz oluşturulamamıştır.

Ca^{2+} sinyali ile ilgili modelleme çalışmalarının çoğunun özelliği, sistemin açıklamakta zorluk çekilen bütün özelliklerinin, kompleks yapısı nedeniyle fonksiyonu henüz açıklığa tam olarak kavuşturulamamış IP_3R'ye yüklenmesidir. Özellikle ilk bağlanma modellerinin (De Young-Keizer, Othmer-Tang) bütünlüğü bozulmamış hücredeki bulguları açıklamakla birlikte, izole edilmiş ER veziküllerindeki IP_3R davranışını, reseptörün dış ortamda Ca^{2+} artışı olmamasına rağmen inaktive oluşunu (Dufour ve ark. 1997) açıklayamamasının ardından, geliştirilen çoğu model, bu problemi, reseptörlere çeşitli fazlar ekleyerek aşmaya çalışmışlardır (Sneyd ve Dufour, 2002; Dawson ve ark., 2003). Bu yöntemin iki temel dezavantajı vardır; birincisi, reseptöre yüklenilen özelliklerin, deneyle gözlenemiyor oluşudur, oysa bağlanma modelleri, bire bir deney sonuçlarından yola çıkarak hazırlanmıştır. İkinci dezavantaj ise, bu modellerin pek çok özelliği IP_3R'ye yüklüyor olmalarının, diğer elemanlar arasındaki ilişkilerin üzerinin örtülmesine sebep olabileceğidir.

Bu çalışmada ise, bu yaklaşımdan farklı olarak, sistem mümkün olduğu kadar deneysel olarak da gözlenebilecek şekilde kurulmuş, ve özellikle IP_3R, *kararlı durum* datasını açıklayacak en basit şekilde modellenmiştir. Sistemin diğer elemanlarının

etkileri de, deneyler sonucu tespit edilip, bu elemanlar da yine olabilecek en basit şekilde sistemin içine sokulmuştur.

Hücreler, çok karışık sistemler oldukları için, muhtemelen hücreler arasında pek çok parametre değişkenlik göstermektedir. Buna rağmen, Ca^{2+} sinyali, özellikle aynı tip hücreler için, temel noktalarda önemli benzerlikler göstermektedir. Bu da, her şeyden önce oluşturulacak matematiksel modelde bir miktar esneklik olmasını zorunlu kılmaktadır. Ca^{2+} sinyalinin bileşenleri modellemenin içine sokulurken, bu husus göz önünde tutulmuştur.

ER, modellemede sitoplazmadan ayrı bir kompartman olarak kabul edilmiştir. Bu kompartmanın hacminin sitoplazmik hacme oranı modelde değişken kabul edilip aratılmıştır, ve muhtemelen bu hacim hücreden hücreye de değişmektedir. ER hacminin artırılması, SERCA blokajı sonucu veya uyarı sonucu depodan Ca^{2+} çıkış hızının artışına sebep olmaktadır ki, bunun sebebi, deponun konsantrasyonunun daha yavaş düşmesi, ve çıkış hızının iki kompartman arası farkla orantılı olmasıdır. Bu artış, diğer parametrelerin değişimi ile kolaylıkla telafi edilememektedir, çünkü depodan Ca^{2+} sızıntısı veya IP_3R'den uyarı sonucu Ca^{2+} çıkış hızı iki kompartman arası $[Ca^{2+}]$ farkı ile basitçe doğru orantılı iken, depoya Ca^{2+} geri alımı, hem sitoplazmik, hem ER $[Ca^{2+}]$'dan etkilenen, daha karmaşık bir olgudur. Bu yüzden ER hacminin sitoplazmik hacme oranı, sistem açısından belirleyicilik taşımaktadır.

Pompaların modellenmesinde, pompaların literatürde bilinen davranışları göz önüne alınmıştır (Camello ve ark., 1996; Yano ve ark., 2004). PMCA modellenirken, *Hill* denklemi kullanılmıştır, bunun sebebi ise, bu denklemin PMCA aktivitesinin $[Ca^{2+}]_i$ değişiminden etkilenişini açıklayabilmesidir. Modellemede PMCA parametreleri araştırılırken, bu parametrelerin deneysel olarak ortaya konan PMCA parametrelerine yakın olmaları göz önünde tutulmuştur.

