

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARDİYOMİYOSİTLERDE HİPOKSİ İLE
İNDÜKLENEN BİKARBONAT TRANSPORT
REGÜLASYONUNUN İNCELENMESİ**

Gül ŞİMŞEK

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. H. Burak KANDİLCİ

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
21L0230010 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2023

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum 'Kardiyomiyositlerde hipoksi ile indüklenen bikarbonat transport regülasyonunun incelenmesi' başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Gül ŞİMŞEK
26.12.2022

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Anabilim Dalında Gül ŞİMŞEK tarafından hazırlanan
‘Kardiyomiyositlerdehipoksi ile indüklenen bikarbonat transport regülasyonunun
incelenmesi’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12.01.2023

Prof. Dr. Nuhan PURALI

Hacettepe Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. H. Burak KANDİLCİ

Ankara Üniversitesi

Raportör

Prof. Dr. H. Ogun ONARAN

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Mehmet UĞUR

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Gökür GÜLER ÖZTÜRK

Gazi Üniversitesi

Üye

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

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	iii
Kabul ve Onay	iv
İçindekiler	v
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Memeli Kardiyomiyositlerinde Hücre İçi pH (pH_i) Regülasyonu	1
1.2. HCO_3^- Transportörlerinin SLC4 (<i>Solute Carrier 4</i>) Gen Ailesi	2
1.3. Memeli Kardiyomiyositlerinde Bulunan NBC İzofomları	5
1.4. Memeli Kardiyomiyositlerinde NBC Proteinleri ve Regülasyonu	7
1.5. Hipoksi ve Hipoksik Koşullarda NBC Aktivitesi	9
1.6. Çalışmanın Amacı	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	13
2.1. HL-1 Hücre Kültürü	13
2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	13
2.3. Hipoksinin Oluşturulması	14
2.4. pH Transport Kinetiği ve pH_i Görüntülenmesi	16
2.4.1. pH_i Ölçümü ve Kalibrasyonu	16
2.4.2. Kullanılan Solüsyonlar	17
2.4.3. Sarkolemmal H^+ Akısının (J_H) Hesaplanması	18
2.5. Protein İzolasyonu ve Western Blot	21
2.6. HL-1 Hücrelerinden mRNA Ölçümü	22
2.6.1. RNA İzolasyonu	22
2.6.2. Primer Tasarımı	23
2.6.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	23
2.6.4. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)	24
2.7. İstatistik	24
3. BULGULAR	25
3.1. HL-1 Hücrelerinde Asit Atımının (J_H) Moleküler ve Fonksiyonel Karakterizasyonu	25
3.2. HL-1 Hücrelerinde İzosmotik Hiperkalemik Solüsyonların Bazal pH_i 'ye Etkisi	27
3.3. HL-1 Hücrelerinde HCO_3^- 'in Bazal pH_i 'ye Etkisi	30
3.4. Toplam Hücre İçi Tamponlamanın (β_{top}) Hesaplanması	31
3.5. Hipoksik Koşullarda HL-1 Hücrelerinde Asit Atımının Fonksiyonel Karakterizasyonu	33
3.6. HL-1 Hücrelerinde Hipoksinin NBC Akısına Etkisi	35
3.7. HL-1 Hücrelerinde Akut Anoksinin NBC Akısına Etkisi	39
3.8. HL-1 Hücrelerinde Normosik ve Hipoksik Koşullarda Hiperkalemik Solüsyonun J_H 'a Etkisi	42
3.9. HL-1 Hücrelerinde Hipoksinin ve Normokside DMOG İnkübasyonunun	

NBC Protein İzofomlarının Ekspresyonlarına Etkisi	46
3.10. HL-1 Hücrelerinde Normoksi ve Hipoksideki bazal pH_i 'daki Asit Transportunun Karşılaştırılması	47
4. TARTIŞMA	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
ÖZET	57
SUMMARY	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	65



ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösterici olan ve bu tez çalışmasının yapılması için gerekli desteği sağlayan değerli danışmanım Prof. Dr. H. Burak Kandilci'ye

Tez çalışmam sırasında katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet Uğur ve Prof. Dr. H. Ongun Onaran'a

Destek ve sevgilerini her zaman hissettiğim aileme teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AE	Anyon değiş-tokuşçusu
AM	Asetometil ester
ATP	Adenozintrifosfat
β	Beta
β_{CO_2}	CO_2/HCO_3^- bağımlı tamponlama kapasitesi
β_i	Hücre içi doğal tamponlama kapasitesi
β_{top}	Toplam hücre içi tamponlama kapasitesi
BTR	Sodyum bağımlı borat transportörü
bp	Baz çifti
Ca^{+2}	Kalsiyum iyonu
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
CBP/p300	cAMP bağlanma proteini
cDNA	Komplementer DNA
CBE	Klor bikarbonat değiş-tokuşçusu
CHE	Klor hidroksil değiş-tokuşçusu
Cl^-	Klor iyonu
Co^{+2}	Kobalt iyonu
CO_2	Karbondioksit
dk	Dakika
DIDS	4,4'-diizotiyosiyano stilben-2,2'-disulfonik asit
DMOG	Dimetiloksalilglisin
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DT	Sodyum ditionit
EDTA	Etilendiamintetra asetik asit
EGTA	Etilenglisoltetra asetik asit
ERK	Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz
FBS	Fetal sığır serumu

Fe^{+2}	Demir iyonu
FIH	Hifi inhibe eden faktör
H^+	Hidrojen iyonu
HCl	Hidroklorik asit
HCO_3^-	Bikarbonat iyonu
H_2CO_3	Karbonik asit
Hepes	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinethanosulfonik asit
Hif	Hipoksi ile indüklenen faktör
HRE	Hipoksiye duyarlı element dizileri
IP_3	İnozitol 1,4,5 trifosfat
IRBIT	İnozitol 1,4,5 trifosfat reseptör bağlanma proteinin
J_{H}	Asit atımı
K^+	Potasyum iyonu
KCl	Potasyum klorür
μM	Mikromolar
MCT	Monokarboksilat transportörü
MES	2-(N-morfolino) etanosülfonik asit
MgCl_2	Magnezyum klorür
ml	mililitre
mm	milimetre
mM	milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
N_2	Azot gazı
Na^+	Sodyum iyonu
NaCl	Sodyum klorür
Na_2HPO_4	Disodyum fosfat
NaHCO_3	Sodyum bikarbonat
NaH_2PO_4	Monosodyum fosfat
NaOH	Sodyum hidroksil
NBC	Sodyum bikarbonat ko-transportörü
NBCe1	Elektrojenik sodyum bikarbonat ko-transportörü 1 izoformu
NBCe2	Elektrojenik sodyum bikarbonat ko-transportörü 2 izoformu

NBCn1	Elektronötral sodyum bikarbonat ko-transportörü 1 izoformu
ng	Nanogram
NH ₃	Amonyak
NH ₄ ⁺	Amonyum iyonu
NH ₄ Cl	Amonyum klorür
NHE	Sodyum hidrojen değiş-tokuşçusu
Ni ⁺²	Nikel iyonu
nm	Nanometre
NMDG	N-metil-D-glukamin
OH ⁻	Hidroksil iyonu
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pH _i	Hücre içi pH
pH _o	Hücre dışı pH
PHD	Prolilhidroksilaz
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol 3 kinaz/protein kinaz B
PIP ₂	Fosfatidilinozitol 4,5 bifosfat
PO ₂	Parsiyel oksijen basıncı
PVDF	Polivinilidinflorür
Ub	Ubikutin proteini
VHL	VonHippelLindau
RNA	Ribo nükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SITS	4-asetamido-4'-izotiosiyano stilben-2,2'-disulfonik asit
SLC4	Katı taşıyıcı
SNARF	5-(ve-6)-karboksiseminaftarodaflor-1
TMB	Transmembran bölgesi
WNK/SPAK	Lizin kinazsız/steril prolil-alanin zengin kinaz

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Memeli kardiyomiyositlerinde pH_i regülasyonundan sorumlu transport proteinlerin çalışma prensiplerinin şematik gösterimi	2
Şekil 1.2. SLC4 ailesine ait proteinleri gösteren şema	4
Şekil 1.3. SLC4 gen ailesine ait transportörlerin üç boyutlu yapısını gösteren şekil	5
Şekil 1.4. Memeli kardiyomiyositlerinde bulunan NBC varyantlarının dizilimi	7
Şekil 1.5. Hücre içindeki Hif-1 α sinyali ve yıkımını gösteren şematik model	11
Şekil 2.1. Büyütülen hücrelerden deney grupları oluşturulmasının şematik gösterimi	14
Şekil 2.2. A) Hipoksi oluşturmak için kullanılan sistem. B) Küvet'ten doğrudan yapılan O_2 ölçümleri	15
Şekil 2.3. HL-1 hücrelerinde pH duyarlı SNARF-1 floresan boyasının <i>in situ</i> kalibrasyonu	17
Şekil 2.4. Hücrelerden asit akısı hesaplanmasında kullanılan denklemler	19
Şekil 2.5. Amonyum ayrışması sırasındaki reaksiyonlar ve tamponlama hesaplanmasında kullanılan varsayımlar	19
Şekil 2.6. β_i hesaplanmasında kullanılan denklemler	20
Şekil 2.7. β_{CO_2} hesaplanmasında kullanılan denklemler, varsayımlar ve CO_2/HCO_3^- ayrışma reaksiyonunun gösterimi	21
Şekil 3.1. HL-1 hücrelerinde NBC izoformları aracılı asit atımının gösterimi	27
Şekil 3.2. İzoozmotik hiperkalemik solüsyonların bazal pH_i 'ye etkisi	30
Şekil 3.3. HEPES tamponlu solüsyondan HCO_3^- tamponlu solüsyona geçildiğinde bazal pH_i 'nin değişimi	31
Şekil 3.4. β_i hesaplamasında kullanılan modelin denklemi	32
Şekil 3.5. HEPES tamponu içeren çözeltilerden (CO_2/HCO_3^- içermeyen) β_i hesaplanmasında kullanılan deneysel protokol	33
Şekil 3.6. HL-1 hücrelerinde hipoksinin hücreden Na^+ dan bağımsız asit atımına ve doğal tamponlamaya etkisi	35
Şekil 3.7. HL-1 hücrelerinde NBC akısının gösterimi ve hipoksinin etkisi	38

Şekil 3.8. Akut anoksida NBC akısının elde edilmesi	42
Şekil 3.9. Normoksi ve hipoksida hiperkalemik solüsyonun J_H üzerine etkisi	45
Şekil 3.10. HL-1 hücrelerinde 48 saat hipoksi sonrası NBC izoformlarının ekspresyonu	47
Şekil 3.11. HL-1 hücrelerinde hipoksida bazal pH_i 'dan sorumlu asit atan protein izoformları arasındaki rol değişimi	48
Şekil 4.1. HL-1 hücrelerinde NBC izoformlarının hipoksi veya DMOG ile regülasyon mekanizmasını gösteren model	54



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Western blot için kullanılan jeller	22
Çizelge 2.2. Deneylerde kullanılan primerlerin sekans ve çoğalttıkları baz çifti uzunlukları	23

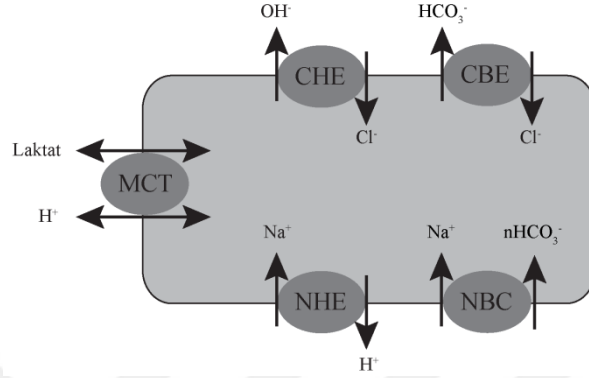


1.GİRİŞ

1.1. Memeli Kardiyomiyositlerinde Hücre İçi pH (pH_i) Regülasyonu

Kardiyomiyositlerde metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen iyonu (H⁺) oldukça reaktiftir ve kardiyak fonksiyonun sürdürülmesi için hücreden hızla uzaklaştırılması gerekir. H⁺ aktivitesinin 10 tabanına göre negatif logaritması pH olarak tanımlanır ve asidite logaritmik pH skalasında ölçülür (Vaughan-Jones ve ark., 2009). Kasılma, uyarılma ve aritmi gibi çeşitli süreçleri etkileyen pH_i, kardiyak fonksiyonun önemli bir regülatördür (Vaughan-Jones ve ark., 2006a). Kalp hücrelerinde pH_i, sarkolemmal iyon transportörleri aracılığıyla membrandan H⁺, hidroksil (OH⁻) ya da bikarbonat (HCO₃⁻) iyonlarının geçişi ile regüle edilir ve bu sayede kararlı durum pH_i 7,1-7,3 arasında tutulur (Ch'en ve ark., 2008; Vaughan-Jones ve ark., 2006a). Transportör aracılığıyla hücre içine HCO₃⁻ anyonunun alınması hücre içindeki H⁺'nu nötralize ederken bu olayın eşdeğer olarak tersi OH⁻ 'nun hücreden uzaklaştırılması H⁺ oluşmasına denktir. Bu reaksiyonlar kimyasal olarak H⁺'nun doğrudan hücreden atılması ya da alınmasına eşdeğerdir (Swietach ve Vaughan-Jones, 2005; Vaughan-Jones ve ark., 2009). Memeli kardiyomiyositlerinde asit uzaklaştıran proteinler Na⁺ bağımlı, asit yükleyiciler ise Cl⁻ bağımlıdır. pH_i aside kaydıgında, başlıca Na⁺/H⁺ değiş-tokuşçusu (NHE), iyonik eş-değeri aracılı asit atımı yapan Na⁺/HCO₃⁻ ko-transportörü (NBC) ve ATP bağımlı H⁺ dışarı atan pompalar aracılığıyla fazla asit hücreden uzaklaştırılır (Şekil 1.1) (Ch'en ve ark., 2008; Swietach ve Vaughan-Jones, 2005; Vaughan-Jones ve ark., 2006a). pH_i'nin alkaliye kaydıgı durumlarda ise Cl⁻/HCO₃⁻ değiş-tokuşçusu (CBE) ve Cl⁻/OH⁻ değiş-tokuşçusu (CHE) H⁺-eşdeğer asit yüklenmesinden sorumludur (Ch'en ve ark., 2008; Yamamoto ve ark., 2005). Hücre membranında bulunan bu transportörlerin ana regülatörü pH_i'dir. NHE ve NBC proteinleri hücre içine asit yüklendiğinde stimule olurken Cl⁻ bağımlı asit yükleyen proteinler hücre içi alkali olduğunda aktive olmaktadır. Cl⁻ bağımlı asit yükleyiciler ile Na⁺ bağımlı asit uzaklaştıran proteinlerin aktiviteleri bazal pH_i civarında düşüktür (Vaughan-Jones ve ark., 2006b). Glikolitik aktivitenin yüksek olduğu durumlarda laktat-H⁺ ko-transportörü (monokarboksilat transportörü, MCT) de pH_i regülasyonunda rol oynamaktadır

(Vaughan-Jones ve ark., 2006a). Ayrıca, bu proteinlerin aktivitesi hücre dışı pH'ya (pH_o) bağlı olarak da regüle edilmektedir. pH_o aside kaydıgında asit atan transportörlerin aktivitesi inhibe olurken asit yükleyici protein aktiviteleri stimule olmaktadır.



Şekil 1.1. Memeli kardiyomiyositlerinde pH_i regülasyonundan sorumlu transport proteinlerinin çalışma prensiplerinin şematik gösterimi. Oklar iyonların transport yönlerini, "n" sayısı transport stokiyometrisini temsil etmektedir.

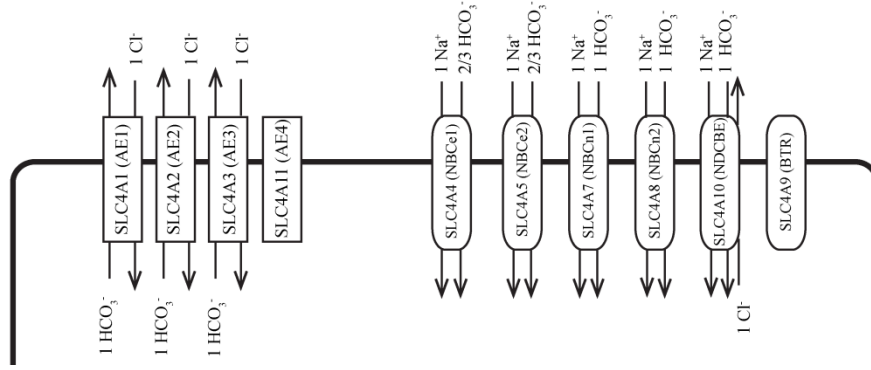
pH_i regülasyonundan sorumlu transportörlerin aktiviteleri membran potansiyelinden etkilenebilir (Vaughan-Jones ve ark., 2009). Genel kabule göre, NHE1 elektronötraldir. NBC'lerin ise iki elektrojenik (NBCe1, NBCe2) ve bir adet elektronötral (NBCn1) izoformu olduğu gösterilmiştir (Romero ve ark., 2004; Yamamoto ve ark., 2005). NBCe1 aktivitesi hücre içine net anyon girişine yol açtığından membran depolarizasyonu NBCe1 aktivitesini artırır (Romero ve ark., 2013). Memeli kardiyomiyositlerinde asit atımının yaklaşık yarısından NHE1 proteini geriye kalanından ise NBC proteini sorumludur (De Giusti ve ark., 2013; Lagadic-Gossman ve ark., 1992).

1.2. HCO₃⁻ Transportörlerinin SLC4 (*Solute Carrier 4*) Gen Ailesi

NBC ilk kez 1983 yılında Boron ve Boulpaep tarafından renal proksimal tübül epitelyal hücrelerinde keşfedilmiştir (Boron ve Boulpaep, 1983). Bu çalışmada pH_i , membran potansiyeli ve hücre içi Na⁺ aktivitesi ölçümlerine dayanarak membranda bulunan bu proteinin elektrojenik olduğu gösterilmiştir. 1997 yılında ilk

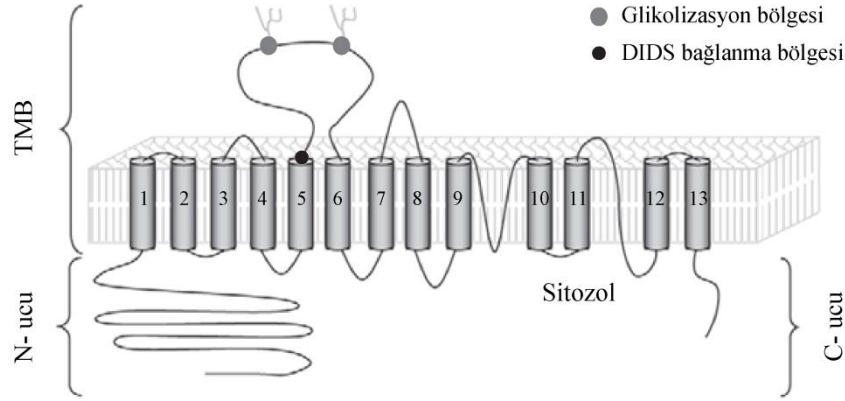
kez NBCe1 olarak bilinen transportörün komplementer DNA'sı (cDNA) klonlanmıştır (Romero ve ark., 1997). Bu çalışmayı diğer izoformların Na^+ bağımlı HCO_3^- transportörlerinin klonlanması ve karakterize edilmesi izlemiştir (Boron ve ark., 2009).

NBC'ler, bikarbonat transportör ailesi olarak da bilinen SLC4 gen ailesine ait integral membran proteinleridir. On üyesi bulunan bu gen ailesi (SLC4A1-5 ve SLC4A7-11), fonksiyonel olarak Cl^- bağımlı HCO_3^- değiş-tokuşçuları ve Na^+ bağımlı HCO_3^- ko-transportörleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Gorbatenko ve ark., 2014; Romero ve ark., 2013). Cl^- - HCO_3^- değiş-tokuşçuları aynı zamanda anyon değiş-tokuşçuları AE1-4 (SLC4A1-3 ve SLC4A11) olarak da bilinir ve pH_i alkaliye kaydığında hücreye asit yüklenmesinde görev alırlar. Na^+ bağımlı HCO_3^- ko-transportörleri; NBCe1, NBCe2, NBCn1, NBCn2, Na^+ aracılı Cl^- - HCO_3^- değiş-tokuşçusu (NDCBE) ve Na^+ bağımlı borat transportörü (BTR) (sırası ile SLC4A4-5, SLC4A7-10) proteinlerini içerir. Asit uzaklaştırılmasından sorumlu olan ikinci grup ko-transportörler hücre içi ve vücut pH 'sının regülasyonunda önemli rol oynamaktadır (Boron ve ark., 2009). AE4 ve BTR proteinlerinin fonksiyonları ise çok iyi bilinmemektedir (Şekil 1.2). Na^+ bağımlı transportörlerden iki tanesi (NBCe1 ve NBCe2) elektrojenik, diğer Na^+ bağımlı transportörler ve anyon değiş-tokuşçuları elektronötraldir (Lu ve ark., 2021; Romero ve ark., 2013). Cl^- - HCO_3^- değiş-tokuşçuları (AE1-3) amino asit düzeyinde ~%53-56 birbirleri ile benzerlik göstermektedir. Elektrojenik NBCe1 ve NBCe2 ~%53 oranında birbirleriyle ve ~%28-34 oranında AE1-3 ile benzerdir. Elektronötral NBCn1 ise ~%71-76 oranında diğer elektronötral NBC'ler ile, ~%30-34 AE1-3 ile ve ~%39-50 elektrojenik NBC'ler ile benzerlik gösterir. Bu proteinlerin fizyolojik fonksiyonları da birbirine yakındır (Romero ve ark., 2004).