SERCA aktivitesi, gözlendiği kadarı ile, PMCA'ya göre daha karmaşık görünmektedir (Mogami ve ark., 1998). Bunun sebebi, SERCA aktivitesinin hem sitoplazmik hem de ER $[Ca^{2+}]$'dan etkileniyor oluşudur. Bu durumu SERCA'nın ER

proteinleri ile etkileşimi ile de açıklayanlar vardır (Baker ve ark., 2002), SERCA'nın doğrudan $[Ca^{2+}]_{ER}$ ile düzenlenmesi ile de (Yano ve ark., 2004). Bu durumu açıklayacak bir diğer hipotez de, SERCA'nın sızıntılı olmasıdır (Means ve ark. 2006). Gerçekte, bu üç hipotez de, Ca^{2+} sinyalinin bütünlüğü açısından denktir, yani modellemede üç hipotez de kullanılabilir. Bu yüzden bu çalışmada, SERCA aktivitesi, mümkün olduğu kadar basit şekilde, SERCA sızıntısını da hesaba katarak oluşturulmuştur.

IP_3R için modelleme yapılırken, bazı eksiklikleri bilinmesine rağmen, basitliği ve *kararlı durum* ölçümleriyle tutarlılığı yüzünden, Othmer-Tang modeli kullanılmıştır. Othmer-Tang modeli oluştururken, sadece reseptör modelinin temel fikri alınmış, modelle ilgili hız sabitleri gibi tüm parametreler, parametre aramasına sokularak bulunmuştur. Bu süreçte, orjinal modelin (Tang ve ark., 1996) ortaya koyduğu parametrelerden çok farklı parametrelere ulaşılmıştır. Bununla birlikte, parametre araması yapılırken *kararlı durum* datasına uygunluk ve bunun getirdiği termodinamik kısıtlamalar göz önüne alındığı için, modelin kinetik parametrelerindeki farklılıklar çok önemli bir sorun teşkil etmemektedir.

Orjinal model, reseptöre IP_3'ün ve aktivatör Ca^{2+}'un anında bağlandığını, inhibisyonun ise zamanla geliştiğini varsaymaktadır. Bu çalışmada deney sonuçları ile tutarlılık gösteren bütün model parametre setlerinde ise, IP_3 yavaş bağlanmakta, fakat IP_3 bağlanır bağlanmaz hızlı bir aktivasyonu sağlayan ilk Ca^{2+} bağlanması yaşanmakta, ikinci inhibitör Ca^{2+}, reseptöre daha yavaş bağlanmaktadır. Orjinal model bazı deneysel gözlemleri kendi parametreleri ile açıklayabilmektedir, fakat bu modelde önemli bir eksiklik, $[Ca^{2+}]_{ER}$'nin gerçeğe göre çok düşük bir değer olan 10 μM olmasıdır. Bu çalışmadaki parametre seti ile, 500 μM gibi gerçekçi bir $[Ca^{2+}]_{ER}$ varlığında, Ca^{2+} sinyali gerçeğe uygun simüle edilmiştir. Bu modele getirilebilecek bir eleştiri, ER hacminin orjinal modele göre yaklaşık 5 kat küçük olmasıdır, fakat hem ER hacminin sitoplazmik hacme oranının tam olarak bilinememesi, hem de bu hacmin ne kadarının Ca^{2+} sinyali tarafından kullanılabilir olduğunun belirsiz olması, bu eleştiriyi, önemsizleştirmemekle birlikte, hafifletmektedir.

Öte yandan geliştirilen model, sadece orjinal modeldeki gibi Ca^{2+} osilasyonlarının uyarı şiddeti ile ilişkisini açıklamakla kalmamakta, ayrıca osilasyonlar ile SERCA aktivitesi ilişkisi, iki farklı hücre tipinin faklı Ca^{2+} yanıtı şekilleri, kuantal yanıtlar ile SERCA ve PMCA ilişkisi gibi pek çok konuda, öngörü sahibi olmamızı sağlamaktadır. Ayrıca pek çok hücre içi Ca^{2+} olayının altında yatan nedenlere dair ipuçları vererek, bu gibi doğrusal olmayan bir sistem için aydınlatıcı olmaktadır.

Model, sistemin özelliklerini bütün elemanlara dağıtma konusunda başarılı olmuş gibi gözükmektedir. Bunun nedeni, Ca^{2+} osilasyonlarından kuantal yanıta Ca^{2+} sinyali ile ilgili pek çok özelliğin, sadece IP_3R'nin değil, sistemin bir özelliği olduğunu göstermesidir. Çünkü model, sadece IP_3R'nin nasıl çalıştığını değil, aynı reseptör parametrelerinin farklı sistem özellikleri ile birlikte ne gibi sonuçlar oluşturacağını da açıklayabilmektedir.

Modelde dikkat çeken bir olgu, bazen konsantrasyonların, deneyde gözlenene benzemeyecek şekilde, beklenenden fazla yükseliyor gibi görünmesidir. Bu modelin bir eksikliği de olabilir, fakat bir diğer olasılık ise, $[Ca^{2+}]_i$'nin, ölçüm için kullanılan fluo-3 boyasının doyma konsantrasyonlarına yaklaşmasıdır. Böyle bir durumda, µM cinsinden önemli $[Ca^{2+}]$ artışları, floresans şiddetinde görece daha az artış yaratacaktır. Bir diğer önemli nokta, fluo-3 kullanılarak oransal olmayan $[Ca^{2+}]$ takibi yapıldığıdır. Bu yüzden, her ne kadar floresans yoğunluk değerleri bazal floresansa bölünerek bir düzeltme yapılsa da, bu ölçümü konsantrasyon bilgisine çevirmek olanaksızdır. Eksitasyonun lazer gibi güçlü bir kaynakla yapılması, ayrıca floresansın zamanla solmasına da neden olmaktadır, bu da floresans yoğunluğunu kaçınılmaz olarak azaltmaktadır. Sonuç olarak, Ca^{2+} sinyalinde $[Ca^{2+}]$'nun hangi değerlere çıktığını kestirebilmek, her koşulda zor bir iştir. Floresans boyaların Kd'leri kullanılarak bazı hesaplar yapılmakla birlikte, bu Kd değerleri hücre içinde değişmektedir. Ca^{2+} sinyali ile $[Ca^{2+}]$i'nin en fazla birkaç µM seviyesine çıktığı düşünülürse, bu durum simülasyonlarla tutarlılık göstermektedir.

Bu çalışmada, ayrıca hücre içi tampon proteinlerin de sisteme etkisi incelenmiştir. Yapılan simülasyonlar, sistemin temel davranışlarının, tampon proteinli veya

proteinsiz, aynı reseptör modeli ile modellenebilmesidir. Tampon proteinlerin sisteme sokulmasının belirgin bir etkisi olarak, $[Ca^{2+}]_i$'nin tepe değerlerinin, tamponsuz simülasyonlara göre belirgin bir düşüş göstermesi sayılabilir. Bu, tampon proteinlerinin hücre içi Ca^{2+}'un önemli bir bölümünü tamponladığı düşünüldüğünde, beklenen bir sonuçtur.

Tampon proteinleri varlığında bulunan sistem parametreleri, tampon proteinsiz sisteme göre belirgin bir farklılık göstermektedir. Bu, tampon proteinlerin sistemi önemli şekilde etkilediklerini göstermektedir. Gerçekten de tampon proteinleri varlığıda, $[Ca^{2+}]$ değişimi daha farklı şekilde gerçekleşeceği için, çalışabilme özelliğine göre kurulan bir matematiksel modelin parametrelerinin değişmesi kaçınılmazdır. Tampon proteinsiz ve tampon proteinli modelin önemli bir farkı, ER hacminin tampon proteinli simülasyonlarda, neredeyse sitoplazmik hacim kadar olmasıdır. Depodan çıkan Ca^{2+}, aksi takdirde belirgin bir $[Ca^{2+}]_i$ artışına neden olamamaktadır. Bu, modelin karanlıkta kalan bir noktasıdır. Tampon proteinlerinin sisteme kattığı bir diğer karmaşıklık da, HEK-293 ve LTK-8 hücreleri karşılaştırılırken, hücreler arası IP_3R yoğunluğu ve ER hacmi arasında farkların sisteme eklenmesinin, simülasyonu daha gerçeğe uygun hale getirmesidir. İki hücre arası ne tür farklar olduğunun bilinememesi, bu konuyu aydınlatmayı zorlaştırmakta ancak deneysel olarak sınanacak öngörülerde de bulunmaktadır.

Tampon proteinsiz ve tampon proteinli simülasyonların karşılaştırılması, tampon proteinlerin kendi başlarına sistemi çok önemli derecede etkilemediği sonucunu göstermiştir. Muhtemelen bu proteinlerin difüzyon özellikleri, sistem üzerinde esas belirleyiciliği oluşturmaktadır. Simülasyonlarda en uygun parametrelerin bulunamamış olması, daha geniş bir parametre uzayında bu parametrelerin aranması gerekliliği de bir ihtimal olabilir.

Othmer-Tang modeli, *deterministik* bir modeldir. Hücre içi Ca^{2+} sinyalinde ise, özellikle IP_3R aktivasyonunda, *stokastik* olayların belirleyici olduğu bilinmektedir. Tek kanal davranışlarının *stokastik* olduğu bilinmektedir. Yine de global Ca^{2+} olaylarında, yani yüzlerce, belki binlerce Ca^{2+} kanalının çok kısa bir zaman içinde

birlikte açıldığı düşünüldüğünde, bu kadar çok kanalın bir arada hareket etmesi, büyük olasılıkla, *deterministik* bir davranışa yaklaşacaktır. Aralarında doğal olarak pek çok fark olan hücrelerin Ca^{2+} sinyali formlarının birbirlerine bu denli benzemesi, *stokastik* etkilerin sisteme katkısının çok da fazla olmayabileceğini düşündürmektedir.