Şekil 1.2. SLC4 ailesine ait proteinleri ve stokiyometrisini gösteren şema. Oklar iyonların transport yönlerini göstermektedir. Gorbatenko ve ark., 2014 makalesinden adapte edilmiştir.

SLC4 gen ailesine ait tüm integral membran proteinleri HCO_3^- ya da karbonat (CO_3^{2-}) taşır. SLC ailesinin tüm üyelerinin hücre içerisinde bulunan uzun amino (N-) ucu ile kısa karboksil (C-) ucu vardır ve bu uçlar, 10-14 transmembran segmenti ile birbirinden ayrılır (Şekil 1.3). Tüm SLC4 gen ailesi üyeleri sülfonamid (S0859) veya disülfonik stilben türevleri (4-asetamido-4'-izotiosiyano stilben-2,2'-disülfonik asit (SITS) ve 4,4'-diizotiosiyano stilben-2,2'-disülfonik asit (DIDS) gibi ile inhibe olmaktadır. AE1 ve NBCe1 için, bu maddelerin 5. transmembran bölgesinin (TMB) hücre dışı tarafındaki rezidüsü ile etkileşerek inhibe ettiği düşünülmektedir. Bir diğer benzerlik ise tüm üyelerin glikolize olmasıdır. AE1'in 4. kıvrımda, diğer tüm üyelerin ise 3. kıvrımda N-glikolize olduğu ileri sürülmektedir (Romero ve ark., 2013) (Şekil 1.3). Glikolizasyonun ko-transportörlerin elektrojenitesinde önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2015).



Şekil 1.3. SLC4 gen ailesine ait transportörlerin üç boyutlu yapısını gösteren şekil (Boron ve ark., 2009 makalesinden uyarlanmıştır.). Şekilde glikolizasyon bölgeleri ve genel olarak SLC4 inhibitörlerinin (DIDS) bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. TMB: transmembran bölgeleri (1-13), DIDS: 4,4'-diizotiyosiyano stilben-2,2'-disulfonik asit.

1.3. Memeli Kardiyomiyositlerinde Bulunan NBC İzofomları

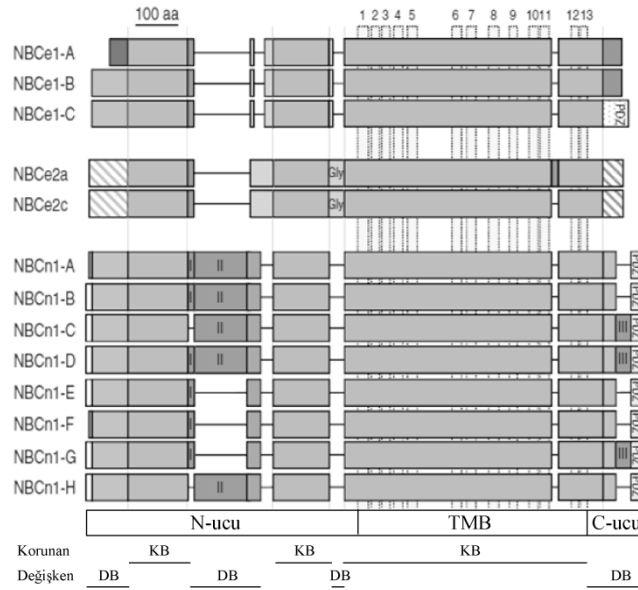
NBC, kalpte ilk kez koyun purkinje liflerinde ve izole kobay ventrikül hücrelerinde elektronötral transportör olarak gösterilmiştir (Dart ve Vaughan-Jones, 1992; Lagadic-Gossman ve ark., 1992). Ancak, daha sonra yama kısıkaçı ve epifloresan metodları ile farklı türlerdeki (kedi, sıçan, tavşan ve kobay) ventrikül hücrelerinde yapılan çalışmalarda NBC'nin $1 \text{ Na}^+ : 2 \text{ HCO}_3^-$ stokiyometri ile çalışan elektrojenik bir varyantı olduğu tespit edilmiştir (Aiello ve ark., 1998; Yamamoto ve ark., 2005). Yama kısıkaçı metodu veya hiperkalemik solüsyon kullanılarak hücre membranı depolarize edildiğinde tavşan haricindeki diğer memeli türlerinde bazal pH_i 'nin geri dönüşlü bir şekilde alkaliye kaydığı ve S0859'nun bunu önlediği gösterilmiştir (Yamamoto ve ark., 2005). Ayrıca, HCO_3^- içeren solüsyonda kardiyomiyosit dinlenim membran potansiyelinin, HCO_3^- 'siz ortama göre yaklaşık 2-3 mV kadar hiperpolarize olduğu ve aksiyon potansiyeli süresinin yaklaşık %30-35 oranında kısalttığı da gösterilmiştir (Aiello ve ark., 1998; Villa-Abrille ve ark., 2007). SLC4A4 geni ile kodlanan NBCe1 (diğer ismiyle NBC1), 1035-1079 arası amino asit uzunluğundadır. N-ucu 424-468 arası, C-ucu 90-105 arası amino asit ve TMB 521 rezidü içerir (Boron ve ark., 2009; Romero, 2001). N-ucu pH_i -duyarlılığında, C-ucu protein-protein etkileşimi sonucu aktivite regülasyonunda rol

alır (Lu ve ark., 2021). NBCe1 proteini membrandan 1 Na⁺'a karşılık 2 veya 3 HCO₃⁻ geçirmektedir. Stokiyometrisi ilgilenilen dokuda eksprese olan varyanta bağlı olarak değişmektedir (Aiello ve ark., 1998; Boron ve Boulpaep, 1983). Bugüne kadar dokudaki ekspresyonlarına göre değişiklik gösteren üç tane NBCe1 ortoloğu (NBCe1-A, -B, -C) tanımlanmıştır. NBCe1-A ilk kez salamander renal proksimal tübül hücrelerinde tanımlanan NBCe1 varyantıdır ve böbrekte (kNBC1) eksprese olur. Kalp (hhNBC1) ve pankreasta (pNBC1) eksprese olan NBCe1-B en yaygın bulunan varyanttır. NBCe1-B'nin N-ucunda bulunan 85 amino asit, NBCe1-A'nın N-ucunda bulunan 41 amino asit ile yer değiştirmiştir (*alternative splicing*). NBCe1-C ise çoğunlukla beyinde eksprese olur. NBCe1-C'nin C-ucundaki 61 amino asit NBCe1-B'nin C- ucundaki 46 amino asit ile yer değiştirmiştir (Şekil 1.4) (Boron ve ark., 2009; Lu ve ark., 2021; Romero ve ark., 2004). Ek olarak, sadece farelerde bulunan NBCe1'in iki farklı varyantı (NBCe1-D, -E) daha tanımlanmıştır ve diğer varyantlardan farklı olarak N- ve C-ucunda toplam 27 amino asit eksiktir (Lu ve ark., 2021).

SLC4A5 geni ile kodlanan NBCe2 (diğer ismiyle NBC4) ilk kez sıçan kalbinde mRNA düzeyinde gösterilmiştir. Protein 1074 amino asit uzunluğundadır ve diğer NBC gen ailesi üyelerinden farklı olarak glisinden zengin bölge (438-485 amino asitleri arasında) içerir (Pushkin ve ark., 2000). NBCe1'de olduğu gibi NBCe2'nin stokiyometrisi de dokuya göre farklılık gösterir. NBCe2 karaciğerde yüksek miktarda bulunur ancak beyin, böbrek, kalp, mide ve iskelet kasında da eksprese olduğu gösterilmiştir (Pushkin ve ark., 2000). NBCe2 insan kardiyak hücrelerinde bulunmaktadır (Yamamoto ve ark., 2007). NBCe2'nin altı tane varyantı tanımlanmıştır. Ancak bunlardan sadece iki tanesinin (NBCe2-A ve NBCe2-C) tam TMB segmenti içerdiği gösterilmiştir. NBCe2-A'nın NBCe2-C'den farklı olarak 11 ve 12 TMB segmenti arasında 16 amino asit fazla içerdiği tahmin edilmektedir (Şekil 1.4) (Boron ve ark., 2009).

SLC4A7 geni ile kodlanan NBCn1 (diğer ismiyle NBC3) 1:1 oranında Na⁺:HCO₃⁻ ko-transportu yapan elektronötröl NBC izoformudur. İlk kez moleküler düzeyde insanda gösterilmiştir (Choi ve ark., 2000). Diğer SLC4 gen ailesi

üyelerinden farklı olarak NBCn1 varyantları iki alternatif N-ucunun ve üç farklı kasetin bulunduğu sekiz adet varyantının (NBCn1-A-H) olduğu ileri sürülmektedir (Şekil 1.4) (Boron ve ark., 2009). Bu varyantların dağılımları henüz tam olarak bilinmemesine rağmen NBCn1'in kalp, beyin, karaciğer ve böbrek gibi birçok memeli dokusunda eksprese olduğu bildirilmiştir (Boron ve ark., 2009; Choi ve ark., 2000).



Şekil 1.4. Memeli kardiyomiyositlerinde bulunan NBC varyantlarının dizilimi (Boron ve ark., 2009 makalesinden adapte edilmiştir). KB: korunan bölgeler, DB: değişken bölgeler, TMB: transmembran bölgesi, Gly: glisinden zengin bölge, PDZ: PDZ proteini bağlanma motifi, barlar arasında bulunan yatay çizgi sekansın bulunmadığı bölgeleri temsil etmektedir. Aynı gri tonları tüm varyantlarda ortak olan bölgeleri, farklı gri tonları ise değişken bölgeleri göstermektedir. I, II ve III NBCn1 varyantı için bilinen kaset bölgeleridir.

1.4. Dokulardaki NBC Proteinlerinin Fizyolojik/Patofizyolojik Rolü ve Regülasyonu

NBC proteini, pH_i regülasyonunun yanı sıra hücre hacmi kontrolünde, hücre içi iyon homeostasisının sağlanmasında, hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerinde kritik önem taşımaktadır (Wang ve ark., 2014). Bu proteinin HCO_3^- , Na^+ ve Cl^- 'nin transepitelyal taşınım süreçlerinde ve vücutta elektrolit dengesinin sağlanmasında görev aldığı bildirilmiştir (Boron ve ark., 2009; Liu ve ark., 2015).

Memeli kardiyomiyositlerinde NBC aktivitesinin farklı ligandlarla regüle olduğu gösterilmiştir. Kedi kardiyomiyositlerinde anjiotensin II'nin NBC izoformları üzerinde zıt etkiler oluşturduğu öne sürülmüştür. Anjiotensin II reaktif oksijen türleri (ROS) ve ERK bağımlı mekanizma ile NBCn1 izoformunu stimüle ederken, p38 kinaz aracılı NBCe1 inhibisyonu yaptığı bildirilmiştir (De Giusti ve ark., 2009; De Giusti ve ark., 2010). Ancak net etki olarak düşünüldüğünde, sıçan ve kedi ventrikülünde yapılan çalışmalarda anjiotensin II'nin AT-1 reseptörü üzerinden, ERK yolağı aracılığıyla NBC stimülasyonunun hâkim etki olduğu gösterilmiştir (Baetz ve ark., 2002; De Giusti ve ark., 2009). Aldesteronun, sıçan ventrikülünde PI3K/AKT yolağı üzerinden NBCe1'i stimüle ettiği gösterilmiştir (Orlowski ve ark., 2016). Kobay ventrikülünde $\beta 1$ adrenerjik agonistlerin (izoprenalin) stimülasyona, $\alpha 1$ adrenerjik agonistlerin (fenilefrin) inhibisyonu sebep olduğu rapor edilmiştir (Lagadic-Gossman ve Vaughan-Jones, 1993). Ek olarak, kedi ventrikülünde hücre dışında bulunan dördüncü kangala fonksiyonel antikor bağlanması NBCe1'i stimüle ederken üçüncü kangala fonksiyonel antikor bağlanması inhibe etmiştir (De Giusti ve ark., 2011). Diğer dokularda yapılan çalışmalarda NBC proteinlerinin regülasyon yolları daha ayrıntılı biçimde aydınlatılmıştır. Oositlerde NBCe1-B'nin N-ucuna inozitol 1,4,5 trifosfat reseptör bağlanma proteinin (IRBIT) doğrudan bağlanması veya fosfatidilinozitol 4,5 bifosfatın (PIP_2) inozitol 1,4,5 trifosfat (IP_3)/ $[Ca^{+2}]$ yolağı aracılı transportör aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Shirakabe ve ark., 2006; Thornell ve ark., 2012). Ayrıca, NBCe1-B hücre içerisindeki iyonlar aracılığıyla da regüle olmaktadır. HEK-293 hücrelerinde transportörün hücre içindeki kıvrımına Mg^{+2} un bağlanması aktivasyonuna yol açarken, HeLa hücrelerinde hücre içi Cl^- artışının inhibisyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Shcheynikov ve ark., 2015; Yamaguchi ve Ishikawa, 2012). Oositlerde NBCe1 proteinin Thr49 bölgesinden lizin kinazsız/steril prolil-alanin zengin kinaz (WNK/SPAK) kinazı aracılı fosforilasyonunun transportörü aktive ettiği, IRBIT ile defosforilasyonunun ise inhibe ettiği gösterilmiştir (Hong ve ark., 2013). Benzer şekilde proksimal tübül hücrelerinde C-ucunun Ser982 bölgesinden fosforilasyonunun NBCe1'in stokiyometrisini azalttığı gösterilmiştir (Gross ve ark., 2001). NBCn1'in ise, sıçan mesenterik arter düz kas hücrelerinde kalsinörin, oositlerde IRBIT ve PIP_2 , HEK-293 hücrelerinde de siklik adenzin monofosfat (cAMP) aracılı aktive olduğu

bildirilmiştir (Danielsen ve ark., 2013; Hong ve ark., 2013; Loisel ve ark., 2004; Thornell ve Bevensee, 2015).

Kalpte NBC aktivite ve ekspresyonunun iskemi reperfüzyon hasarında, kalp yetmezliğinde ve kalp hipertrofisi gibi çeşitli fizyopatolojiler ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (Khandoudi ve ark., 2001; Vairamani ve ark., 2018; Yamamoto ve ark., 2007). Sıçan ventrikülünde yapılan çalışmada NBCe1'in inhibe edilmesi iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruduğu, NHE1 ve NBC'nin birlikte inhibe edilmesinin ise reoksijenasyon sırasında hiperkontraktörü engellediği rapor edilmiştir (Lu ve ark., 2021; Wang ve ark., 2014). İzole sıçan ventrikülünde yapılan çalışmada, hipertrofide NBCe1 ve NBCn1 izoformlarının mRNA ve protein seviyesinin artışı ile birlikte toplam NBC akısının da arttığı gösterilmiştir (Yamamoto ve ark., 2007). Kalp yetmezliği bulunan hastalardan alınan kalp dokusunda elektrojenik NBC'nin overeksprese olduğu gözlenmiştir (Khandoudi ve ark., 2001). Hipoksinin eşlik ettiği iskemik ve dilate insan kalp hücrelerinde NBCe1 mRNA miktarı artarken NBCn1 mRNA miktarının değişmediği rapor edilmiştir (Orlowski ve ark., 2012). Ek olarak, kalp dışında NBC disfonksiyonu, merkezi sinir sistemi hastalıkları (epilepsi, mental yorgunluk, migren, otizm), görme anomalileri (körlük, katarakt, retina dejenerasyonu), kırmızı kan hücresi hastalıkları (hemolitik anemi), sağırılık, meme kanseri, üreme bozuklukları ve kemik displazisi ile ilişkilendirilmektedir (Boron ve ark., 2009; Liu ve ark., 2015).

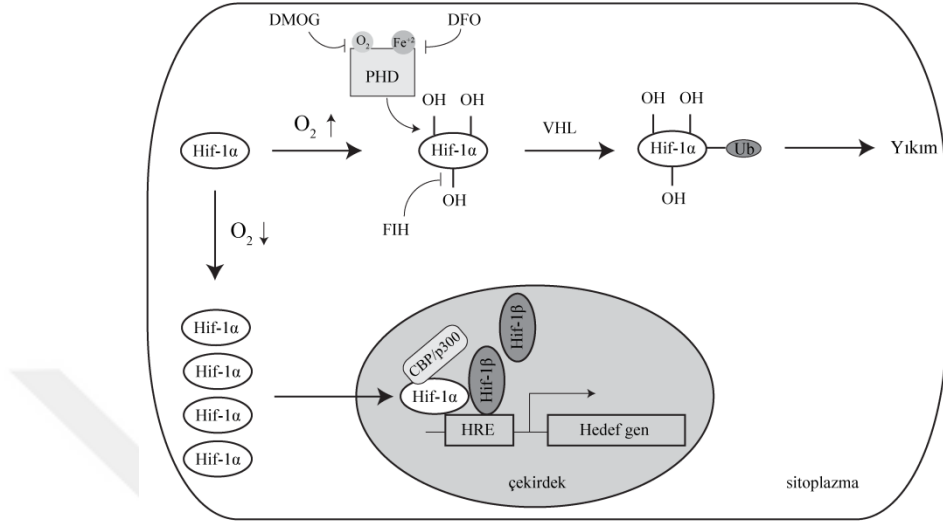
1.5. Hipoksi ve Hipoksik Koşullarda NBC Aktivitesi

Hipokside hücre içinde biriken hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktörü (Hif) hipoksinin ana etkisinden sorumlu tutulmaktadır. Hif proteini, Hif- α ve Hif-1 β alt ünitelerinden oluşur. Hif- α 'nın, Hif-1 α , Hif-2 α ve Hif-3 α olmak üzere üç izoformu vardır (Ke ve Costa, 2006). Hif- α 'ların ortamda oksijen azaldığında/olmadığında çekirdeğe transloke olarak çekirdekteki Hif-1 β ile birleştiği ileri sürülmektedir. Bu heterodimer, genlerin promotor bölgelerindeki hipoksiye duyarlı element (Hypoxia Response Element; HRE) olarak adlandırılan nükleotid

dizilerine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonlarını etkiler (Weidemann ve Johnson, 2008). Hif-1 proteini ilk defa Semenza ve Wang tarafından eritropoetin çalışmasında belirlenmiştir (Semenza ve Wang, 1992). Hif-1 α proteininin keşfini Hif-2 α 'nın bulunması izlemiştir. Hif-2 α 'nın amino asit dizisi %48 oranında Hif-1 α ile benzerlik gösterir. Ancak, Hif-1 α , kalp dahil birçok dokuda yaygın olarak bulunurken, Hif-2 α daha çok akciğer ve endotel tabakasında eksprese olmaktadır. Hif-3 α 'nın ise kornea epitelyum dokusunda eksprese olduğu ve transkripsiyonel aktivator olarak rol oynadığı bildirilmiştir (Hubbi ve Semenza, 2015; Ke ve Costa, 2006). Hif-1 proteini, Hif-1 α ve Hif-1 β alt ünitelerinden oluşan bir heterodimeridir. Hif-1 β , hücrelerde yapısal olarak eksprese olur ve mRNA/protein miktarı oksijen konsantrasyonundan bağımsızdır. Benzer şekilde Hif-1 α yapımı da oksijen miktarından etkilenmez. Ancak normoksik koşullarda prolilhidroksilaz (PHD) enzimi aracılığıyla prolin rezidülerinden hidroksillenir. Bu durum, Hif-1 α ile von Hippel Lindau (VHL) ubikutin E3 ligaz kompleksine bağlanmasına ve ubikutin takarak proteosomda yıkılmasına yol açar (Hubbi ve Semenza, 2015). Hipoksik koşullarda ise hidroksilasyon reaksiyonu inhibe olur ve Hif-1 α proteosomal yıkımdan kaçarak sitoplazmada birikir. Daha sonra çekirdeğe transloke olur ve Hif-1 β ile birleşerek transkripsiyonu regüle eder (Şekil 1.5) (Ke ve Costa, 2006; Weidemann ve Johnson, 2008).

Prolilhidroksilaz enzimi, katalitik merkezinde Fe⁺² içeren ve 2-oksoglutaratı substrat olarak kullanan bir dioksijenazdır. Bir oksijen atomunu Hif-1 α prolin rezidülerinin hidroksillenmesinde diğerini 2-oksoglutarat ile reaksiyona girerek CO₂ ve suksinat oluşturmada kullandığı düşünülmektedir. Hipoksik koşullarda prolilhidroksilaz enzimi inhibe olmakta ve Hif-1 α miktarı eksponansiyel olarak artmaktadır. PHD enzimi normoksik koşullarda demir şelatörleri (deferoksamin, deferipron), Fe⁺² yerine bağlanabilecek diğer iki değerlikli iyonlar (Co⁺², Ni⁺²) varlığında ya da 2-oksoglutarat analogu dimetiloksalilglisin (DMOG) ile farmakolojik olarak da inhibe edilebilir (Şekil 1.5) (Hubbi ve Semenza, 2015; Weidemann ve Johnson, 2008). Hif-1 α 'nın asparajin hidroksilasyonu Hif'i inhibe eden faktör (factor inhibiting Hif, FIH) olarak adlandırılır. Bu hidroksilasyon

CBP/p300'un Hif'e bağlanmasını engelleyerek transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder (Ke ve Costa, 2006; Weidemann ve Johnson, 2008).



Şekil 1.5. Hücre içindeki Hif-1α sinyali ve yıkımını gösteren şematik model. PHD: prolilhidroksilaz, VHL: Von Hippel Lindau, Ub: ubikutin, FIH: Hif'i inhibe eden faktör, DMOG: dimetiloksalilglisin, HRE: hipoksiye duyarlı element, Hif: Hipoksi ile indüklenen faktör, CBP/p300: cAMP bağlanma proteini.