Oluşturulan Ca^{2+} modeli, yine de pek çok eksikliğe sahiptir. Örneğin bu model, SERCA'nın Ca^{2+} sinyali sırasındaki fonksiyonuna dair bir öngörüde bulunamamıştır. Tampon proteinlerinin sisteme etkisi de bu konuda ön açıcı olamamıştır. Yine de, pek çok açıdan, modelin açıklayıcı olduğu görülmektedir. Model, zaten gerçeği bire bir taklit etme amacı gütmemektedir. Gerçeği çok iyi bir şekilde taklit eden modeller de mevcuttur (Means ve ark., 2006), fakat bu modellerde sistemin bütününe dair açıklayıcılık geri plandadır. Bu çalışma, iyi bir Ca^{2+} modelinin, mümkün olduğu kadar basit olmasına rağmen, pek çok konuda açıklayabilici olduğunu göstermiştir. Özellikle IP_3R kinetik parametreleri değişmeden başka parametrelerin değişimi ile sistemin özelliklerinin değişebilirliği, Ca^{2+} sinyali modellenmesinde bütünsel bir yaklaşımın önemini göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hücre içi Ca^{2+} sinyalini düzenleyen elemanların bir arada nasıl çalıştığına ve birbirleri ile olan etkileşimlerinin hücre içi Ca^{2+} sinyalini nasıl etkilediğine dair bütünlüklü bir kavrayış oluşturulmaya çalışılmıştır. Oluşturulan matematiksel model yardımı ile, Ca^{2+} sinyalindeki pek çok önemli davranış taklit edilmiş, bununla kalınmayıp, bu olguların altında yatan nedenlere dair model tarafından desteklenen fikirler öne sürülmüştür.

Bu model sayesinde Ca^{2+} sinyalindeki bazı önemli olguların açıklanmasında önemli bir yol kat edilmiş olmakla birlikte, izole veziküllerdeki IP_3R'nün sabit IP_3 derişim ile uyarıya rağmen kuantal salıverme davranışı göstermesi, ve buna ek olarak bu çalışmada gösterilmiş olan, SERCA inhibisyonunun Ca^{2+} sinyalini duraklatması, açıklanamamış olarak durmaktadırlar. Ca^{2+}'un ER'den sitoplazmaya difüzyonu sırasında reseptör kanalı ağzında birikmesi, ve SERCA'nın bu birikim sürecini etkilemesi, kendi içinde ve bilinen temel fiziko-kimyasal yasalar ile tutarlı bir fikir gibi gözükmekle birlikte, bu fikrin de başka bir matematiksel modelle test edilmesi gerekmektedir.

Bu sistemin daha iyi anlaşılmasına dair atılabilecek bir adım da, $[Ca^{2+}]_{ER}$ ölçümleri yapılarak, çeşitli durumlarda ER'den Ca^{2+} çıkış kinetiğinin incelenmesidir. Böylece, hem reseptör ve pompa parametreleri bir süzgeçten daha geçebilecek, hem de modelin bazı tahminleri sınanabilecektir.

Bu çalışmadan sonra atılabilecek bir diğer adım, sisteme ryanodin reseptörleri eklenip, daha ganiş bir hücre grubu için modelin test edilmesi olabilir. Bir diğer ekleme de, hakkında sahip olunan bilgilerin sürekli arttığı kapasitatif Ca^{2+} girşinin modele eklenmesi olacaktır. Bütün bu işler süreç içinde ilerletildikçe, Ca^{2+} sinyali hakkında artan bilimsel kavrayış, bu sinyalin şifresinin çözülmesine dair adımları da beraberinde getirebilir.

ÖZET

Memeli Kültür Hücrelerinde Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinde Görev Alan Elemanların Entegre Bir Sistem Olarak İncelenmesi

Kalsiyum (Ca2+), hücre içi ve hücreler arası iletişimde çok önemli görevleri olan bir iyondur. Memeli kültür hücrelerindeki Ca2+ sinyal mekanizmasında görev alan başlıca elemanlar, hücre içi Ca2+ deposu görevi gören endoplazmik retikulum, depodaki Ca2+'un sitoplazmaya çıkışını sağlayan inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) reseptörü (IP3R), bu reseptörün fonksiyonunu düzenleyen IP3 ve Ca2+, sitoplazmadaki Ca2+'u uzaklaştıran SERCA ve PMCA pompaları, ve hücre içi Ca2+ tamponlarıdır.

Bu çalışmada, LEICA SP5 konfokal mikroskop kullanılarak HEK-293 ve LTK-8 hücrelerinde hücre içi Ca2+ derişimi ve IP3 kinetiği takip edilmiştir. SERCA inhibisyonu için CPA, PMCA'yı bloke etmek için ise lanthanum (La3+) kullanılmıştır. Daha sonra ise, bu çalışmada elde edilen bulgular, hücre içi Ca2+ sinyalini bir matematiksel model çevresinde bir araya getirmek için kullanılmıştır. Bu süreçte hücre içi değişkenlerin zamanla değişimini ifade eden denklemler, MATLAB tarafından sayısal olarak çözülmüştür. Bu denklemlerdeki parametreler, rastgele arama yöntemi ile belirlenmiştir.

Oluşturulan matematiksel model sonucu yapılan simülasyonlar, deney datası ile temel noktalarda tutarlılık göstermektedir. Ca2+ osilasyonları ve kuantal Ca2+ yanıtları dahil pek cok kompleks olgu, kullanılan modelleme şeması ile açıklanabilmiştir. Ayrıca model, bu olguların altında yatan nedenlere dair de pek çok olası öngörüyü beraberinde getirmektedir. Bu sonuç, hücre içi kalsiyum sinyalinin modellenmesinde deneysel olarak doğrulanamayacak şekilde IP3R'ye pek cok ozellik atfeden modellerdense, sistemin butununе hakim olan görece basit modellerin, hem kompleks deneysel sonuçları açıklayabileceğini hem de sisteme dair daha iyi bir bakış açısı kazandırabileceğini örneklemektedir.

Anahtar Sözcükler: Doğrusal olmayan sistemler, kalsiyum pompaları, kalsiyum sinyali, kuantal kalsiyum salımı, matematiksel modelleme.

SUMMARY

Examination of Cooperation of the Elements Taking Part in Intracellular Calcium Signaling as an Integrated System in Mammalian Culture Cells

Calcium (Ca2+) is a very important ion in intra- and intercellular signaling. Ca2+ acts as a signal molecule by the spatiotemporal changes in its concentration. Endoplasmic reticulum, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor (IP3R), IP3, Ca2+, SERCA, PMCA and Ca2+ buffers together regulate the Ca2+ signal.

The experiments included tracking the cytosolic Ca2+ and IP3 changes in HEK-293 and LTK-8 cells. Also CPA and lanthanum (La3+) are used to block SERCA and PMCA, respectively. The results of these experiments are consequently used to implement a mathematical model of intracellular Ca2+ signaling. Throughout the modeling stage, the differential equations describing the cellular processes are numerically solved by MATLAB, which parameters are determined by random search constrained by actual measurements in the literature.

The simulations performed with the constructed mathematical model are consistent with the data in its basic aspects. Many complicated phenomena such as quantal calcium release and calcium oscilations could be modeled with the given modelling framework. Furthermore, this model has the ability of making predictions and proposing mechanisms that determines the behaviour of the system. These results leads to the conclusion that instead of modeling IP3R in a complex manner by assuming that the behavior of the whole system depends on IP3R, a model describing the system as a whole is adequate to explain complex experimental data and provides better understanding about the mechanisms of this signaling.

Key Words: Calcium pumps, calcium signaling, mathematical modelling, nonlinear systems, quantal calcium release.

KAYNAKLAR

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

BAKER, H.L., ERRİNGTON, R.J., DAVİES, S.C., CAMPBELL, A.K. (2002). A Mathematical Model Predicts that Calreticulin Interacts with the Endoplasmic Reticulum Ca2+-ATPase. *Biophys. J.* **82**:582–590.

CAMELLO, P., GARDNER, J., PETERSEN, O.H., TEPIKIN, A.V. (1996) Calcium Dependence of Calcium Extrusion and Calcium Uptake in Mouse Pancreatic Acinar Cells. *J. Physiol*. **490.3**:585-593.

CAMELLO, C., LOMAX, R., PETERSEN, O.H., TEPIKIN, A.V. (2002) Calcium Leak from Intracellular Stores—the Enigma of Calcium Signalling. *Cell Calcium*. **32(5-6)**:355-361.

CATTERALL, W.A., PEREZ-REYES, E., SNUTCH, T.P., STRIESSNIG, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev*. **57(4)**: 411-25.

DARGAN, S.L., PARKER, I. (2003). Buffer Kinetics Shape the Spatiotemporal Patterns of IP3-Evoked Ca2+ Signals. *J. Physiol*. **553.3**:775-788.

DAWSON, A.P., LEA, E.J.A, IRVINE, R.F. (2003). Kinetic Model of the Inositol Trisphosphate Receptor that Shows both Steady-State and Quantal Patterns of Ca2+ Release from Intracellular Stores. *Biochem. J*. **370**: 621-629

DEMAUREX, N., FRIEDEN, M. (2003). Measurements of the Free Luminal ER Ca2+ Concentration with Targeted "Cameleon" Fluorescent Proteins. *Cell Calcium*. **34**:109-119.