Kardiyovasküler hastalıklarda (miyokard enfarktüsü) hipoksi sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Hipoksida hücrede metabolik inhibisyon ile birlikte pH_i'nin aside kaydığı bilinmektedir (Vaughan-Jones ve ark., 2009). Kardiyomiyositlerde ve çeşitli kanser hücre serilerinde akut/kronik hipoksik koşullarda NHE1 akısı inhibe olmaktadır (Hulikova ve ark., 2013; Kandilci ve ark., 2020; Simsek ve ark., 2019). Farklı süre ve şiddetteki hipoksinin NBC ekspresyon ve akısı üzerine etkileri de çeşitli kanser hücre serilerinde araştırılmıştır. Bu çalışmalarda genellikle çoğu hücrede hipoksi ile NBC mRNA/protein ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Glioblastoma hücrelerinde kimyasal hipoksi (200 µM CoCl₂, 24 saat) ile NBCE1 protein seviyesi ve akısının arttığı ve bu artışın Hif-1α protein seviyesi ile korele olduğu gösterilmiştir (Giannaki ve ark., 2022). Meme kanseri hücrelerinde hipoksi (%0,5-1 O₂, 48 saat) ile NBCE1 ve NBCE2 protein seviyelerinin arttığı ve S0859 ile bu artışın inhibe olduğu rapor edilmiştir (Carroll ve ark., 2022). Benzer şekilde, LNCaP hücrelerinde (prostat kanseri hücre serisi) hipoksinin (%1 O₂, 96 saat) NBCE1 protein seviyesi ve akısını artırdığı

gösterilmiştir (Li ve ark., 2021). Astrositlerde hipoksi ile ilişkilendirilen iskeminin (iskemik solüsyon kullanılarak oluşturulan) NBCe1 mRNA ve protein seviyesinin arttırdığı görülmüştür (Yao ve ark., 2016). Buna karşılık hipokside NBC proteinlerinin bazı hücrelerde değişmediği de gösterilmiştir. On farklı tümör hücresinde yapılan çalışmada hipoksi (%0,1 O₂, 72 saat) hücrelerin çoğunda NBC mRNA miktarı etkilenmemiştir (Mcintyre ve ark., 2016). Benzer şekilde çeşitli kanser hücre serilerinde yapılan bir diğer çalışmada hipoksinin (%2 O₂, 48 saat) NBC akısını etkilemediği bildirilmiştir (Hulikova ve ark., 2013). Tüm bu çalışmaların aksine 28 gün boyunca kesintili hipokside (%1 O₂, 2 dakika; %21 O₂, 3 dakika; 8 saat/gün) tutulan farelerin merkezi sinir sistemi hücrelerinde NBC protein miktarının azaldığı ileri sürülmüştür (Douglas ve ark., 2003). Bugüne kadar kalpte veya kalp kökenli hücrelerde hipoksinin NBC akısına etkisi araştırılmamıştır.

1.6. Çalışmanın Amacı

Kardiyak dokuda hipoksi/iskemi, glikoliz artışı ve laktik asit birikimi yaparak pH_i'nin aside kayması ile sonuçlanır. NBC proteinleri hücreden fazla asidi uzaklaştırırken asit atımına Na⁺'nın içeri alınması da eşlik eder. Hücre içinde artan Na⁺ konsantrasyonu, Na⁺/Ca⁺² değiş tokuşçusu aracılığıyla hücreden atılırken bu sefer Ca⁺² aşırı yüklenmesine yol açar (Lazdunski ve ark., 1985). Bu durum aritmi ya da miyokard hasarı ile sonuçlanabilir (Lu ve ark., 2021; Vaughan-Jones ve ark., 2006b; Wang ve ark., 2014). Dolayısıyla hipoksik koşullarda NBC aktivitesini regüle eden yolların aydınlatılması miyokard hasarın önlenmesi veya sınırlandırılması adına yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya çıkmasına temel oluşturacaktır. Kalp hücrelerinde NBCe1 ve NBCn1 izoformlarının eksprese olduğu bilinmektedir. Memeli kardiyomiyositlerinde veya kardiyomiyosit kökenli hücrelerde hipoksik koşullarda bugüne kadar NBC proteinlerinin ekspresyonu ve akısı hakkında yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, fare atrium kökenli HL-1 hücrelerinde uzun dönem hipoksi ile indüklenen HCO₃⁻ akı artışından sorumlu olan NBC izoformu ve mekanizmasının iyon görüntüleme ve biyokimyasal yöntemler ile araştırılması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

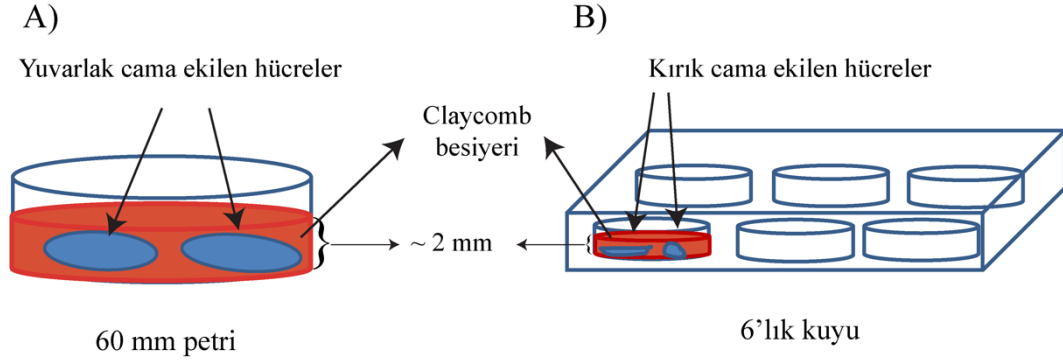
2.1. HL-1 Hücre Kültürü

Fare atrium kökenli HL-1 hücreleri (spontan atım göstermeyen), önceden jelatin (%0,02) ve fibronektin (%0,5) ile kaplanan flask ya da 6'lı kuyulara ekildi. Hücreler, %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 L-Glutamin (200 mM), %1 Penisilin (10000 U/ml) –Streptomisin (10000 µg/ml) ve %1 Noradrenalin (10 mM) içeren Claycomb besiyeri (Sigma) içerisinde standart kültür koşullarında (%5 CO₂, %95 nem, 37°C) büyütüldü. %80-100 konfluense ulaşan hücreler %0,05 tripsin-EDTA ile pasajlandı. Pasajlanan hücrelerden devam ve deney grupları oluşturuldu. Kalan hücreler ise %95 FBS, %5 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren besiyeri içerisinde kademeli olarak donduruldu.

2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Western blot/Q-PCR deneyleri için oluşturulan deney gruplarında daha fazla hücre elde etmek amacıyla hücreler yuvarlak camlarda büyütüldü. Hücreler uygun konfluense (~%60-70) ulaştıktan sonra besiyeri tazelandı. Yuvarlak camlarda büyütülen hücreler, deney için standart miktarda (2 ml) besiyeri içeren 6'lık kuyulara aktarıldığında 48 saat kesintisiz hipoksi sonrasında besiyerinin pH'sı aside (pH ~6,15) kaydı. Normoksik kontrol grubunda ise bu durum gözlenmedi (pH ~7,4). Hipoksizde deney grupları arasındaki şartları eşitleyerek sadece hipoksinin etkisini gözlemlemek adına hücrelere daha fazla besiyeri (6 ml) konuldu. Böylece yüksek tampon hacmi oluşturularak hipoksizde anaerobik hücre metabolizmasının (laktik asit) besiyeri pH'sını asite kaydırmasının önüne geçildi. Daha fazla eklenen besiyerinin kuyulardaki standart besiyeri derinliğini (2 mm) artırmaması ve böylece gaz difüzyonunun bozulmaması için de hücreler 60 mm geniş petri kaplara, 2 yuvarlak cam olacak şekilde deneye alındı (Şekil 2.1A). Transport akı deneyleri için ise hücreler kırık camlara ekildi. Uygun konfluense ulaşan hücreler 2 kırık cam/kuyu olacak şekilde taze besiyerinde (2 ml) deneye alındı. Kırık cama ekilen hücrelerde

hipoksi ve normoksik kontrol koşullarında besiyeri pH'sında aside kayma gözlenmedi (Şekil 2.1B).

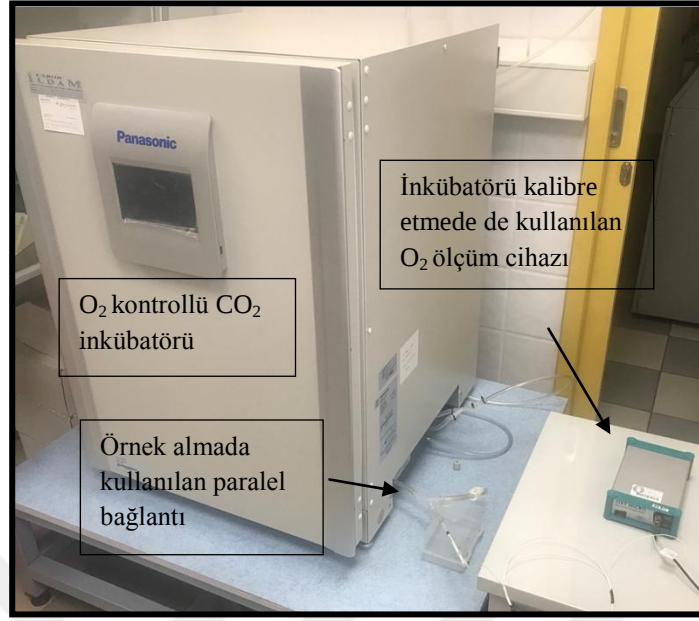


Şekil 2.1. Büyütülen hücrelerden deney grupları oluşturulmasının şematik gösterimi. Hücreler moleküler deneyler için 60 mm petride, 6 ml'lik besiyeri içerisinde 2 yuvarlak camda (A) veya total H^+ akışı deneyleri için 6'lık kuyularda, 2 ml besiyeri içerisinde 2 kırık camda (B) deneye alındı. Böylece bu koşullarda deneye alınan hücrelerin besiyeri pH'ları (pH 7,4) ve solüsyon yükseklikleri (2 mm) bütün deney gruplarında eşit tutuldu.

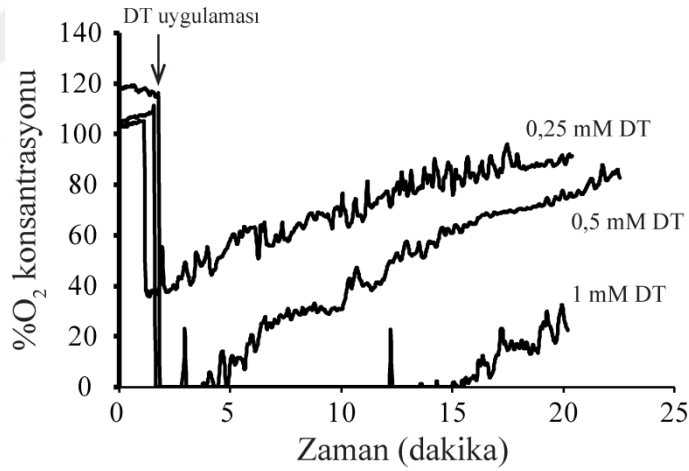
2.3. Hipoksinin Oluşturulması

Hipoksi oluşturmak için oksijen kontrollü karbondioksit inkübatörü (MCO-170M-PE, Panasonic) kullanıldı. İnkübatörün içindeki oksijen probunun kalibrasyonunda oksijen ölçümü yapabilen ikinci bir cihazdan yararlanıldı (Oxymicro, WPI). İlk önce, ikinci cihazın kalibrasyonu havada (%21 O_2 , PO_2 : ~143 mm Hg Ankara, 890 m) ve sudaki anoksik şartlarda (%0 O_2 , 1 mM sodyum ditionit + %100 N_2 ile gazlandırma) olmak üzere iki noktadan yapıldı. Daha sonra ikinci cihaz inkübatöre paralel olarak bağlandı ve inkübatör içindeki oksijen probunun kalibrasyonu bu cihaza göre yapıldı (Şekil 2.2A). İnkübatör içindeki oksijen konsantrasyonu %1'e (~7 mm Hg) ayarlandı ve diğer parametreler standart kültür koşulları ile aynı tutuldu (%5 CO_2 , %95 nem, 37°C).

A)



B)



Şekil 2.2.A) Hipoksi oluşturmak için kullanılan sistem. B)Küvet'ten doğrudan yapılan O₂ ölçümleri.

Diğer bir deney grubu hücre, normoksida hücre içinde Hif birikimi oluşturarak hipoksiyi taklit eden DMOG (1 mM) ile 48 saat inkübe edildi. Daha sonra DMOG uzaklaştırıldı ve hücrelerden süperfüzyon ortamında H⁺/NHE1/NBC akıları kaydedildi. Bu grup hücrelerde DMOG inkübasyonu sırasında besiyerinde aside kayma gözlenmedi. Akut anoksi deneylerinde normoksida büyütülen hücreler anoksik solüsyonlar ile 10 dakika süperfüze edildi ve anoksi sırasında

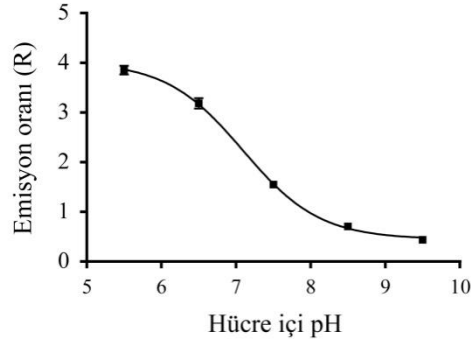
H^+ /NHE1/NBC akıları kaydedildi. Anoksi için %100 N_2 ile gazlandırılmış Hepes tamponlu solüsyon ve %95 N_2 + %5 CO_2 ile gazlandırılmış bikarbonat tamponlu solüsyonları hazırlandı. Solüsyonlara oksijen süpürücüsü sodyum ditionit (DT; 0,1 ve 1 mM) her kayıttan önce taze olarak eklendi. Küvet'teki süperfüzyon ortamından doğrudan yapılan O_2 ölçümünde DT konsantrasyona bağlı O_2 miktarını düşürdü (Şekil 2.2B).

2.4. pH Transport Kinetiği ve pH_i Görüntülenmesi

2.4.1. pH_i Ölçümü ve Kalibrasyonu

HL-1 hücrelerinden pH_i görüntülenmesi için pH duyarlı boya SNARF-1 (5-(ve-6)-karboksiseminaftarodaflor-1) boyasının asetometil esteri (AM) kullanıldı. Kırık camlara ekilen hücreler 30 dakika 5 μM SNARF-1-AM ile standart kültür koşullarında inkübe edildi. Boya yüklenen hücreler banyo ortamında konfokal mikroskopta (Leica TCS-SP5, HCX PL APO CS 63.0X, 1.20 su objektifi) 543 nm dalga boyunda uyarıldı (Helyum/Neon lazer) ve emisyon sinyalleri 560-600 nm ve 620-660 nm dalga boyu aralıklarında foton çoğaltıcı tüpler ile toplandı. İğne deliği (pin hole) boyutu 5,38 airy birim (AU) olarak ayarlandı. Görüntüler, xyt modunda 512x512 piksel olarak 0,54 Hz frekansında tarandı. Elde edilen ham sinyalin emisyon oranları (580/640) *in situ* nigerisin (Sigma) (K^+/H^+ iyonoforu, 10 μM) kalibrasyonu ile pH değerine çevrildi (Sun ve ark., 1996). Nigerisin kalibrasyonu beş farklı pH noktasından yapıldı. Her pH değerine karşılık gelen emisyon oranları (R, Şekil 2.3A) dört parametrelili logistik denklem eğrisine oturtularak R_{min} , R_{max} ve pK_a değerleri hesaplandı. Bu hesaplama, tez çalışması sırasında birkaç defa tekrarlandı. Bu deneylerden elde edilen tipik değerler sırasıyla 0,449; 4,018; 7,09 olarak bulundu. Elde edilen parametreler ve ölçülen R ile pH_i değeri aşağıdaki denklem yardımı ile hesaplandı (Şekil 2.3B). Süperfüzyon küveti ve sistemi (borular, musluklar) kalibrasyon solüsyonlarındaki nigerisin kontaminasyonundan sırasıyla 100 ml %2'lik sığır albümini (37°C), 2L %20 deterjanlı su (60°C), 100 ml etanol (25°C) ve 3L distile su kullanılarak temizlendi.

A)



B)

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

Şekil 2.3. HL-1 hücrelerinde pH duyarlı SNARF-1 floresan boyasının *in situ* kalibrasyonu. A) HL-1 hücrelerinin nigerisin iyonoforu varlığında beş farklı pH değerinde (5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5) solüsyon ile süperfüzyonu sonucu kaydedilen emisyon oranlarının grafikte gösterimi. B) Deney sırasında kaydedilen R değerlerinden pH_i hesaplanmasında kullanılan denklem. R: emisyon oranı, $R_{\min}$: minimum emisyon oranı, $R_{\max}$: maksimum emisyon oranı, pK_a : SNARF-1 pK_a 'sı, pH_i : Hücre içi pH.

2.4.2. Kullanılan Solüsyonlar

Süperfüzyon için kullanılan Hepes tamponlu tirod solüsyonu (mM olarak): 135 NaCl, 20 Hepes (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinethanosulfonik asit, pK_a :7,5), 11 Glukoz, 4,5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$ kullanılarak hazırlandı. Solüsyon pH'sı 37°C' de NaOH ile 7,4'e ayarlandı. HCO_3^- tamponlu tirod solüsyonu için (mM olarak): 125 NaCl, 22 $NaHCO_3$, 11 Glukoz, 4,5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$ kullanıldı. Solüsyon %5 CO_2 %95 O_2 ile gazlandırıldı. Amonyum klorür (NH_4Cl , 20 mM) Hepes ve HCO_3^- tamponlu tirod solüsyonları hazırlanırken eşdeğer Na^+ ile yer değiştirildi. Na^+ içermeyen Hepes ve HCO_3^- tamponlu tirod solüsyonları için Na^+ izoosmotik olarak N-metil-D-glukamin (NMDG) ile yer değiştirildi ve pH'sı HCl ile 7,4'e ayarlandı. Hiperkalemik Hepes ve HCO_3^- tamponlu tirod solüsyonları için K^+ konsantrasyonu izoozmotik olacak şekilde Na^+ ile yer değiştirilerek 45 mM' a getirildi. NHE1 proteininin spesifik inhibitörü zoniporid (30 μM , Tocris) ve/veya kardiyak NBC inhibitörü S0859 (30 μM , Sigma) kullanıldığı bazı akı deneylerinde solüsyonlara doğrudan eklendi. Kalibrasyon solüsyonlarında (mM olarak): 140 KCl, 1 $MgCl_2$, 0,5

EGTA, 0,01 nigerisin, 20 HEPES ya da 11 2-(N-morfolino) etanosülfonik asit (MES, pKa:6,1) kullanıldı. Alkali kalibrasyon solüsyonlarında miyozin inhibitörü 2,3 butandion monoksim kullanıldı. Kalibrasyon solüsyonlarının pH'sı HCl ya da NaOH ile ayarlandı. Protein miktar tayini deneylerinde hücrelerin yıkanması aşamasında kullanılan PBS ise 1,67 g Na₂HPO₄, 0,57 g NaH₂PO₄ ve 8,5 g NaCl kullanılarak hazırlandı.

2.4.3. Sarkolemmal H⁺ Akısının (J_H) Hesaplanması

HL-1 hücrelerinde hücrelere asit yüklemek ve asit atan transportörleri aktive etmek amacıyla, kırık camlara ekilen hücreler yaklaşık beş dakika amonyum klorür (NH₄Cl, 20 mM) solüsyonu ile süperfüze edildi. Amonyum ön işlemi olarak adlandırılan bu klasik metod çeşitli hücrelere asit yüklemek için kullanılmaktadır (Roos ve Boron, 1981) (Şekil 3.1B). Metodun prensibi şöyledir; hücre dışından geçirilen amonyum klorür çözeltide amonyum (NH₄⁺) ve klor (Cl⁻) ayrışır. Amonyum suda hızla yüksüz olan amonyak (NH₃) ve H⁺'e dönüşür. Amonyak hücre membranından geçtiğinde hücre içindeki H⁺'nu bağlayarak pH_i'yi alkaliye kaydırır ve hücre içerisinde amonyum oluşur. pH_i'nin alkaliye kayması hücreye asit yüklenmesinden sorumlu proteinleri aktive ettiğinden hücre içine net asit yüklenir. Daha sonra amonyum klorür solüsyonunun hızla yıkanması ile hücre içindeki amonyum hızla amonyağa dönüşerek konsantrasyon gradientine göre hücre dışına çıkar ve süperfüzyon ile ortamdan uzaklaştırılır. Böylece hücre içine pasif amonyum giriş ve çıkışından sonra net asit yüklenmiş olur. Hücre içerisinde kalan net asit HCO₃⁻ varlığında NHE ve NBC aracılığıyla, HCO₃⁻ olmadığında (HEPES tamponu varlığında) sadece NHE aracılığıyla hücreden uzaklaştırılır. Amonyum ön-işlemi hızlı solüsyon değişimi gerektirmektedir. Solüsyonlar peristaltik pompa aracılığı ile 2 ml/dk hızında ve sıcaklığı geri beslemeli peltier ısıtıcı sistemi (CL-100, Warner Instruments) ile 37°C'de sabit tutularak konfokal mikroskoptaki banyo ortamına gönderildi.