DUFOUR, J.F., ARIAS, I.M., TURNER, T.J. (1997). Inositol 1,4,5-trisphosphate and Calcium Regulate the Calcium Channel Function of the Hepatic Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *J. Biol. Chem.*, **272(5)**: 2675-81.

EVELLIN, S., NOLTE, J., TYSACK, K., DORP, F., THIEL, M., WEERNINK, P.A.O., JAKOBS, K.H., WEBB, E.J., LOMASNEY, J.W.,SCHMİDT, M. (2002). Stimulation of Phospholipase C-epsilon by the M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Mediated by Cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *J. Biol. Chem.*, **277(19)**: 16805-13.

FALCKE, M. (2003). Buffers and Oscillations in Intracellular Ca2+ Dynamics. *Biophys. J.* **84**:28–41.

FALCKE, M. (2003). Modeling the Dependence of the Period of Intracellular Ca2+ Waves on SERCA Expression. *Biophys. J.* **85**:1474-81.

FALCKE, M. (2004). Reading the Patterns in Living Cells-the Physics of Ca2+ Signaling. *Adv. Phys*.**53.3**: 255-440.

GUERINI, D., GUIDI, F., CARAFOLI, E. (2002). Differential Membrane Targeting of the SERCA and PMCA Calcium Pumps: Experiments with Recombinant Chimeras. ***FASEB J.*** **16**: 519–528.

HAJNOCZKY, G., THOMAS, A.P. (1997). Minimal Requirements for Calcium Oscillations Driven by the IP3 Receptor. *EMBO J*. **16.12**: 3533-43.

HIGGINS, E.R., CANNELL, M.B., SNEYD, J. (2006). A Buffering SERCA Pump in Models of Calcium Dynamics. *Biophys. J.* **91**:151-163.

HILLE, B. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes: Third Edition. Sinauer Associates, Inc., p: 272-273.

JAN, C.R., HO, C.M., WU, S.N., HUANG, J.K., TSENG, C.J. (1998). Mechanism of Lanthanum Inhibition of Extracellular ATP-Evoked Calcium Mobilization in MDCK Cells. *Life Sci*. **62(6)**: 533-40.

KEIZER, J., LEVINE, L. (1996). Ryanodine Receptor Adaptation and Ca2+-lnduced Ca2+ Release-Dependent Ca2+ Oscillations. *Biophys. J.* **71**:3477-87.

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

LAVER, D.R. (2006). Proceedings of the Australian Physiological Society Symposium: Membrane Associated Proteins that Regulate Muscle Contraction-Regulation of Ryanodine Receptors from Skeletal and Cardiac Muscle During Rest and Excitation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. **33**:1107-13.

MAK, D.D., MCBRIDE, S., RAGHURAM, V., YUE, Y., JOSEPH, S.K., FOSKETT, J.K. (2000). Single-Channel Properties in Endoplasmic Reticulum Membrane of Recombinant Type 3 Inositol Trisphosphate Receptor. *J. Gen. Physiol*. **115**:241-255.

MCKAY, B.E., PLACZEK, A.N., DANI, J.A. (2007). Regulation of Synaptic Transmission and Plasticity by Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochem. Pharmacol*. **74(8)**: 1120-33.

MEANS, S., SMITH, A.J., SHEPHERD, J., SHADID, J., FOWLER, J., WOJCIKIEWICZ, R.J.H., MAZEL, T., SMITH, G.D., WILSON, B.S. (2006). Reaction Diffusion Modeling of Calcium Dynamics with Realistic ER Geometry. *Biophys. J.* **91**:537-557.

MOGAMI, H., TEPIKIN, A.V., PETERSEN, O.H. (1998). Termination of Cytosolic Ca2+ Signals: Ca2+ Reuptake into Intracellular Stores is Regulated by the Free Ca2+ Concentration in the Store Lumen. *EMBO J*. **17.2**: 435-442.

MONKAWA, T., MIYAWAKI, A., SUGIYAMA, T., YONESHIMA, H., YAMAMOTO-HINO, M., FURUICHI, T., SARUTA, T., HASEGAWA, M., MIKOSHIBA, K. (1995). Heterotetrameric Complex Formation of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Subunits. *J. Biol. Chem.*, **270(24)**: 14700-04.

NORTH, R.A. (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev*. **82**:1013-1067.

PATEL, S., JOSEPH, S.K., THOMAS, A.P. (1999). Molecular Properties of Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptors. *Cell Calcium.* **25(3)**: 247-64.

PUTNEY, J.W., BROAD, L.M., BRAUN, F.J., LIEVREMONT, J.P., BIRD, G.S. (2001). Mechanisms of Capacitative Calcium Entry. *J. Cell Sci.* **114(Pt 12)**: 2223-9.