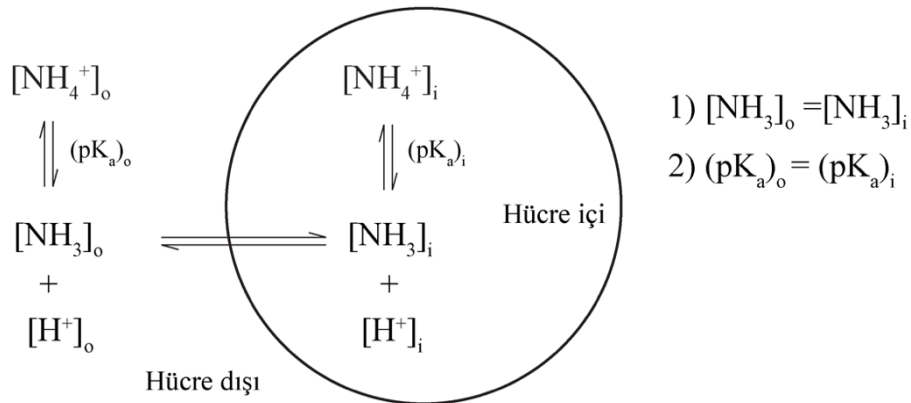
Hücrelerdeki asit akısı (J_H), hücrelere amonyum ön işlemi ile asit yüklendikten sonra hücrenin asit atan transporterler (NHE1 ve NBC) aracılı asitten kurtulma hızının (dpH_i/dt) toplam hücre içi tamponlama kapasitesi (β_{top}) ile çarpılması ile edildi (Şekil 2.4A). Denklemdaki β_{top} hücrenin doğal tamponlama (CO_2 dışındaki) kapasitesi (β_i) ve CO_2/HCO_3^- bağımlı tamponlamanın (β_{CO_2}) aritmetik toplamından elde edildi (Şekil 2.4B).

A) $J_H = dpH_i/dt \times \beta_{top}$

B) $\beta_{top} = \beta_i + \beta_{CO_2}$

Şekil 2.4. Hücrelerden asit akısı hesaplanmasında kullanılan denklemler.

β_i hesaplanmasında kademeli amonyum uzaklaştırılması yöntemi kullanıldı (Şekil 3.5A). Bu yöntemde bazı varsayımlarda bulunuldu. Hücre içi ve dışında amonyum ayrışmasının pK_a 'larının eşit olduğu kabul edildi (Lagadic-Gossman ve ark., 1992; Roos ve Boron, 1981). İkinci olarak amonyak konsantrasyonun hücre içi ve dışı arasında hızla dengeye gelerek eşitlendiği kabul edildi. Hücre dışında amonyum uzaklaştırılması ile elde edilen hücre içi asit yükünün hesaplanan hücre içi amonyum konsantrasyonundaki azalmaya eşit olduğu varsayıldı (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Amonyum ayrışması sırasındaki reaksiyonlar ve tamponlama hesaplanmasında kullanılan varsayımlar (1, 2). $[H^+]_i$: Hücre içi H^+ konsantrasyonu, $[H^+]_o$: Hücre dışı H^+ konsantrasyonu, $[NH_4^+]_i$: Hücre içi amonyum konsantrasyonu, $[NH_4^+]_o$: Hücre dışı amonyum konsantrasyonu, (pK_a) : Hücre içi/dışı amonyum ayrışma reaksiyonu denge sabiti.

Daha sonra bu varsayımlar altında Henderson-Hasselbalch denklemi kullanılarak bilinmeyen hücre içi amonyum konsantrasyonu, bilinen ve ölçülen parametreler cinsinden ifade edildi (Şekil 2.6A). Böylece amonyumun hücre içinde birebir ayrışması ile hücre içinde oluşturulan net asidin pH_i 'yi değiştirme miktarı olan β_i hesaplandı (Şekil 2.6B).

$$A) \quad [NH_4^+]_i = [NH_4^+]_o \times 10^{pH_o - pH_i}$$

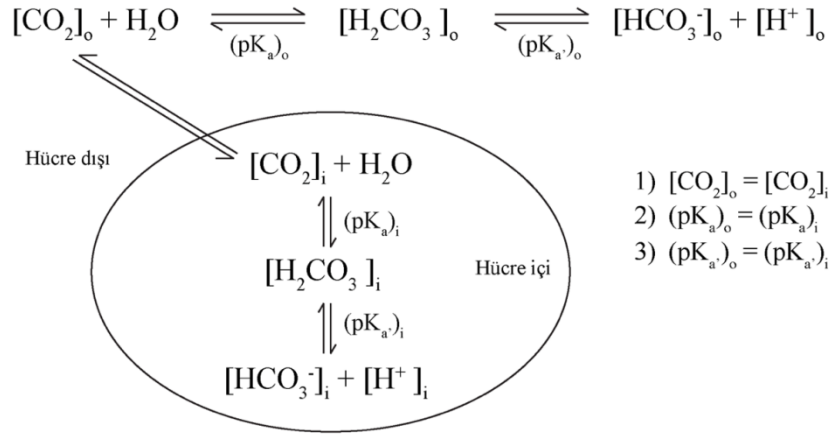
$$B) \quad \beta_i = \frac{\Delta[NH_4^+]_i}{\Delta pH_i}$$

Şekil 2.6. β_i hesaplanmasında kullanılan denklemler.

β_{CO_2} tamponu ise dışarıya açık ve kısmi CO_2 basıncı (P_{CO_2}) %5'de sabit tutulan bir sistemdir. Bu şartlarda Henry yasasına ($P_{CO_2} \times CO_2$ 'nin sudaki çözünürlüğü) göre sudaki CO_2 ve dolayısıyla karbonik asit (H_2CO_3) konsantrasyonları sabittir. Her H^+ bir adet HCO_3^- ile reaksiyona girerek ortamdan CO_2 şeklinde uzaklaşır ve nötralize olan H^+ miktarı HCO_3^- miktarındaki azalma kadardır (Şekil 2.7A). Dolayısıyla β_{CO_2} , HCO_3^- miktarındaki azalma ile birim pH'da oluşan değişikliğin diferansiyel çözümüne eşittir. Deneylerde β_{CO_2} belirli pH_i ve P_{CO_2} için Handerson-Hasselbalch denkleminden hesaplandı (Şekil 2.7B).

Konfokal mikroskopta elde edilen pH floresan verisi Image J Fiji (1.52p) programı kullanılarak text formatına çevrildi. Deneysel olarak toplanan hücre içindeki asit yükünden kurtulmanın hızı (dpH_i/dt) bilgisayarda polnomial eğriye oturtularak ve hücrenin tamponlaması ile çarpılarak transportör akısı hesaplandı (Matlab R2018a).

A)



B)

$$\beta_{\text{CO}_2} = \frac{d[\text{HCO}_3^-]_i}{dpH_i} = 2.303[\text{HCO}_3^-]_i = 2.303[\text{HCO}_3^-]_o \times 10^{(\text{pH}_i - \text{pH}_o)}$$

Şekil 2.7. β_{CO_2} hesaplanmasında kullanılan denklemler, varsayımlar ve $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ayrışma reaksiyonunun gösterimi (A, B). β_{CO_2} Handerson-Hasselbalch denkleminde $[\text{HCO}_3^-]_i$ bilinen parametreler pH_i , pH_o , $[\text{HCO}_3^-]_o$ ile yer değiştirilerek hesaplandı. Hücre membranının her iki tarafındaki $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ayrışmasının pK_a 'sı, CO_2 çözünürlüğü ve konsantrasyonu eşit kabul edildi (1,2 ve 3). pH_i : Hücre içi pH, pH_o : Hücre dışı pH, $[\text{HCO}_3^-]_i$: Hücre içi bikarbonat konsantrasyonu, $[\text{HCO}_3^-]_o$: Hücre dışı bikarbonat konsantrasyonu, $[\text{H}_2\text{CO}_3]_i$: Hücre içi karbonik asit konsantrasyonu, $[\text{H}_2\text{CO}_3]_o$: Hücre dışı karbonik asit konsantrasyonu, $[\text{CO}_2]$: CO_2 konsantrasyonu, pK_a : Hücre içi/dışı ayrışma reaksiyonu denge sabiti.

2.5. Protein İzolasyonu ve Western Blot

Total protein (membran+sitozolik) eldesi için hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı ve $+4^\circ\text{C}$ 'de 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra kazınarak tüpe aktarıldı. Daha sonra 500 g'de 5 dakika santrifüjlenerek pellet haline getirilen örneğin üzerine lizis solüsyonu (150 mM NaCl, 50 mM Hepes (pH:7,6), 1 mM EDTA, 1,5 mM MgCl_2 , %0,5 Triton-X ve proteaz inhibitör kokteyli) eklendi. 15 dakika buz üzerinde düzenli aralıklarla ters-düz edilerek inkübe edilen örnekler 12000 g'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatanttan membran ve sitozolik proteinler elde edildi. Elde edilen proteinler sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) sabit akımda (ayırıştırma jeli 10 mA, sıkıştırma jeli 20 mA; Çizelge 2.1) ayrıştırıldıktan sonra polivinilidinflorür (PVDF) membrana transfer edildi.

Membran %3 sığır serum albumin içeren solüsyon (%0,2 Tween 20, Tris pH7,6) içerisinde bir saat bloklandıktan sonra NBCe1 (1/400, SantaCruz), NBCn1 (1/600, Bioss) veya β -actin (1/1000, Santa Cruz) primer antikorları ile gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün sekonder antikorlar (anti-fare, 1/20000; Abcam ab97046 veya anti-tavşan 1/30000; Advansta R-05072) ile bir saat inkübe edildi. Membranlardan luminol (SantaCruz) ile oluşturulan bant yoğunlukları görüntüleme kabini (Azure Biosystems, Inc, 300) saptandı. Bant yoğunlukları analizi için Image J Fiji programı kullanıldı.

Çizelge 2.1. Western blot için kullanılan jeller

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

2.6. HL-1 Hücrelerinde mRNA Analizi ve Miktar Tayini

2.6.1. RNA İzolasyonu

HL-1 hücrelerinden ve fare akciğer dokusundan RNA izole etmek için Trizol üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Özetle, HL-1 hücrelerinin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında Trizol ile 5 dakika inkübe edildi. Fare akciğer dokusu ise Trizol varlığında buz üzerinde homojenize (15 saniye aralıklar ile 3 dakika boyunca) edildi. Ardından 2 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonra deney tüpüne aktarılan örnekler kloroform eklenerek santrifüjlendi. Ardından üst faz alınarak üzerine izopropil alkol eklendi ve gece boyunca -20°C'de tutuldu. Ertesi gün örnekler santrifüjlenerek pellet haline getirildi ve tuzları uzaklaştırmak amacıyla %75 etanolde çözüldükten sonra tekrar santrifüjlendi. Bu

işlemin ardından üstteki etanol uzaklaştırıldı ve RNA'lar suda çözülerek miktarı spektrofotometrede (260/280 nm dalga boylarında) ölçüldü.

2.6.2. Primer Tasarımı

İlgilenilen genlerin tüm transkriptleri ensembl (<https://www.ensembl.org>) veritabanından elde edildi. Fare NBCe1, NBCn1 ve NBCe2 genleri için en uygun primerler, primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>) programı ile belirlendi. Tasarlanan primerlerin kalitesi Oligo Analyzer 1.0 yazılımı ile kontrol edildi ve özgünlükleri primerblast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programı ile kontrol edildi.

Çizelge 2.2. Deneylerde kullanılan primerlerin sekans ve çoğaltıkları baz çifti uzunlukları

Primer	Primer Sekansı (5'→3')	Erimesıcaklığı ((T _m)/°C)	Amplikon
NBCe1 düz primer	CGGAGGAGGAGGACATGGTGAC	64,0	181
NBCe1 ters primer	GATGGCGTTGGTTACGGTTGC	62,7	
NBCe2 düz primer	CAGACAGGGACAGTGCTACT	53,8	157
NBCe2 ters primer	TCTTGTTTTGGTGACGATGC	51,7	
NBCn1 düz primer	ATTCCCCACGACCTCTTCAC	53,8	158
NBCn1 ters primer	TGTAGAGACAGAGTTGCCACA	52,4	
β-aktin düz primer	GGCACCACACTTCTACAATG	63,2	133
β-aktin ters primer	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAAC	57,9	

2.6.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen total RNA'lardan kit yardımıyla cDNA sentezlendi (Super Script III First Strand Synthesis kit, Invitrogen). Kısaca 1 µg total RNA, üretici firmanın protokolü doğrultusunda kit içerisinde bulunan solüsyonlar, enzim ve ilgilenilen genlere özgü (ters ve düz) primerler toplam hacim 20 µl olacak şekilde karıştırıldı. Hazırlanan karışım polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazında (Applied Biosystems, GeneAmp 9700) sırasıyla 10 dakika 25°C, 50 dakika 50°C, 5 dakika 85°C inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lardan ilgilenilen genlere ait bölgeler PCR cihazında çoğaltıldı (Taq DNA polymerase high fidelity kit, Invitrogen). PCR ürünleri %4 agaroz jelde yürütüldü ve görüntüldü (Raytest UV).

2.6.4. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)

Deneylerde kapiller sisteme (Roche LightCycler 1.5) uygun Syber Green bazlı RT-PCR kitleri (GoTaq, Promega) kullanıldı. 10 ng cDNA, kit ile birlikte gelen reaksiyon çözeltisi, çalışılan gene ait ters ve düz primerler (5 pmol) ve steril su ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde karıştırılıp RT-PCR cihazına yüklendi. Deneylerde DNA boyasının (Syber Green) herhangi bir çift zincirli yapıya (primer dimerleri, kontamine DNA gibi) bağlanma potansiyelinden dolayı deneylerin sonunda çoğaltılan yapıların özgüllüğü erime eğrisi analizi ile kontrol edildi. Normoksik kontrol ve hipoksik örneklerden elde edilen NBCe1/NBCn1 mRNA miktarlarının karşılaştırılması $\Delta\Delta C_t$ metoduna göre göreceli ekspresyon oranı olarak hesaplandı. Bu ölçümde primerlerin reaksiyon verimleri kontrol edildi (Pfaffl, 2001).

2.7. İstatistik

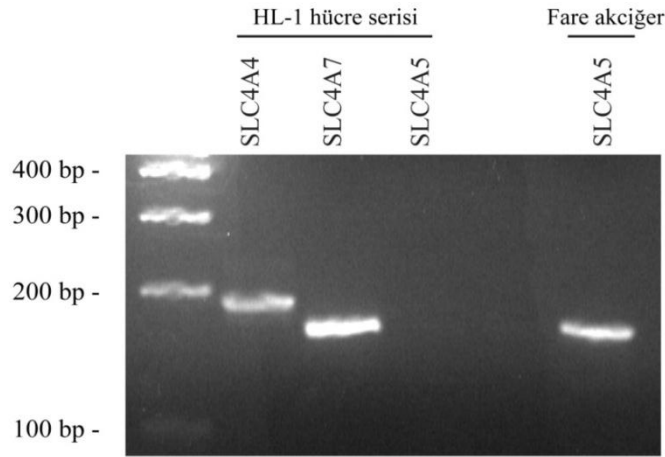
Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM şeklinde gösterildi. Gözlem sayısı (n) “hücre grubu” şeklinde verildi. Deney grupları ve kontrollerinden elde edilen pH_i -H⁺/NHE1/NBC akısı veri setlerinde hipoksinin/anoksinin anlamlı etkisi ve pH_i ile ilişkisi (pH_i duyarlılığı) için iki-yönlü ANOVA testi (Graph PadPrism 4.0) kullanıldı. Elde edilen akı eğrileri dört parametrelili lojistik denklem eğrisine oturtuldu (*fit*). Elde edilen *fit* pEC_{50} değerleri F-testi kullanılarak karşılaştırıldı. Western blot ve PCR analizleri iki yönlü Student’ın t-testi ile karşılaştırıldı ve $p<0,05$ anlamlı kabul edildi. H⁺/NHE1/NBC akı ölçümleri ve protein/mRNA miktar tayini deneylerien az 3 farklı pasaj hücreden sırası ile n=25-40 ve n=6-8 olacak şekilde yapıldı. Deneylerde aynı pasajdan elde edilen hücreler ikiye ayrılarak hipoksik ya da normoksik kontrol koşullarında inkübe edildi. Dolayısıyla her pasajdan kontrol ve deney grubu hücreler elde edildi. Şekillerde yıldız (*) $p<0,05$ ’i ifade etmektedir.

3. BULGULAR

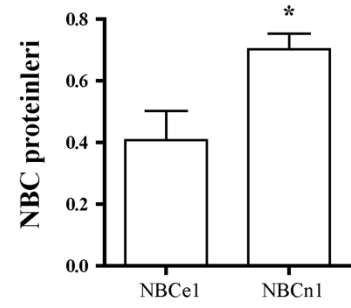
3.1. HL-1 Hücrelerinde Asit Atımının (J_H) Moleküler ve Fonksiyonel Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında ilk olarak HL-1 hücrelerinde endojen olarak eksprese olan NBC izoformları araştırıldı. Özgül primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizi sonuçları Şekil 3.1A'da gösterilmiştir. Beklenen büyüklükteki ürünler NBCE1 (kulvar SLC4A4, 181 bp), NBCn1 (kulvar SLC4A7, 158 bp) için elde edildi. NBCE2 (kulvar SLC4A5, 157 bp) HL-1 hücresinde gözlenmedi ancak pozitif kontrol amaçlı olarak fare akciğer dokusunda saptandı. Bu sonuçlar ile HL-1 hücrelerinde NBCE1 ve NBCn1 izoformlarının varlığı ilk defa gösterildi. NBCn1'in yaklaşık iki kat fazla eksprese olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1B). Memeli kardiyomiyositleri bikarbonat varlığında hücre asit yükünden Na^+ bağımlı transportörler (başlıca NHE ve NBC), bikarbonat olmadığında (Hepes tamponunda) ise sadece NHE aracılığı ile kurtulur. Bu durumda hücre dışı ortamdan Na^+ uzaklaştırıldığında teorik olarak hücreden asit atımının durması beklenir. HL-1 hücrelerinde de HCO_3^- ya da Hepes tamponu içeren süperfüzyon solüsyonundan izoozmotik olarak Na^+ iyonunun uzaklaştırılması hücrenin asit yükünden kurtulmasını büyük ölçüde durdurdu (HCO_3^- tamponlu solüsyon; pH_i 6,7; $0,93 \pm 0,22$ mM/dk, $n=4$; Hepes tamponlu solüsyon, pH_i 6,7; $0,94 \pm 0,13$ mM/dk, $n=3$; Şekil 3.1C). Aynı protokol, Na^+ uzaklaştırılması yerine NHE1 ve NBC spesifik inhibitörleri kullanılarak tekrarlandığında benzer sonuçlar elde edildi (pH_i 6,7; $1,00 \pm 0,63$ mM/dk, $n=2$; Şekil 3.1D). Na^+ iyonunun solüsyonlara geri konması ile hücrenin asitten kurtulması devam etti. Bu sonuçlar doğrultusunda Na^+ aracısız asit akısı ihmal edilebilir düzeyde olduğundan J_H 'ın sadece NHE1 ve NBC aracılı olduğu kabul edildi.