SNEYD J. TSANEVA-ATANASOVA, K., BRUCE, J.I.E., STRAUB, S.V., GIOVANNUCCI, D.R., YULE, D.I. (2003). A Model of Calcium Waves in Pancreatic and Parotid Acinar Cells. *Biophys. J.* **85**:1392-1405.

SNEYD, J., FALCKE, M. (2005). Models of the Inositol Trisphosphate Receptors. *Prog. Biophys. Mol. Biol*. **89**:207-245.

SNEYD, J., DUFOUR, J.F. (2002). A dynamic model of the type-2 inositol trisphosphate receptor. *PNAS*. **99(4)**: 2398-2403.

SÜZGÜN, E.Ö.(2004). Lanthanum'un Hücre İçi Kalsiyum Yanıtını İnhibe Edici Özelliğinin, Kalsiyum Sinyal Mekanizması Üzerindeki Etkisinin Farklı Hücre Tiplerinde İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi.

SWILLENS, S., COMBETTES, L., CHAMPEIL, P. (1994). Transient Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Induced Ca2+ Release: A Model Based on Regulatory Ca2+-Binding Sites along the Permeation Pathway. *PNAS*. **91**: 10074-78.

TANG, Y., STEPHENSON, J.L., OTHMER, H.G. (1996). Simplification and Analysis of Models of Calcium Dynamics Based on IP3-Sensitive Calcium Channel Kinetics. *Biophys. J.* **71**:246-263.

TU, H., WANG, Z., NOSYREVA, E., DE SMEDT, H., BEZPROZVANNY, I. (2005). Functional Characterization of Mammalian Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Isoforms. *Biophys. J.* **88**:1046-1055.

TU, H., WANG, Z., BEZPROZVANNY, I. (2005). Modulation of Mammalian Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Isoforms by Calcium: A Role of Calcium Sensor Region. *Biophys. J.* **88**:1056-1069.

YANO, K., PETERSEN, O.H., TEPIKIN, A.V. (2004). Dual Sensitivity of Sarcoplasmic/Endoplasmic Ca2+-ATPase to Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca2+ as a Mechanism of Modulating Cytosolic Ca2+ Oscillations. *Biochem. J.* **383**: 353-360.

YU, R., HINKLE, P.M. (2000). Rapid Turnover of Calcium in the Endoplasmic Reticulum during Signaling-Studies with Cameleon Calcium Indicators. *J. Biol. Chem.*, **275(31)**: 23648-53.

EKLER

Ek-1

Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Modellenmesinde Kullanılan Denklemler ve Açıklamaları

Türevsel Denklemler:

Jip3 = Pip3*Po*(Cer - Ccy); IP3R akımı.

Jleak = Pleak*(Cer - Ccy); ER'den sitoplazmaya Ca^{2+} sızıntısı.

Jserca = Pserca*(Cermax - Cer)*((Ccy^nserca)/((Ccy^nserca) + (Kserca^nserca))); SERCA'nın Ca^{2+} pompalaması.

Jpmca = Ppmca*(Ccy^npmca/((Ccy^npmca) + (Kpmca^npmca))); PMCA'nın Ca^{2+} pompalaması.

Jout = PM*(Cout - Ccy); Dış ortamdan sitoplazmaya Ca^{2+} sızıntısı.

dCer/**dt** = -Jip3 - Jleak + Jserca; $[Ca^{2+}]_{ER}$ değişimi.

dCcy/**dt** = -dCer*Ver/Vcy - Jpmca + Jout; $[Ca^{2+}]_i$ değişimi.

Othmer-Tang Modeli:

dR/**dt** = -R*L*konL + RL*koffL;

dRL/**dt** = -RL*koffL + R*L*konL - RL*Ccy*konCa + RLCa*koffCa;

dRLCa/**dt** = -RLCa*koffCa + RL*Ccy*konCa - RLCa*Ccy*konCi + RLCaCi*koffCi;

dRLCaCi/**dt** = -(dR + dRL + dRLCa);

Po = [RLCa]/([R]+[RL]+[RLCa]+[RLCaCi]);

Değişkenler ve Parametreler:

Ccy: $[Ca^{2+}]_i$

Cer: $[Ca^{2+}]_{ER}$

L: IP_3

R: Serbest reseptör

RL: IP_3 bağlı reseptör

RLCa: IP3 ve aktivatör Ca^{2+} bağlı reseptör

RLCaCi: IP3, aktivatör Ca^{2+} ve inhibitör Ca^{2+} bağlı reseptör

Cermax: ER maksimum Ca^{2+} depolama kapasitesi.