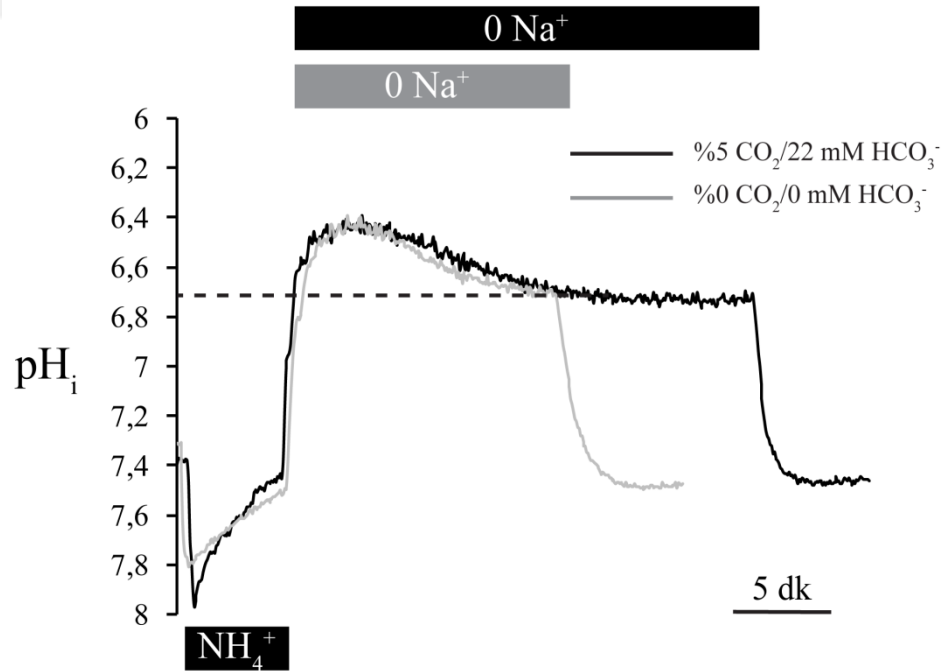
A)



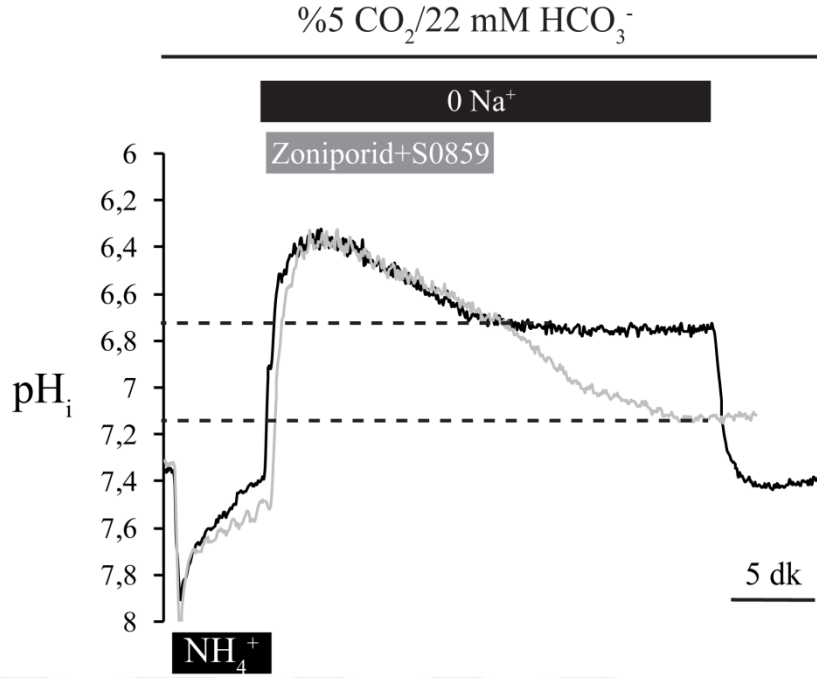
B)



C)



D)



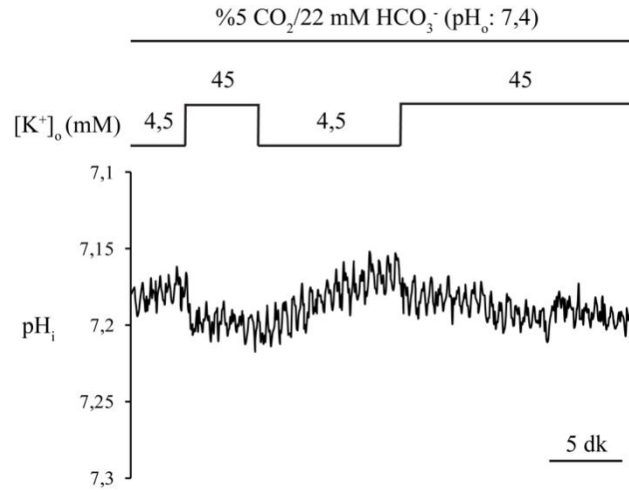
Şekil 3.1. HL-1 hücrelerinde NBC izoformları aracılı asit atımının gösterimi. A) 3µl cDNA'den çoğaltılan PCR ürünleri etidyum bromür içeren %4 agoroz jel elektroforezde ayrıştırıldı (bp: baz çifti). DNA merdiveni (100 bp'lik, ladder) şekilde en solda yer almaktadır. PCR cihazında 1 dakika 94°C inkübasyonun ardından 35 döngü 15 saniye 94°C, 30 saniye 63,5°C (SLC4A4/NBCe1 için) 53°C (SLC4A5/NBCe2 ve SLC4A7/NBCn1 primerleri için), 90 saniye 68°C protokolü kullanılarak çoğaltıldı. B) Normoksideki NBC izoformlarının protein miktarlarının beta aktine normalize oranları (n=6, *p<0,05).C) HL-1 hücresinde pH duyarlı boya SNARF-AM ile elde edilen pHi. Deney, pH'sı 7,4 olan HCO₃⁻ veya HEPES tamponlu tirod solüsyonlarında yapıldı. HL-1 hücreleri ilk önce 20 mM NH₄Cl ile süperfüze edildi. Daha sonra NH₄Cl hızla uzaklaştırılınca hücreye asit yüklemesi olmaktadır (amonyum ön işlemi ile). Hücre asit yükünü atmaya başladığında ortamdan Na⁺ uzaklaştırılıp yerine NMDG konuldu ve asit atımı büyük ölçüde durdu (kesikli çizgi). Traselerin son kısımlarında süperfüzyona Na⁺ geri konulduğunda asitten kurtulma bazal pHi'ye kadar devam etmektedir. D) Aynı protokol NHE1 inhibitörü zoniporid (30 µM) ve NBC inhibitörü S0859 (30 µM) varlığında elde edilen asitten kurtulma eğrisi. İnhibitörlerin uzaklaştırıldığı trasenin son kısmında yıkamanın yavaş gerçekleştiği ve bazal dengeye geldiği (kesikli çizgi) izlenmektedir.

3.2. HL-1 Hücrelerinde İzoosmotik Hiperkalemik Solüsyonların Bazal pHi'ye Etkisi

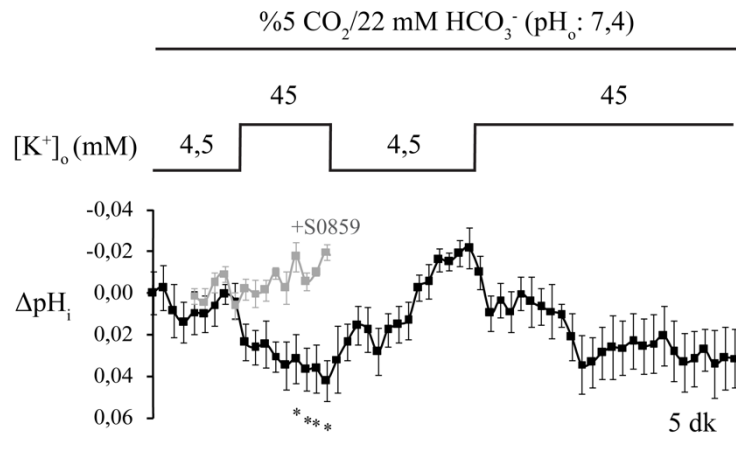
HL-1 hücrelerinde NBC izoformlarının bazal pHi dengesindeki rolünü araştırmak amacıyla hücreler hiperkalemik solüsyon ile süperfüze edildi. HCO₃⁻ tamponlu süperfüzyon solüsyonlarında (pH_o 7,4) K⁺ konsantrasyonu 4,5'dan 45 mM'a çıkartıldığında pHi 7,18±0,004'den 7,22±0,01'e yükseldi (n=3, p<0,05; Şekil 3.2A,B,C). Hiperkalemik süperfüzyon solüsyonlarına NBC inhibitörü S0859 eklenmesi bazal pHi'deki alkaliye kaymayı durdurdu. Benzer şekilde aynı protokol

Hepes tamponlu solüsyonlarda tekrarlandığında da bazal pH_i 'da herhangi bir değişiklik izlenmedi (Şekil 3.2D,E). Hiperkalemik solüsyonunun memeli kardiyomiyositlerinde membran potansiyelini depolarize ettiği (Aiello ve ark., 1998; Yamamoto ve ark., 2005) göz önünde bulundurulduğunda, HL-1 hücrelerinde depolarizasyonun hücrenin bazal durumdaki NBC aracılı asit atma yeteneğini artırdığını düşündürmektedir. Özetle, bu sonuçlar HL-1 hücrelerinde bazal pH_i regülasyonunda elektrojenik NBC izoformun (NBCe1) rolü olduğuna işaret etmektedir.

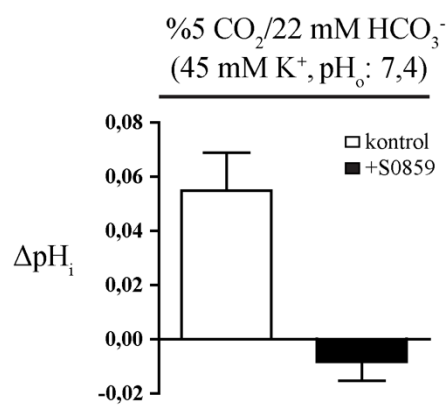
A)



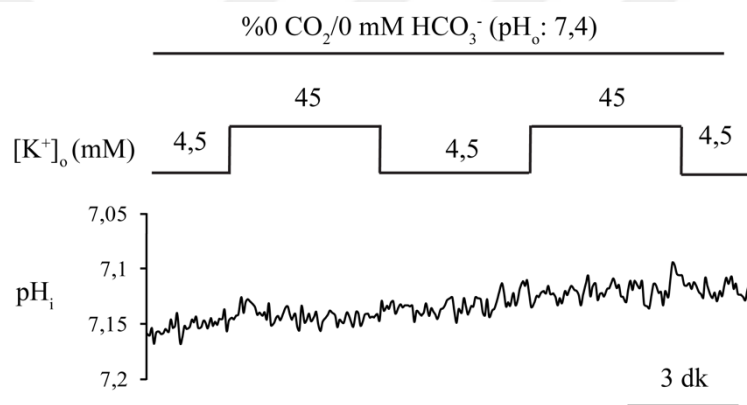
B)



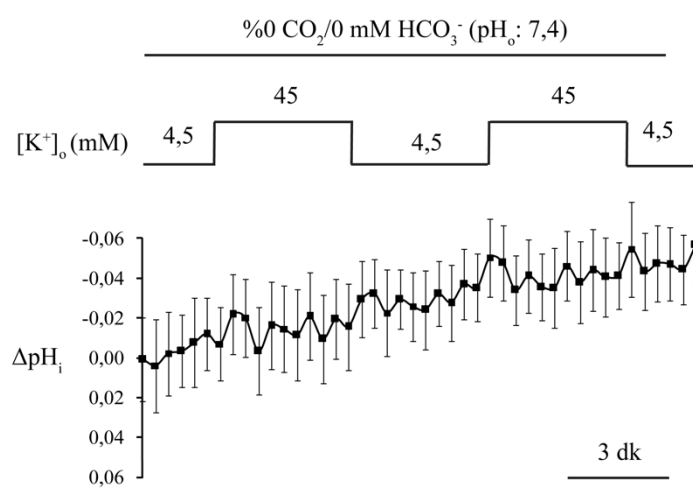
C)



D)



E)

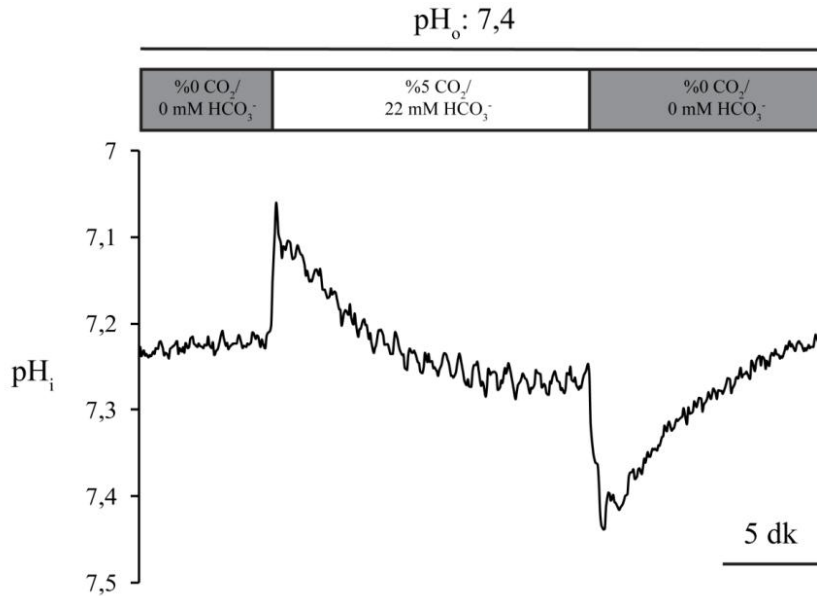


Şekil 3.2. İzoozmotik hiperkalemik solüsyonların bazal pH_i 'ye etkisi. A) Bikarbonat tamponlu solüsyonlarda 5-10 dakika boyunca yüksek K^+ (45 mM) süperfüzyonu sonrasında bazal pH_i 'nin alkaliye kaydığını gösteren örnek trase. B) HCO_3^- tamponlu solüsyonlarda (n=3) ve S0859 varlığında (n=3) sonuçların ortalamalarını gösteren grafik. C) Hücrelerin 5 dakika yüksek K^+ süperfüzyonu (HCO_3^- tamponunda) sonrasında S0859 varlığında (n=3) ve yokluğunda (n=3) gözlenen pH_i 'deki ortalama değişim. D) Hepes tamponlu solüsyonlarda 5-10 dakika boyunca yüksek K^+ (45 mM) süperfüzyonu sonrasında bazal pH_i 'nin değişmediğini gösteren örnek trase. E) Hepes tamponlu solüsyonlarda (n=3) sonuçların ortalamalarını gösteren grafik.* kontrole göre $p<0,05$.

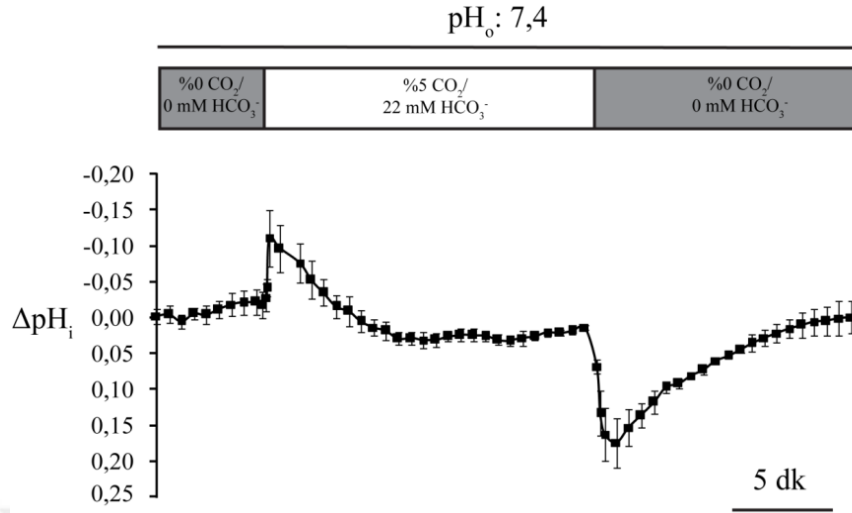
3.3. HL-1 Hücrelerinde HCO_3^- 'in Bazal pH_i 'ye Etkisi

Şekil 3.3A, HL-1 hücrelerinde bazal pH_i sürekli kaydının örnek trasesini göstermektedir. pH_o 'ları 7,4 olan Hepes tamponlu süperfüzyon solüsyonundan %5 CO_2 ile gazlandırılan HCO_3^- içeren (22 mM) solüsyona geçildiğinde hücre içinde hızla difüze olan CO_2 'in ayrışmasına bağlı asidifikasyon gözlemlendi. Hücrede ~5 dakika içerisinde bazal pH_i dengeye geldi. Hücre HCO_3^- içeren solüsyondan tekrar Hepes tamponlu solüsyona geçildiğinde ise CO_2 'in hızla hücreden uzaklaşmasına bağlı pH_i alkaliye kaydı ve sonrasında tekrar bazal değerine geri döndü. Hepes ve HCO_3^- tamponlu solüsyonlar ile süperfüzyon bazal pH_i değerini değiştirmedi (Şekil 3.3B). Yukarıdaki kısımlar ile birlikte bu sonuçlar NHE1'in tek başına ya da NBC ile birlikte hücrede bazal pH_i 'yi regüle edebildiğini göstermektedir.

A)



B)



Şekil 3.3. Hepes tamponlu solüsyondan HCO_3^- tamponlu solüsyona geçildiğinde bazal pH_i 'nin değişimi. A) HL-1 hücrelerinde Hepes'den HCO_3^- içeren solüsyonlara değiştirilmesinin öncesi ve sonrasında kaydedilen bazal pH_i . B) 6 ayrı hücre grubundan alınan kayıtların ortalaması. Protokoller şekil üstünde verilmiştir.

3.4. Toplam Hücre İçi Tamponlamanın (β_{top}) Hesaplanması

HL-1 hücrelerinde, β_i ölçümünde hücreler CO_2/HCO_3^- olmayan ortamda farklı konsantrasyonlarda (0 mM- 40 mM arasında) NH_4Cl içeren Hepes tamponlu solüsyonlar ile süperfüze edildi. Kademeli olarak uzaklaştırılan amonyum hücre içerisinde asit oluşumuna yol açmaktadır. Bu işlem sırasında teorik olarak oluşması gereken asitin ölçülen asit miktarına oranından β_i hesaplandı (Şekil 2.6B). Prensipde bu esnada hücre içine H^+ giriş-çıkışı olmaması gerektiğinden deneylerde pH_i 'nin asit olduğu değerlerde NHE1 aracılı asit akısı inhibe edildi (zoniporid, 1 μ M). Tamponlama hesabı kademeli amonyum uzaklaştırılması ile oluşan anlık asit yükünün başlangıç ve bitiş noktalarından yapıldı (Şekil 3.5A). Elde edilen β_i değerleri pH_i 'deki her kademeli düşüşün orta noktasına atandı. Şekil 3.5B'de 2 ayrı pasajdan elde edilen hücre gruplarından (n=32-40) oluşturulmuş β_i değerleri verilmiştir. Genel olarak artan pH_i ile β_i değerleri kabaca doğrusal olarak azalmaktadır. Bu sonuçlar belli konsantrasyon (TA=42,2 mM) ve afinitede ($pK_a=6,87$) tek tip tampon modeli (Şekil 3.4) kullanılarak ifade edildi (Leem ve ark.,

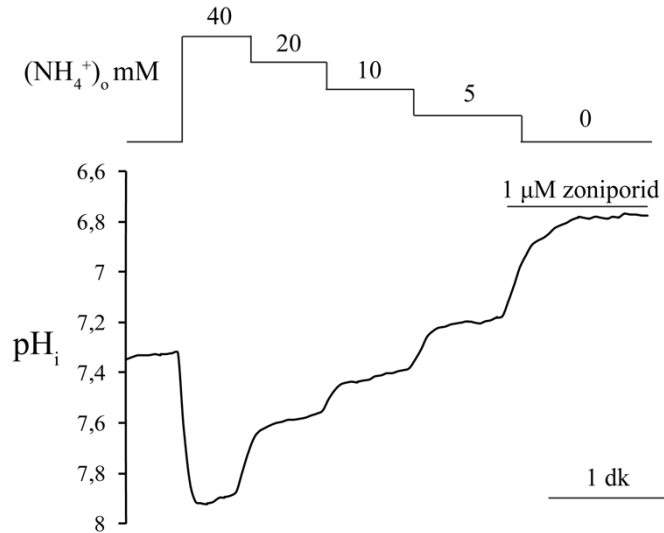
1999). Modeldeki pH_i değerlerine karşılık gelen β_i değerleri Excel programında en düşük kareler yöntemi kullanılarak deneysel verilere oturtuldu.

$$\beta_i(pH_i) = \frac{\ln 10 [TA] \times 10^{(pH_i - pK_a)}}{(1 + 10^{(pH_i - pK_a)})^2}$$

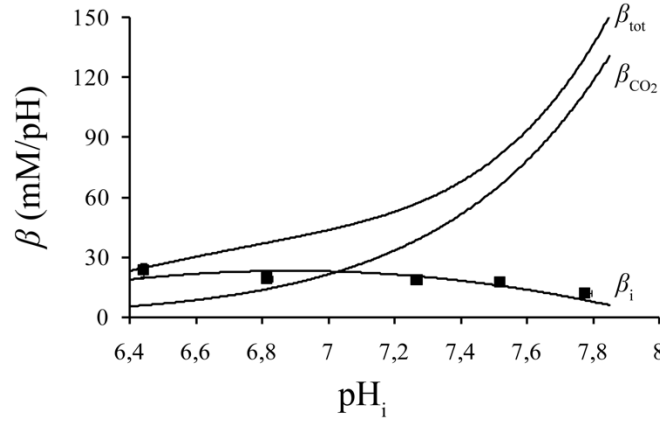
Şekil 3.4. β_i hesaplamasında kullanılan modelin denklemi. [TA]: Hücre içi tamponun toplam konsantrasyonu, pH_i : Hücre içi pH, pK_a : Hücre içi tamponun ayrışma reaksiyonu denge sabiti.

Hücreye alkali yüklemesi sonrası hücre içi ve dışı arasında CO_2 'in amonyağa göre daha yavaş dengeye ulaştığı (~1 dakika) düşünülmektedir (Leem ve Vaughan-Jones, 1998). Bizim sonuçlarımızda CO_2 'in membrandan difüzyonunun ~30 saniye sürdüğünü göstermektedir (Şekil 3.3). Bu süreler yaklaşık olarak deneylerimizde hücreye asit yüklemesi sonrası kararlı durum pH_i 'sına geldiği zaman dilimi içerisindeydir. Dolayısıyla hücrenin asit yükünden kurtulmaya başladığı anda CO_2/HCO_3^- tamponun dengeye geldiğini kabul edilerek hesaplamalar yapıldı. Teorik β_{CO_2} hesaplanmasında kullanılan denkleme (Şekil 2.7B) göre bikarbonat miktarının fazla olduğu durumda (H^+ ile reaksiyona girmediği yani pH_i 'nin alkali olduğu durum) tamponlama kapasitesi en yüksektir (Şekil 3.5B).

A)



B)



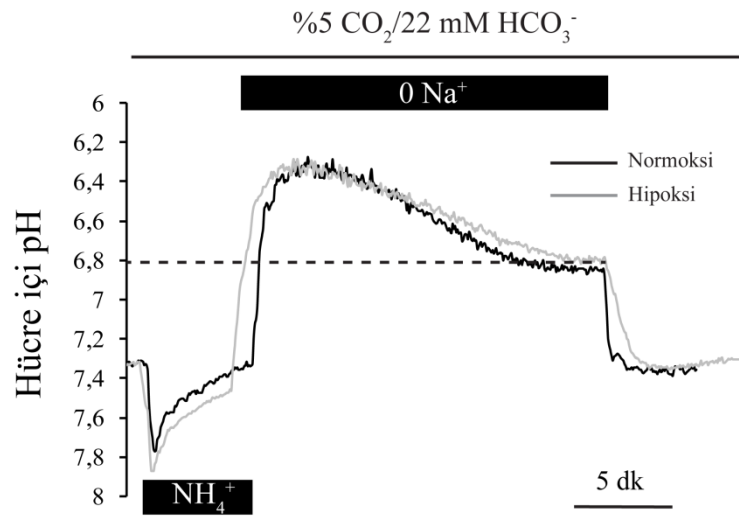
Şekil 3.5. A) HEPES tamponu içeren çözeltilerden ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ içermeyen) β_i hesaplanmasında kullanılan deneysel protokol. Başlangıçta 40 mM NH_4Cl ile süperfüzyon ve sonrasında sırası ile kademeli olarak uzaklaştırılması ile indüklenen asit yüklemeleri. B) β_i ortalama değerleri birbirini takip eden yaklaşık 0,4 pH ünitelik dilimlerden hesaplandı (n=32). Teorik β_{CO_2} ve deney verilerinin model ile ifade edilmesi ile kesintisiz şekilde dönüştürülen β_i değerlerinin aritmetik toplamından β_{top} elde edildi.

3.5. Hipoksik Koşullarda HL-1 Hücrelerinde Asit Atımının Fonksiyonel Karakterizasyonu

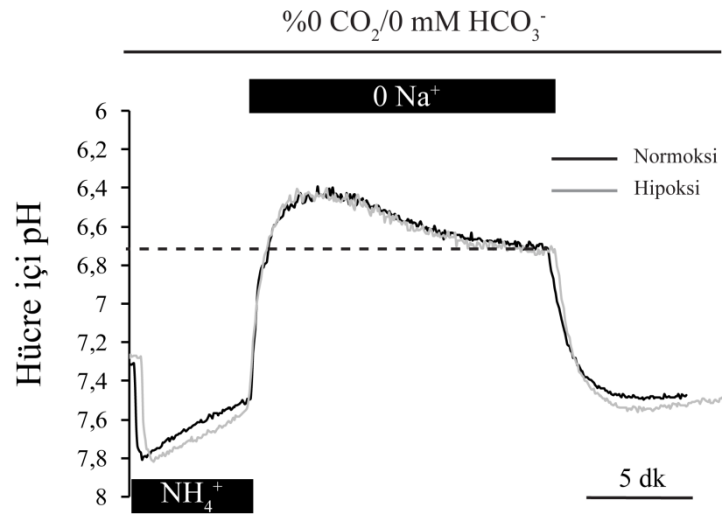
Yukarıdaki sonuçlarımız HL-1 hücrelerinden asit atımının başlıca NHE1, NBCe1 ve NBCn1 izoformları aracılığıyla olabileceğini gösterdi (Şekil 3.1). Bu tez çalışmasında NBC izoformlarının hipoksisteki fonksiyonlarının araştırılması hedeflenmektedir. Bu amaçla ilk olarak hipoksinin Na^+ dan bağımsız asit atan ilave mekanizmaları tetiklemesi olasılığı araştırıldı ve normoksiste uygulanan protokol (Şekil 3.1B) hipoksik koşullar için de test edildi. 48 saat %1 hipoksiste inkübe edilen ve daha sonra normoksiste süperfüzyon ortamına alınan HL-1 hücrelerinde HCO_3^- ya da HEPES tamponu içeren süperfüzyon solüsyonlarından izoozmotik olarak Na^+ iyonunun uzaklaştırılması sonrasında hücrenin asit yükünden kurtulması ~30 dakika içerisinde kaydedildi. Normoksik kontrollerinde gözlemlendiği gibi hipoksik koşullarda da HCO_3^- tamponlu solüsyonda asit atımı büyük ölçüde durdu (normoksi pH_i 6,7; $0,93 \pm 0,22$ mM/dk, n=4; hipoksi pH_i 6,7; $1,21 \pm 0,38$ mM/dk, n=3, Şekil 3.6A). Benzer şekilde HEPES tamponlu solüsyonda alınan kayıtlarda hipoksi sonrasındaki asit atımı normoksik kontroldakilerden farklı değildi (normoksi pH_i 6,7; $0,70 \pm 0,16$ mM/dk, n=6; hipoksi pH_i 6,7; $0,65 \pm 0,21$ mM/dk, n=3, Şekil 3.6B). Dolayısıyla hipoksiste

NHE ve/veya NBC asit akısı ölçülürken Na^+ aracısız asit akısı normoksik kontrol hücrelerinde olduğu gibi ihmal edildi ve hipoksida asit atımının sadece NHE1 ve NBC aracılı gerçekleştiği, ilave asit atım mekanizmalarının tetiklenmediği kabul edildi. Hipoksinin hücre içi doğal tamponlama (β_i) üzerindeki etkisini araştırmak için Şekil 3.5A'daki protokol tekrarlandı. Hipoksi hücrenin β_i değerlerini anlamlı olarak değiştirmede ve asit akısı hesaplamalarında her grubun kendi β_i değerleri kullanıldı (Şekil 3.6C).

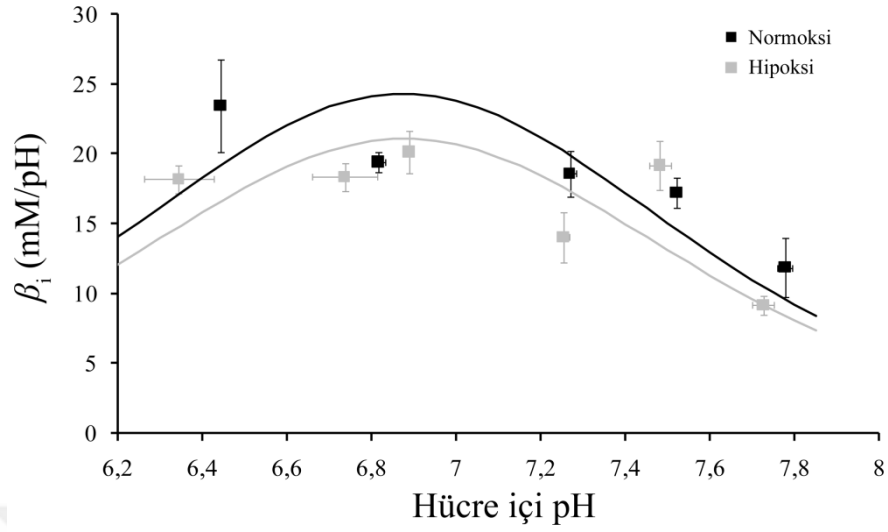
A)



B)



C)



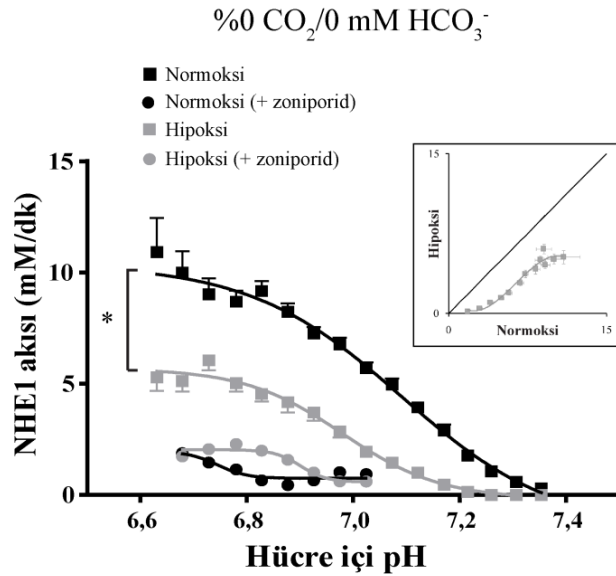
Şekil 3.6. HL-1 hücrelerinde hipoksinin hücreden Na^+ dan bağımsız asit atımına ve doğal tamponlamaya etkisi. Hipoksi ve kontrol gruplarından pH duyarlı boya SNARF-AM ile elde edilen ve üst üste getirilen pH_i kayıtları. Deneyler, pH' sı 7,4 olan HCO_3^- (A) veya Hepes (B) tamponlu tirod solüsyonlarında yapıldı. HL-1 hücreleri ilk önce 20 mM NH_4Cl ile süperfüze edildi. Daha sonra NH_4Cl hızla uzaklaştırılınca hücreye asit yüklemesi olmaktadır (amonyum ön işlemi ile). Hücre asit yükünü atmaya başladığında ortamdaki Na^+ uzaklaştırılıp yerine NMDG konuldu ve asit atımı her iki deney grubunda büyük ölçüde durdu (kesikli çizgi). Traselerin son kısımlarında süperfüzyona Na^+ geri konulduğunda asitten kurtulma bazal pH_i 'ye kadar devam etmektedir. C) Hipoksi ve normoksik kontrol β_i ortalama değerleri birbirini takip eden yaklaşık 0,4 pH ünitelik dilimlerden hesaplandı ($n=32-40$). Deney verilerinin Şekil 3.4'deki model kullanılarak ifade edilmesi ile kesintisiz şekle dönüştürülen β_i değerlerinden (sürekli eğri) her iki deney grubu için asit akıları hesaplandı.

3.6. HL-1 Hücrelerinde Hipoksinin NBC Akısına Etkisi

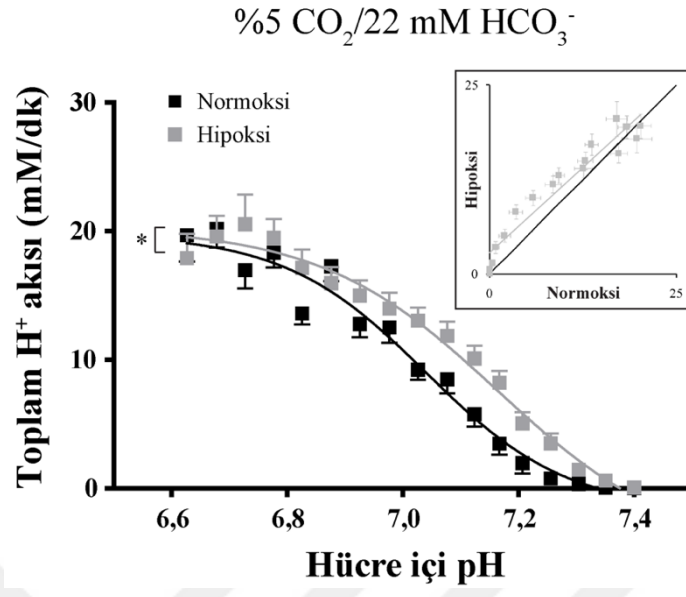
Daha önceki çalışmalarda fonksiyonel olarak NBC aracılı asit akısı memeli kardiyomiyositlerinde gösterilmiştir (Aiello ve ark., 1998; Loh ve ark., 2002; Villa-Abrille ve ark., 2007; Yamamoto ve ark., 2005). HL-1 hücrelerinde NBC aracılı akı henüz araştırılmamıştır. Dolayısıyla ilk seri deneylerde NBC aracılı H^+ akısının pH_i duyarlılığı incelendi. Şekil 3.7A'da Hepes tamponlu solüsyona zoniporid (30 μM) eklenmesi NHE1 aracılı asit akısı ve pH_i duyarlılığını büyük ölçüde durdurdu. Bu sonuçlar, yukarıdaki bulgularımızla paralel (Şekil 3.1B) olarak HL-1 hücrelerindeki asit atımından sorumlu ana izoformun NHE1 olduğunu göstermektedir. Buna karşılık normokside HCO_3^- tamponu içeren solüsyonlarda süperfüzyon ortamında zoniporid eklenmesi NBC aracılı asit atımını durdurmadı (Şekil 3.7C). Bu sonuçlar Şekil 3.1C'deki bulgular ile uyumlu olarak HL-1 hücresinde fonksiyonel olarak NBC

aracılı asit akısının varlığını kanıtlamaktadır. İkinci seri deneylerde 48 saatlik hipoksinin NBC akısı üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla yukarıdaki deney protokolleri hipoksi için tekrarlandı. HL-1 hücrelerinde 48 saathipoksi NHE1 akısını inhibe etti ve banyo ortamına zoniporid eklenmesi asit atımını normoksida olduğu gibi büyük ölçüde durdurdu (Şekil 3.7A). Ancak, hipoksida J_H 'da artış gözlemlendi (Şekil 3.7B). Bu sonuçlar birlikte düşünüldüğünde hipoksida NHE1 inhibisyonunun aksine NBC aracılı akının arttığını işaret etmektedir. Hipoksida NBC akısının pH_i duyarlılığında (zoniporid varlığında HCO_3^- tamponlu solüsyonda kaydedilen akı) sağa kayma (H^+ afinitesinde artış) gözlemlendi (Şekil 3.7C). Normoksik kontrol; pEC_{50} $6,86 \pm 0,04$, Hipoksi; pEC_{50} $7,12 \pm 0,02$ olarak bulundu ($n=29-46$, $p<0,05$). İkinci yaklaşım olarak, HCO_3^- tamponunda alınan toplam H^+ akısından HEPES tamponunda alınan NHE1 akısı farkı alınarak elde edilen NBC akısında da hipoksi ile sağa kayma gözlemlendi (Şekil 3.7C). Tüm bu bulgular doğrultusunda hipoksida NBC akısında gözlenen artışın mekanizmasını araştırmak amacıyla hücreler normoksida 48 saat DMOG (1 mM) ile inkübe edildiklerinde HEPES ya da HCO_3^- tamponlu solüsyonlarda sırasıyla kaydedilen NHE1 akısı ve J_H 'da hipoksiyi taklit eden paralel değişiklikler gözlemlendi (Şekil 3.7D,E). Bu sonuçlar hipoksi ile indüklenen NBC'nin pH_i duyarlılığındaki artışın HIF aracılı olduğunu önermektedir.

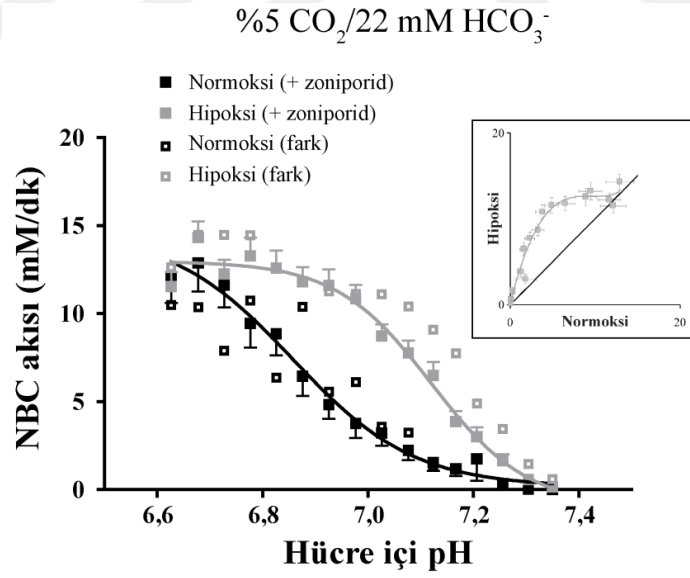
A)



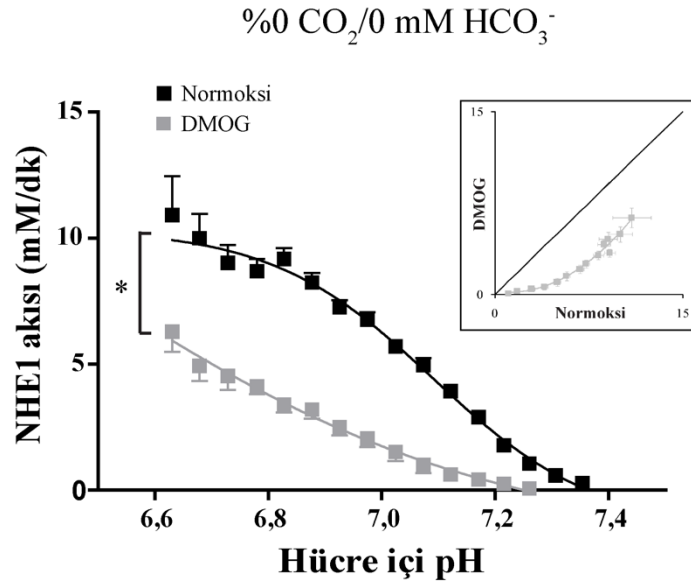
B)



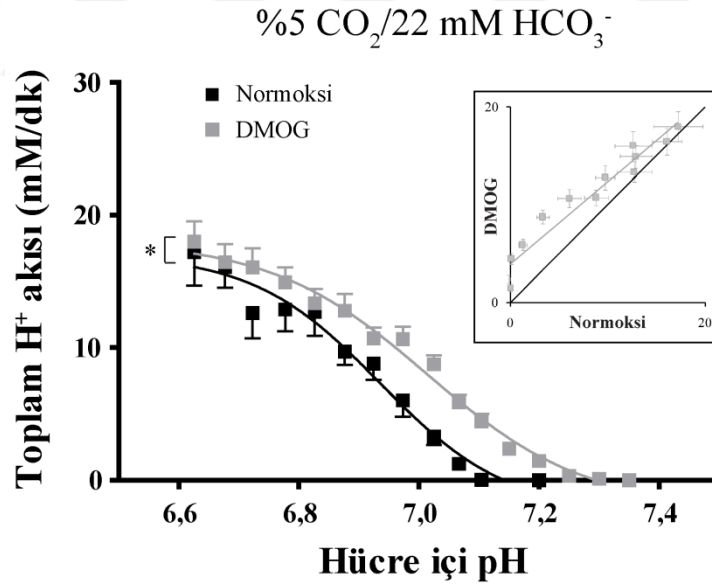
C)



D)



E)



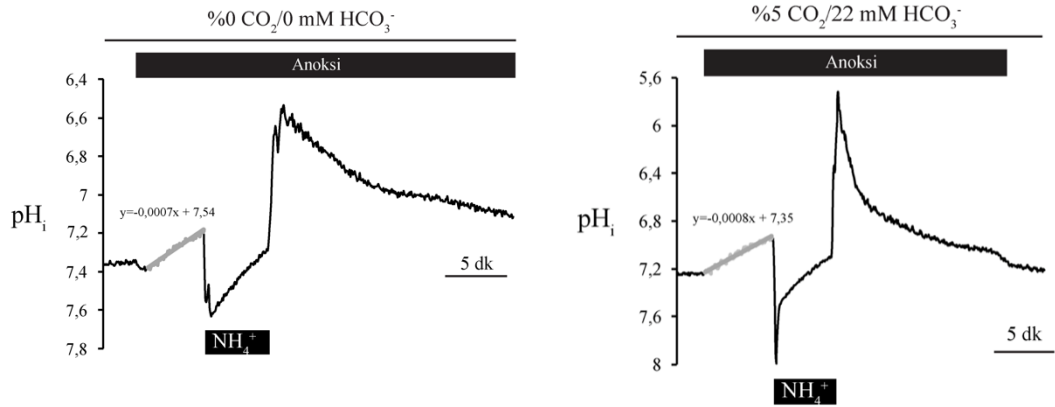
Şekil 3.7. HL-1 hücrelerinde NBC akısının gösterimi ve hipoksinin etkisi. A) Normoksik ve hipoksik hücre gruplarından HEPES tamponlu solüsyonlarda zoniporid varlığında (30 µM, normoksi n=5; hipoksi n=3) ve yokluğunda (normoksi n=172; hipoksi n=43) alınan NHE1 aracılı asit akıları. B) Normoksik ve hipoksik koşullarda HCO₃⁻ tamponlu solüsyonda zoniporid yokluğunda (NHE1+NBC) (normoksi, n=19; hipoksi, n=24) ve C) varlığında (30 µM, NBC; normoksi n=29; hipoksi n=46) alınan J_H. HCO₃⁻ tamponlu solüsyonda alınan J_H (NHE1+NBC) HEPES tamponlu solüsyonda alınan akı (NHE1) çıkartılarak elde edilen farklara ait akılar (NBC; normoksi fark, hipoksi fark). Normoksida DMOG (1 mM) ile 48 saat inkübe edilen hücrelerden D) HEPES ve E) HCO₃⁻ tamponlu solüsyonda alınan J_H. İki yönlü ANOVA: Hipoksi ya da DMOG etkisi kontrole göre farklı (p<0,0001); pH_i etkisi

anlamlı ($p < 0,0001$). Ekli küçük grafikler aynı pH_i değerindeki normoksik kontrole karşılık gelen hipoksiya da DMOG akıları gösterilmiştir. Bu grafiklerden maksimum NBC akısı (V_{maks}) değişiklikleri (sigmoidal fit, A) veya afinite kayması (doğrusal fit kısımları, C) izlenebilmektedir. Kesintisiz doğrusal çizgi (45°) kontrolü göstermektedir.