Cout: Dış ortam $[Ca^{2+}]$

koffCa: Reseptöre aktivatör kalsiyum bağlanma geri hız sabiti

koffCi: Reseptöre inhibitör kalsiyum bağlanma geri hız sabiti

koffL: Reseptöre IP_3 bağlanma geri hız sabiti

konCa: Reseptöre aktivatör kalsiyum bağlanma ileri hız sabiti

konCi: Reseptöre inhibitör kalsiyum bağlanma ileri hız sabiti

konL: Reseptöre IP_3 bağlanma ileri hız sabiti

Kpmca: PMCA-Ca^{2+} Kd değeri

Kserca: SERCA-Ca^{2+} Kd değeri

npmca: PMCA *Hill* katsayısı

nserca: SERCA *Hill* katsayısı

Pip3: IP_3R aktivite katsayısı

Pleak: ER'den sitoplazmaya sızıntı katsayısı

PM: Dış ortamdan sitoplazmaya sızıntı katsayısı

Ppmca: PMCA aktivitesi

Pserca: SERCA aktivitesi

Vcy: Sitoplazmik hacim

Ver: ER hacmi

Tampon Protein Denklemleri:

dB/**dt** = - konB*C*B + koffB*CB; Herhangi bir tampon proteinin Ca^{2+}'a bağlanması

dCB/**dt** = konB*C*B - koffB*CB; Herhangi bir tampon proteinin Ca^{2+}'dan ayrılması

dCer/**dt** = -Jip3 - Jleak + Jserca + dBer/dt; Tampon protein varlığında $[Ca^{2+}]_{ER}$ denklemi

dCcy/**dt** = (Jip3 + Jleak – Jserca)*Ver/Vcy + dBcy/dt + dBcyIm/dt; Tampon protein varlığında $[Ca^{2+}]_i$ denklemi

Tampon protein parametreleri:

konB: Tampon protein ileri hız sabiti

koffB: Tampon protein geri hız sabiti

Ek-2

Simülasyonlarda Kullanılan Başlangıç Değerleri ve Parametreler

HEK-293 hücreleri Othmer-Tang Modeli:

Ccy: 0,1 μM
Cer: 500 μM
Cermax: 651 μM
Cout: 1 μM
koffCa: 0,3693 s^{-1}
koffCi: 0,0043 s^{-1}
koffL: 0,0551 s^{-1}
konCa: 2 $\mu M^{-1}s^{-1}$
konCi: 0,6 $\mu M^{-1}s^{-1}$
konL: 0,08 $\mu M^{-1}s^{-1}$
Kpmca: 0,32 μM
Kserca: 0,11 μM
npmca: 2
nserca: 4
Pip3: 25
Pleak: 0,2
PM: 5,9 x 10^{-6}
Ppmca: 0,05
Pserca: 0,2
Vcy: 450 μm^3
Ver: 9 μm^3

HEK-293 Hücreleri Othmer-Tang Modeli ve Tampon Proteinler:

Ccy: 0,1 μM
Cer: 500 μM
Cermax: 672 μM
Cout: 1 μM
koffCa: 1,069 s^{-1}
koffCi: 0,167 s^{-1}
koffL: 0,0592 s^{-1}
konCa: 5 $\mu M^{-1}s^{-1}$
konCi: 2,156 $\mu M^{-1}s^{-1}$
konL: 0,1257 $\mu M^{-1}s^{-1}$
Kpmca: 0,3846 μM
Kserca: 0,1032 μM
npmca: 3
nserca: 6
Pip3: 2,1248
Pleak: 0,03
PM: 1,2012 x 10^{-5}
Ppmca: 3
Pserca: 0,2
Vcy: 450 μm^3
Ver: 429,53 μm^3
Ber: 3510,6 μM
Bcy: 32,427 μM
BcyIm: 4563,8 μM
konBer: 2,6011 $\mu M^{-1}s^{-1}$
konBcy: 12,054 $\mu M^{-1}s^{-1}$
konBcyIm: 0,002863 $\mu M^{-1}s^{-1}$
koffBer: 5694,6 s^{-1}
koffBcy: 18,5993 s^{-1}
koffBcyIm: 0,0116 s^{-1}

LTK-8 Hücreleri Othmer-Tang Modeli:

Pserca: 0,4
Pleak: 0,02

LTK-8 Hücreleri Othmer-Tang Modeli ve Tampon Proteinler:

Pserca: 0,1
Pleak: 0,015
Pip3: 15
Ver: 100

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı:	Erol
Soyadı:	Özgür
Doğum yeri ve tarihi:	Kayacık – 07.06.1983
Uyruğu:	T.C.
Medeni durumu:	Bekar
İletişim adresi ve telefonu:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D. – 03123103010/337

EĞİTİMİ

Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Lisans Derecesi
(2001-2006)
İstanbul Adile Mermerci Anadolu Lisesi
(1994-2001)

Yabancı dili: İngilizce

ÜNVANI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Lisans Mezunu