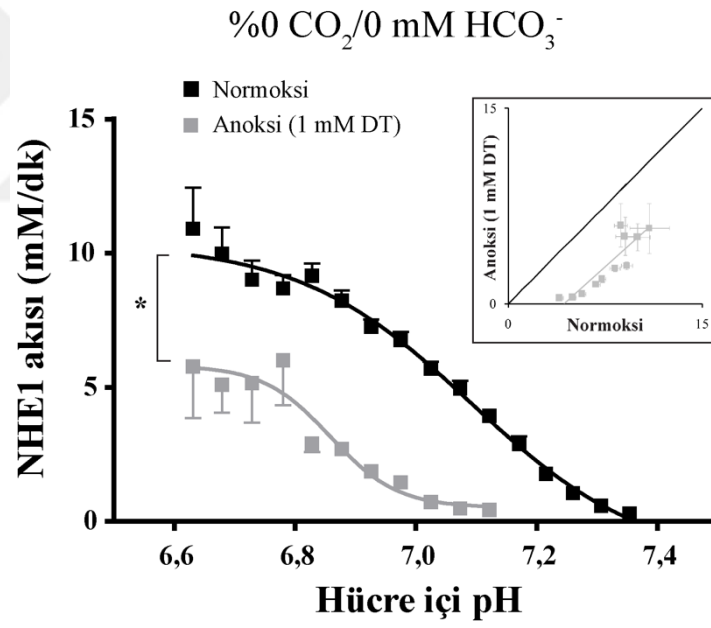
3.7. HL-1 Hücrelerinde Akut Anoksinin NBC Akısına Etkisi

HL-1 hücrelerinde daha sonra akut anoksi (10 dk, %0 O_2)'nin NBC akısı üzerindeki etkisi araştırıldı. Bu amaçla hesaplamalarda akıların birbirinden çıkartılması yaklaşımı kullanıldı. İlk olarak daha önce de göstermiş olduğumuz Hepes tamponunda akut anoksinin NHE1 aktivitesi üzerindeki etkisi tekrarlandı (Simsek ve ark., 2019). Akut anoksi NHE1 aktivitesini hızlı şekilde inhibe etti (Şekil 3.8B). Akut anoksinin β_i 'yi değiştirmediği kabul edildi (Kandilci ve ark., 2020). NBC akısının anoksik duyarlılığını anlamak için Hepes tamponunda uygulanan prosedür HCO_3^- ile tekrar edildi. Normoksida büyütülmüş HL-1 hücreleri HCO_3^- 'li süperfüzyon ortamında deneye alındı. Oksijen seviyesini değiştirmek için normoksik süperfüzyon solüsyonundan (%21 O_2 ; PO_2 : 147 mm Hg) anoksik solüsyona (PO_2 : 0 mm Hg; %100 N_2 ile gazlandırılmış ve 1 mM DT eklenmiş solüsyon) geçildi ve 5 dakika boyunca bu solüsyon ile süperfüze edildi. Hücrelerde daha önce memeli kardiyomiyositlerinde de gözlediğimiz anoksida bazal pH_i 'de anaerobik solunuma bağlı geri plan asit yüklemesi oluştu (Şekil 3.8A) (Kandilci ve ark., 2020). Geri plan asit yükü J_H 'ın yavaşlamasına yol açar. Dolayısıyla geri plan asit yükünün J_H hesaplamasına katılması gereklidir. Ancak, anoksi ile geri plan asit yüklemesi ihmal edilebilir olarak ölçüldü (HCO_3^- tamponlu solüsyon; $\sim 0,04$ mM/dk, Hepes tamponlu solüsyon; $\sim 0,01$ mM/dk, Şekil 3.8A). Bu koşullarda J_H kullanılan DT konsantrasyona bağlı geri dönüşlü inhibisyon oluşturdu (Şekil 3.8C). Daha sonra anoksidedeki J_H akısından anoksidedeki NHE1 akısı çıkartılarak anoksidedeki NBC akısı elde edildi (Şekil 3.8D). Bu yaklaşımla HL-1 hücrelerinde NBC akısının anoksida inhibe olduğu ilk kez gösterildi.

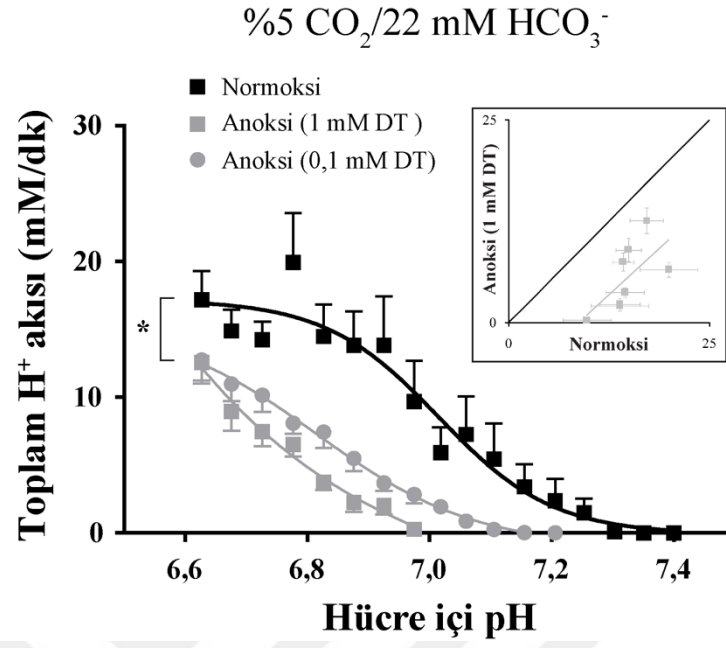
A)



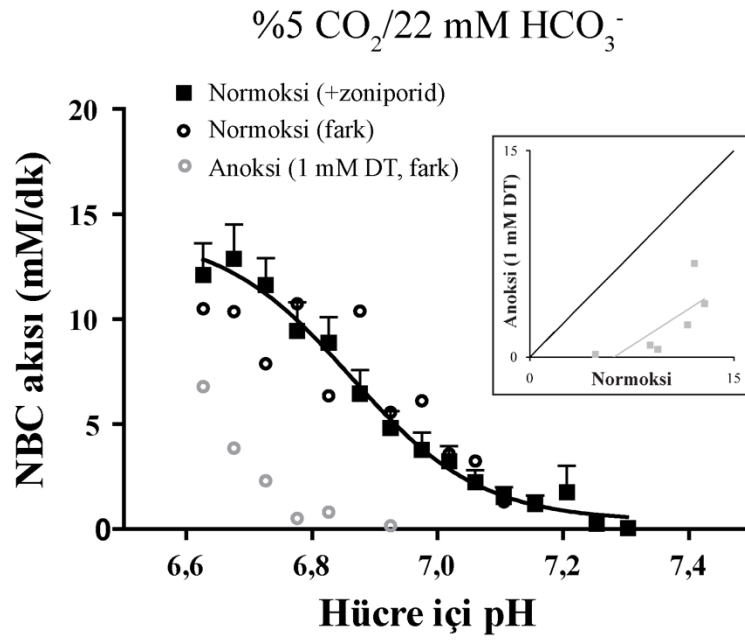
B)



C)



D)

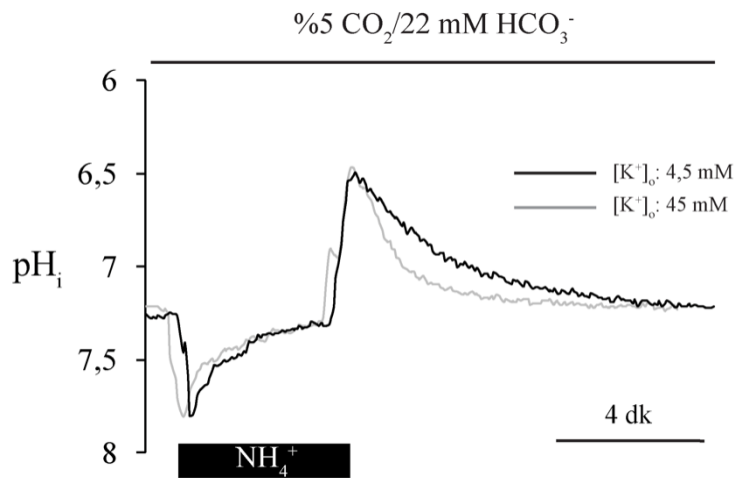


Şekil 3.8. Akut anoksida NBC akısının elde edilmesi. A) Anoksida HEPES ve HCO_3^- varlığında gözlenen geri plan asit yüklemeleri (Gri doğrusal fit denklemi ve eğimini (dpH/dt)) ve asitten kurtulma eğrisinin örnek trasesi. Akut anoksinin B) NHE1 (normoksi, $n=172$; anoksi, $n=16$) C) J_{H} (normoksi, $n=20$; anoksi (0,1 mM DT, $n=24$; 1 mM DT, $n=23$) akısının pH_i duyarlılığına etkisi. D) Normoksida ve anoksida C-B ile elde edilen NBC akılarının pH_i duyarlılığını gösteren grafik. İki yönlü ANOVA: Anoksinin etkisi kontrole göre farklı ($p<0,0001$); pH_i etkisi anlamlı ($p<0,0001$). Şekillerdeki ekli küçük grafikler HEPES ve HCO_3^- tamponlarında normoksik kontrollerine karşılık gelen anoksida akıları göstermektedir. Kesintisiz doğrusal çizgi (45°) kontrolü göstermektedir.

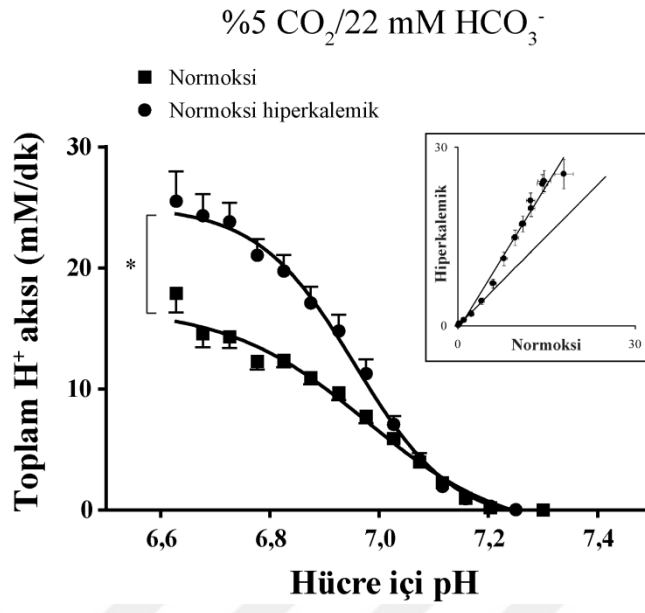
3.8. HL-1 Hücrelerinde Normosik ve Hipoksik Koşullarda Hiperkalemik Solüsyonun J_{H} 'a Etkisi

Bazal pH_i dengesinde elektrojenik NBCe1'in rolü bulgular 3.2'de gösterilmiştir. NBCe1'in daha geniş pH_i aralığındaki rolünü aydınlatmak amacıyla hücreler asitten kurtulma sırasında depolarize edici hiperkalemik solüsyon ile süperfüze edildi. HCO_3^- içeren süperfüzyon solüsyonunda K^+ konsantrasyonunun 4,5 mM'dan (normal membran potansiyeli) 45 mM'a (depolarize membran potansiyeli) çıkartılması J_{H} 'in V_{maks} 'ında artışa yol açtı ancak bazal pH_i civarında (pH_i 7,02-7,25; $p>0,05$) J_{H} depolarizasyondan etkilenmedi (Şekil 3.9A,B). Buna karşılık aynı deney HEPES içeren solüsyonda tekrarlandığında NHE1 akısının V_{maks} 'ında değişiklik gözlenmedi (Şekil 3.9C,D). Bu sonuçlar HL-1 hücrelerinde NBCe1'in asidik pH_i 'lardaki J_{H} 'dan sorumlu olduğunu ve bazal pH_i aralığında başlıca NBCn1 aktivitesi olduğuna işaret etmektedir.

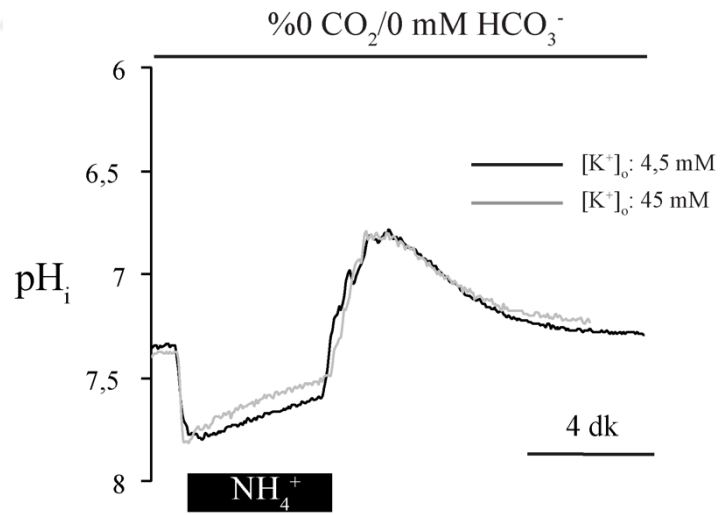
A)



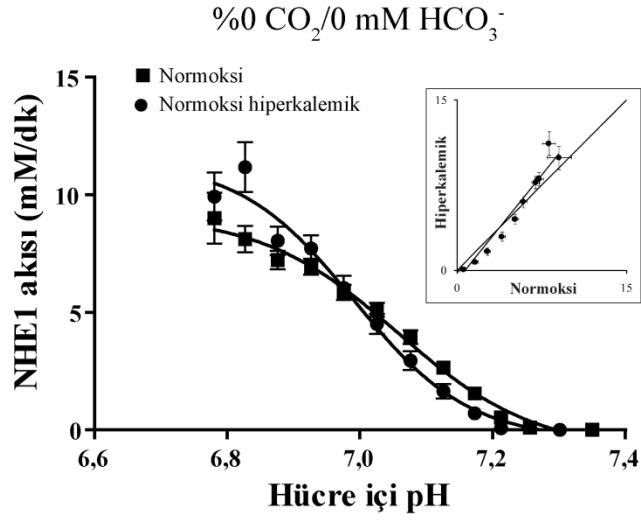
B)



C)

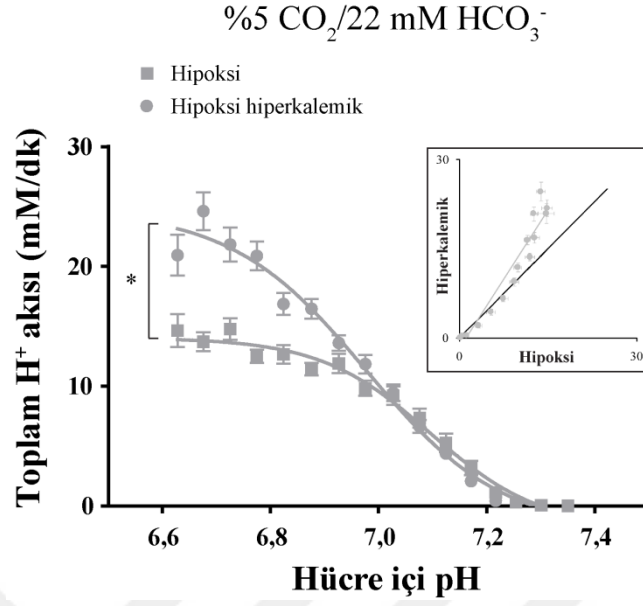


D)

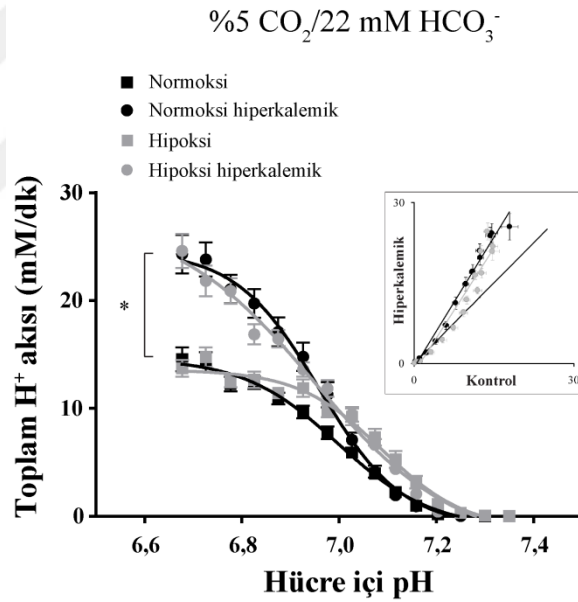


Hipokside NBC'nin pH_i duyarlılığındaki sağa kaymadan (afinite artışından) Hif'in hangi izoform üzerinden etki oluşturduğunu ayırtırmak amacıyla 48 saat hipokside inkübe edilmiş hücrelerin HCO₃⁻ içeren hiperkalemik solüsyonda kaydedilen J_H 'ları normokalemik solüsyonda kaydedilen J_H 'lar ile kıyaslandı. Hiperkalemik solüsyondaki alınan J_H bazal pH_i civarında farklı değilken (pH_i 6,92-7,30, $p > 0,05$), J_H V_{maks} 'ında artışa yol açtı (Şekil 3.9E). Ancak, hipoksi deney grubunda depolarizasyona bağlı oluşan V_{maks} artışı aynı koşullarda normoksik kontrol deneylerde gözlenen V_{maks} artışı kadardı (Şekil 3.9F). Bu sonuçlar hipoksideki NBC akısındaki artıştan NBCe1'in sorumlu olmadığını daha çok NBCn1'in rolü olduğunu düşündürmektedir.

E)



F)

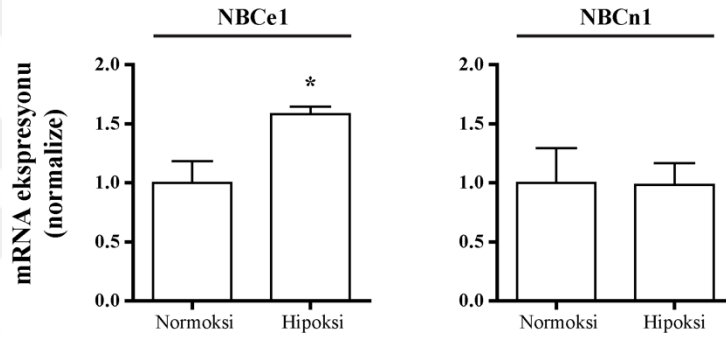


Şekil 3.9. Normoksi ve hipokside hiperkalemik solüsyonun J_H üzerine etkisi. HCO₃⁻'li solüsyonda K⁺ ile indüklenen depolarizasyonun HL-1 hücrelerinin asitten kurtulma hızına etkisinin A) trasesi ve B) pHi duyarlılığı (normoksi; [K⁺]_o: 4,5mM n=65, [K⁺]_o: 45mM n=88). Deneyler Hepes'li ortamda tekrar edildiğinde elde edilen C) trase D) pHi duyarlılığına etkisi (normoksi; [K⁺]_o: 4,5mM n=44, [K⁺]_o: 45 mM n=44). E) Hipokside aynı protokollerin tekrarı (hipoksi; [K⁺]_o: 4,5mM n=28, [K⁺]_o: 45mM n=44) ve F) tüm bulguların toplu gösterimi. İki yönlü ANOVA: Hiperkaleminin etkisi kontrole göre farklı (p<0,0001); pHi etkisi anlamlı (p<0,0001). Şekillerdeki ekli küçük grafikler Hepes ve HCO₃⁻ tamponlarında kontrollerine karşılık gelen hiperkalemiddeki akıları göstermektedir. Kesintisiz doğrusal çizgi (45°) kontrolü göstermektedir.

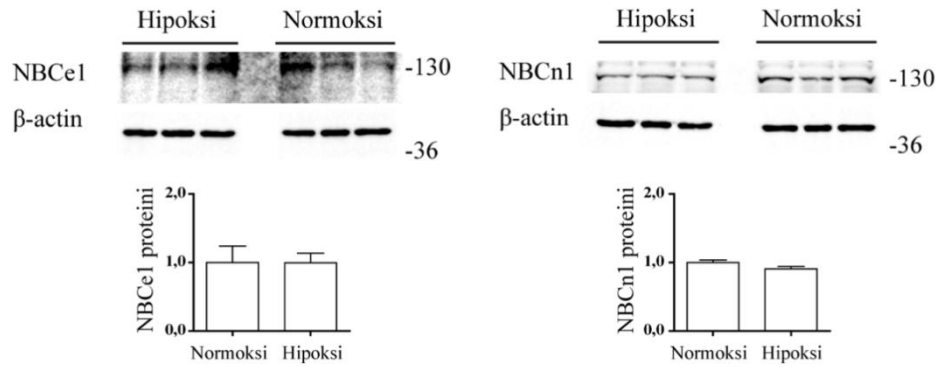
3.9. HL-1 Hücrelerinde Hipoksinin ve Normokside DMOG İnkübasyonunun NBC Protein İzoformlarının Ekspresyonlarına Etkisi

Hipokside elde edilen NBC akısındaki artışın mekanizmasında NBC izoformlarında mRNA/protein miktarlarının katkısı araştırıldı. 48 saat hipoksi ile NBCE1 mRNA miktarını artırdı ancak NBCn1 miktarını değıştirmedi (Şekil 3.10A). NBCE1 ve NBCn1 protein miktarları ise hipokside değışmedi. Bu bulgular normokside 48 saat DMOG inkübasyonu sonrasında hipoksiyi taklit etti (Şekil 3.10B,C).

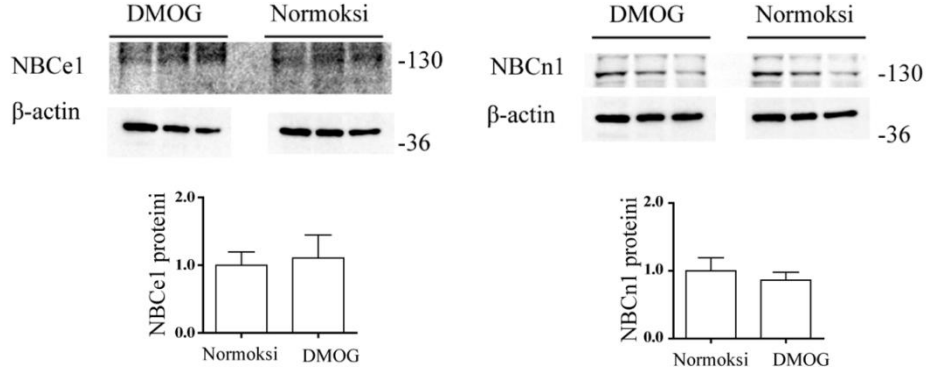
A)



B)



C)

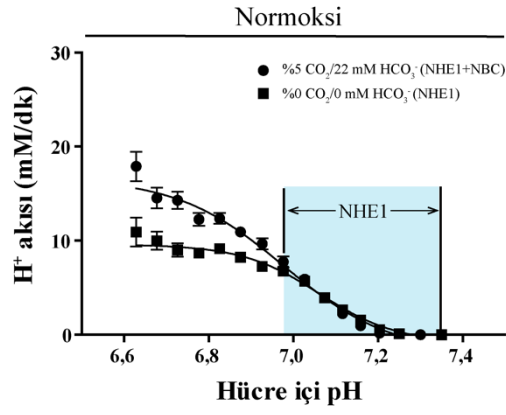


Şekil 3.10. HL-1 hücrelerinde 48 saat hipoksi sonrası NBC izoformlarının ekspresyonu. A) RT-PCR'dan elde edilen NBCe1 ve NBCn1 izoformlarına ait mRNA miktarlarının kontrole göre değişimi (n=4, *p<0,05). 48 saat B) hipoksi(normoksi n=6, hipoksi n=6) ya da C) normoksidede DMOG inkübasyonu (normoksi n=3, DMOG n=3) sonrasında elde edilen proteinlere ait jel görüntüleri ve beta aktine normalize dansitometrik analizleri.

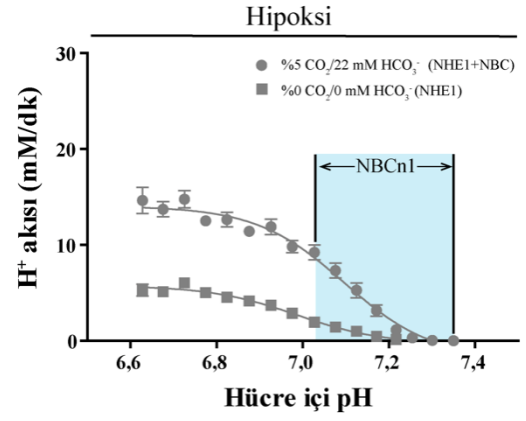
3.10. HL-1 Hücrelerinde Normoksi ve Hipoksidedeki Bazal pH_i 'daki Asit Transportunun Karşılaştırılması

Normoksidede bazal pH_i civarında Hepes tamponundaki asit akısının HCO_3^- tamponundaki akıdan farklı olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.11A). Bu sonuçlar normoksidede bazal pH_i regülasyonundan NHE1'in sorumlu olduğu göstermektedir. Hipoksidede ise bazal pH_i civarında Hepes tamponundaki azalırken HCO_3^- tamponundaki akı normoksi grubundakinden farklı değildi (Şekil 3.11B) ve depolarizasyondan etkilenmedi (Şekil 3.9E). Bu sonuçlar NBCn1'in bazal pH_i 'da NHE1'in azalan rolünü üstlendiğini öne sürmektedir.

A)



B)



Şekil 3.11. HL-1 hücrelerinde hipoksidede bazal pH_i'dan sorumlu asit atan protein izoformları arasındaki rol değişimi. A) Normoksidede HCO₃⁻ iyonunun H⁺ akısını bazal pH_i civarında artırmadığını gösteren grafik (HCO₃⁻ tamponlu solüsyon n=168, Hepes tamponlu solüsyon n=65; p>0,05). B) Hipoksidede HCO₃⁻ iyonunun H⁺ akısını bazal pH_i civarında artırdığını gösteren grafik. (HCO₃⁻ tamponlu solüsyon n=28, Hepes tamponlu solüsyon n=43; p>0,05).

4. TARTIŞMA

Kalpte, iskemi ve reperfüzyon hasarı sırasında dokuda görülen hipoksi ve pH_i değişiklikleri hücre fizyolojisini değiştirir. Kardiyomiyositler hücre içindeki asit yükünden NHE1 ve NBC aracılığı ile kurtulur ancak hipoksi ile bu başlıca pH_i regülatörleri arasındaki ilişki henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu konudaki zorlukların bir kısmından hipokside dokuların yeterince uzun süre canlı kalmaması sorumludur. Kardiyak fonksiyonu hücresel düzeyde çalışmak için memeli kalbinden atrial ve ventriküler kardiyomiyosit izolasyonu uzun yıllardır uygulanan bir tekniktir (Powell ve Twist, 1976). Bu şekilde elde edilen kardiyomiyositler yapısal ve fonksiyonel olarak canlı organizmayı taklit etse de uzun dönem kültür çalışmalarına uygun değildir. Taze elde edilen olgunlaşmış hücrelerden primer kültür yapılabilmektedir ancak normoksik koşullarda ertesi gün bile hücre canlılığı, T-tübül yoğunluğunda azalma, morfoloji değişiklikleri gibi problemler ortaya çıkmaktadır (Louch ve ark., 2004; Louch ve ark., 2011). Alternatif olarak, sıçan neonatal ve embriyonik tavuk kalplerinden bölünebilme yeteneğini koruyandoku kültürleri bulunmaktadır (Hunton ve ark., 2002; Lan ve ark., 2009). Ancak bu hücreler farklılaşmamıştır ve uzun süreli kültürlerinde fenotip değişikliği gibi sorunlar gözlenmektedir (Bugaisky ve Zak, 1989; Jacobson ve Piper, 1986). Buna karşılık, HL-1 hücreleri kültür ortamında farklılaşmış kardiyak fenotipini koruyan yetişkin hücre serisi olarak ön plana çıkmaktadır (Claycomb ve ark., 1998). Bu hücreler atrial natriüretik faktör promotörünün kontrolünde SV40 büyük T antijeni eksprese eden transgenik farelerin atrium dokusundan elde edilmişlerdir. Bu onkoprotein HL-1 hücrelerine diğer kardiyak hücre serilerinde bulunmayan sınırsız proliferasyon özelliği kazandırmaktadır (Lanson ve ark., 2000). Uygun kültür ortamında HL-1 hücreleri yetişkin kardiyomiyositlere kıyasla daha düzensiz yapısal özellikler gösterebilir spontan atım, yetişkin kardiyak spesifik genler ve kalp dokusuna özgü sinyal ileti yolları eksprese etmektedir (Claycomb ve ark., 1998). Bu tez çalışmasında memeli kardiyomiyositlerindeki yakın asit atan transportör aktiviteleri ve şiddetli kronik hipoksik etkilerin gözlenebilmesi için uzun süre kültüre edilebilmelerinden dolayı HL-1 hücreleri tercih edilmiştir (Simsek ve ark., 2019). Ayrıca, tez çalışması sırasında biyokimya deneyleri yapılırken hipoksi ve hücre dışı

pH'nın aside kaymasının etkilerini birbirinden ayırmak için metod kısmında bahsedildiği gibi yüksek tampon hacmi kullanıldı. Daha önceki bulgularımız iki etkinin birlikte NHE1 protein miktarını azalttığını, tek başına hipoksinin etkisini gözlemeye olanak sağlayan yüksek tampon hacmi kullanıldığında ise NHE1 protein seviyesinin değişmediği gösterdi. Bu tez çalışmasında da NBC izoformlarının ekspresyon deneylerinde yüksek tampon hacmi kullanıldı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, HL-1 hücrelerinde NBCe1 ve NBCn1 izoformları eksprese edilmektedir. Deneylerde kuyulara eşit miktarda cDNA'dan aynı çoğaltma sayısı ile elde edilen PCR ürünlerinin yüklendiği ve primer verimlerinin %100' e yakın olduğu göz önünde bulundurulduğunda, agoroz jelde NBCn1 izoformunun miktarının NBCe1'den fazla olduğu gözükmemektedir. Protein miktarlarında bu sonuçlar ile paralellik göstermektedir (Şekil 3.10A). Dolayısıyla bulgularımıza göre HL-1 hücrelerinde NBCn1 baskın izoformdur. Ancak tüm fare kalbinde NBCe1'nin NHE1 ile yaklaşık aynı miktarda ve NBCn1'den iki kat fazla eksprese olduğu rapor edilmiştir (Prasad ve ark., 2013). Bulgularımız arasındaki bu fark atrium ve tüm kalp doku farklılığına bağlı olabilir. NBCe2'nin sadece insan kabinde bulunduğu, fare ve sıçan kardiyomiyositlerinde eksprese olmadığı gösterilmiştir (Pushkin ve ark., 2000; Yamamoto ve ark., 2007). Bizim bulgularımız da NBCe2 izoformunun fare atriumunda bulunmadığını desteklemektedir.

Süperfüzyon ortamında $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ tamponunda NHE1 ve NBC transportörlerinin ikiside aktiftir. Bu koşullarda Na^+ ortamdan uzaklaştırıldığında (NMDG ile yer değiştirildiğinde) asit atımı ihmal edilebilir düzeydedir. Na^+ 'dan bağımsız J_{H} özellikle asidik pH_i 'da aktivite göstermekte ve pH_i 6,7 civarında durmaktadır. pH_i 'nin oldukça asidik olduğu durumda asit atımından primer aktif H^+ ATPaz pompaları sorumlu olabilir (Gottlieb ve ark., 1996). Zoniporid seçici olarak NHE1 ve NHE2 blokörüdür (Tracey ve ark., 2003). HL-1 hücrelerinde ise sadece NHE1 izoformu bulunmaktadır (Simsek ve ark., 2019). SO859 kardiyak hücrelerde NBCe1 ve NBCn1 aktivitesi tamamen durdurmaktadır (Ch'en ve ark., 2008). Normoksik kontrol koşullarda NHE1 ve NBC inhibitörleri zoniporid ve S0859 birlikte kullanımı hücrenin asitten kurtulmasını Na^+ 'suz süperfüzyon ortamdakine benzer şekilde durdurdu. Benzer sonuçlar 48 saatlik hipoksik koşullarda da elde

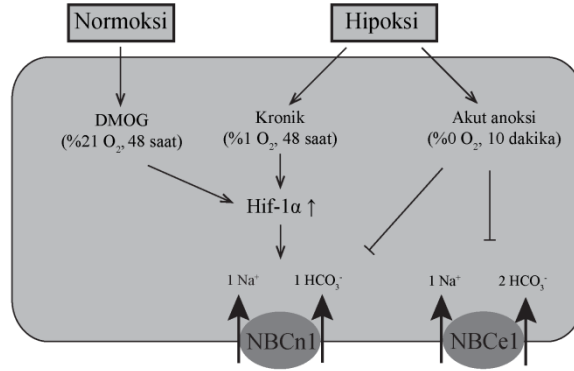
edildiğinden tüm deneylerde büyük ölçüde NHE1, NBCe1 ve NBCn1 aracılı HCO_3^- aktivitesi kaydedildiği sonucuna ulaşıldı. Bazal pH_i (7,2) koşullarında normal K^+ içeren (4,5 mM) süperfüzyon solüsyonundan yüksek potasyum (45 mM) içeren solüsyona geçilmesi bazal pH_i 'de 0,04 pH'lık alkalizasyon oluşturdu (Şekil 3.2B). Az miktardaki bu değişim sıçan izole ventriküllerinde aynı protokol ile gözlenmiş ancak kobay ve tavşan kardiyomiyositlerinde böyle bir etkinin olmadığı bulunmuştur (Yamamoto ve ark., 2005). Dolayısıyla bazal pH_i regülasyonundaki minimal NBCe1 rolünün türe özgü olduğu anlaşılmaktadır. Fonksiyonel olarak NBCe1 izoformunun bazal pH_i regülasyonundan az miktarda sorumlu olsada başlıca asidik pH_i 'de hücrenin asit yükünden kurtulmasında rolü olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 3.2B; Şekil 3.9F). Normoksik kontrol deney grubu hücrelerde depolarize edici solüsyonla süperfüzyon pH_i 7,02-7,25 aralığında J_{H} aracılı asit atımının pH_i duyarlılığını pH_i 6,7-7,0 aralığında olduğu gibi yukarı kaydırmadı. Bu sonuçlar NBCn1'in en fazla bazal pH_i civarında (pH_i 7,02-7,25) aktivitesi olabileceğini sürmektedir. Ancak, normokside HCO_3^- 'li ve HCO_3^- 'siz (Hepes) tampon varlığında bazal pH_i civarındaki asit akıları farklı olmadığından normokside bazal pH_i 'daki asit akısından NHE1 izoformunun sorumlu olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 3.11A). HL-1 hücrelerinde asit pH_i 'de J_{H} 'ın yaklaşık olarak yarısı NBC diğer yarısı NHE1 sorumlu gözükmektedir. Bu bulgu gelincik izole kalbinde asit yükünden kurtulmada NHE ve NBC'nin eşit katkıda bulunduğunu gösteren çalışma ile uyumludur (Grace ve ark., 1993). Diğer memeli kardiyomiyositlerinde (kobay, sıçan) NBC'nin daha az katkısı olduğu (~%40) öne sürülmüştür (Vaughan-Jones ve ark., 2009).

Uzun süreli gerçek veya kimyasal hipoksinin NBC aktivitesi/ekspresyonu üzerindeki etkisi daha önce kanser serisi hücrelerde incelenmiştir. Meme kanseri hücrelerinde 48 saat hipoksi (%0,5-1 O_2) ile NBCe1 ve NBCe2 ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Carroll ve ark., 2022). CoCl_2 ile 24 saat inkübasyon glioblastoma hücrelerinde NBCe1 aktivite ve ekspresyonunu artırmıştır (Giannaki ve ark., 2022). Benzer şekilde prostat kanser hücrelerinde 96 saatlik hipoksi (%1 O_2) NBCe1 protein miktar ve aktivitesini artırmıştır (Li ve ark., 2021). Bizim bulgularımıza göre yüksek K^+ içeren HCO_3^- 'li solüsyon ile süperfüzyon normoksik kontrol ve hipoksi gruplarındaki NBC aracılı akıları bazal pH_i civarındaki etkilemedi. Buna karşılık

hipoksi grubunda depolarize edici solüsyon ile asidik pH_i bölgesinde gözlenen akı artışı normoksik kontroldeki kadardı (Şekil 3.9B,E). Hipoksida NBCe1 ve NBCn1 protein miktarlarının da değişmediği göz önünde bulundurulduğunda kalp dokusunda hipoksida gözlediğimiz bazal pH_i civarındaki artan HCO_3^- aracılı asit atımından NBCn1 izoformunun H^+ 'e olan afinitesindeki artış sorumludur. Hipoksida NHE1 akısının inhibe olduğu göz önünde bulundurulduğunda NBCn1'in bazal pH_i 'da NHE1'in rolünü üstlendiği öne sürülebilir (Şekil 3.11B). Deneylerde hücreler hipoksik inkübasyondan çıkarıldıktan sonra normoksida 30 dakika içerisinde kayıt alındığı göz önünde bulundurulduğunda gözlenen NBCn1 akı artışının reoksijenasyon ile geri dönüşlü olmadığını düşündürmektedir. Buna karşılık NHE1 veya NBC'nin tek başına asit yükünden kurtularak hücrenin normal bazal pH_i 'sına (7,2-7,3) getirebilmektedir (Şekil 3.7C). Yukarıda bahsedildiği gibi NHE1 ve NBC akut anoksi sırasında inhibe olduğundan bazal pH_i anoksik şartlarda aside kaymaktadır (Şekil 3.8A,B). Anoksiden çıkıldıktan sonra normoksida bu inhibisyonlar saniyeler içerisinde geri dönmektedir. Tüm bu bulgular hipoksinin şiddet ve süresine bağlı olarak hipoksida farklı yolların aktive olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 4.1). Uzun süreli hipoksinin NBC akısına etkisini incelemek için ilk önce hipoksinin β_1 ve zoniporid etkinliği üzerindeki etkisi incelendi. Hipoksik koşullar β_1 'yi ve zoniporidin NHE1 inhibitör özelliğini değiştirmeden NBC akısını artırdı (Şekil 3.6C; Şekil 3.7A). HL-1 hücrelerinde yapılan çalışmalarda 48 saatlik %1 O_2 hipoksik koşullarda inkübasyonun apoptozisi tetiklediği ve hücrelerin canlılığını azalttığını da göstermektedir (Ambrose ve ark., 2014; Hu ve ark., 2010). Bu durumda genel olarak her formdaki transport aktivitesinin azalması gerekirken bulgularımıza göre NBC aktivitesi artmaktadır. Hipoksida NHE1 aktivitesi inhibe olduğundan NBC aktivitesinin uzun süreli hipoksiden özgül biçimde etkilendiği düşünülebilir. Akut anoksida ise tam ters olarak NBC aktivitesi inhibe oldu. Anoksi oluşturmak için kullanılan oksijen süpürücüsü sodyum ditionit konsantrasyonuna bağlı olarak O_2 miktarını azalttığı (Şekil 2.2B) göz önünde bulundurulduğunda NBC üzerindeki akut inhibe edici etkinin hipoksinin şiddetine (0,1-1 mM DT) bağlı olarak geliştiği anlaşılmaktadır. Akut anoksinin mekanizmasında hücredeki ATP seviyesinin azalması rol oynayabilir. Daha önceki bulgularımız, HL-1 ve sıçan ventrikül hücrelerinde hipoksik/anoksik koşullarda

hücre içi ATP miktarının azaldığını gösterdi. Bu metabolik inhibisyonun membrandaki fosfolipitler ile PIP_2 arasındaki ilişkiyi zayıflatarak NHE1 aracılı J_H inhibisyonunda rol oynadığı da gösterildi (Kandilci ve ark., 2020; Simsek ve ark., 2019). Düzenleyici proteinlerin ve PIP_2 gibi ikincil habercilerin NBCn1 izoformunu aktive ettiği ileri sürülmüştür (Danielsen ve ark., 2013; Hong ve ark., 2013). Bu tez çalışması sırasında gözlenen NBCn1 stimülasyonunun da PIP_2 yolağı aracılı olma ihtimalini düşündürmektedir. Akut anoksi süresinde (yaklaşık 10 dakika) Hif üzerinden etki oluşma ihtimali zayıf olsada uzun süreli hipokside Hif etkisi ön plana çıkabilir. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmada 48 saat hipoksi ya da normokside Hif birikimi yaparak hipoksiyi taklit eden DMOG (1 mM) inkübasyonu ile hücre çekirdeğinde benzer miktarda Hif-1 α birikimi görüldü (Simsek ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında da hipoksik yolak, DMOG kimyasalı ile farmakolojik olarak aktive edildiğinde hipokside olduğu gibi bikarbonat aracılı akının arttığı, protein seviyesinin değişmediği ve depolarizasyona bağlı olarak V_{maks} 'ın arttığı gözlemlendi. Bu bulgulardan hipoksi ile gözlenen NBC artışının Hif aracılı olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda Hif'in NHE1'in promoter bölgesine bağlanarak transkripsiyonunu etkilediği gösterilmiştir (Lucien ve ark., 2011). 48 saat hipoksi veya normokside DMOG inkübasyonu NBC transkripsiyonunu artırmadı. Ayrıca NBC geninde NHE1'de olduğu gibi (Lucien ve ark., 2011) HRE dizisinin bağlanacağı bölgeler bulunmamaktadır. Dolayısıyla gözlenen NBC akısındaki artışın Hif'in kanonik etkileşiminden kaynaklanma olasılığı düşüktür. Gözlenen Hif bağımlı NBC akısındaki artış dolaylı olarak protein fosforilasyonu üzerinden gerçekleşebilir. Literatürde kedi ventrikülünde anjiyotensin II'nin reaktif oksijen türleri (ROS) ve ERK bağımlı mekanizma ile NBCn1 izoformunu stimule ettiği rapor edilmiştir (De Giusti ve ark., 2009). Daha önceki bulgularımız bu tez çalışmasında uygulanan hipoksi protokolü ile hücre içi ROS miktarının arttığını gösterdi (Şimşek ve Kandilci, 2018). Kedi ventrikül çalışmasında gözlenen NBCn1 akısındaki artış bizim bulgularımızla uyumlu ve hipoksik koşullarda gözlediğimiz ROS artışı ile korele gözükmektedir. Diğer bir olasılık hipoksi ile NBCn1 stimülasyonundan dolaylı olarak karbonik anhidraz (CA) rol alabilir. Hücre içi CA enzimlerinin (örnek: CA9) CO_2 'nin hidrasyonunda katalizör rolünden dolayı sıçan ventrikülünde NBC aktivitesini artırabildiği bilinmektedir (Villafuerte ve ark., 2014). Hipokside (%1 O_2 ,

20 saat) Hif aracılı CA9 enziminin artış gösterdiği (Bourseau-Guilmain ve ark., 2016) rapor edilmiştir. Dolayısıyla gözlediğimiz artıştan CA9 aktivitesindeki artış sorumlu olabilir. Ancak bu katalizör etkiden sadece NBCn1'in etkileniyor olması bu hipotez hakkında soru işareti oluşturmaktadır. Hipoksinin kalp dışındaki çeşitli kanser hücrelerinde p38 kinazı aktive ettiği ve p38 kinaz aktivasyonunun kalpte NBCe1'i inhibe ettiği bilinmektedir (Khandrika ve ark., 2009; Xu ve ark., 2004). Bu tez çalışmasında hipoksi ile NBCe1 aracılı akıda bir değişiklik gözlenmedi. Dolayısıyla bu sonuç NBCe1 regülasyonunda dokuya özgü farklı yolların aktive olabileceğini düşündürmektedir. Daha önceki çalışmamızda, NHE1 proteinin HL-1 hücrelerinde hipoksi ile internalize olarak inhibe oldu (Simsek ve ark., 2019). Hipoksik koşullarda diğer membran proteinlerinin de internalize olduğu bilinmektedir (Bourseau-Guilmain ve ark., 2016). Hipoksi ile NBC proteinlerinin internalize olduğu konusunda bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Literatürde hipertrofik sıçan ventrikülünde NBCe1'in anjiotensin II uyarısı ile erken endozoma gittiği gösterilmiştir (Orlowski ve ark., 2014). Benzer şekilde NBCe1'in ParC5 (tükürük hücre serisi) hücrelerinde kolinerjik uyarı ile PKC aracılı, sıçan ince bağırsak dokusunda ise karbokol varlığında erken endozoma internalize olduğu rapor edilmiştir (Jakab ve ark., 2011; Perry ve ark., 2008). Ancak, bu tez çalışmasında NBCe1 aracılı akıda herhangi bir azalma gözlenmediğinden internalize olma olasılığının düşük olduğu düşünülmektedir. NBCe1 enerjinin korunması açısından NHE1 ya da NBCn1'den daha verimlidir. NHE1 ve NBCn1'in yarısı kadar Na^+ eşleşmesi vardır (Bir Na^+ iyonuna karşılık iki asit eşdeğer HCO_3^- iyon transportunu gerçekleştirmektedir). Böylece diğer asit atan transportörler ile karşılaştırıldığında NBCe1 hücrede Na^+ iyonu tasarrufu sağladığı düşünülebilir. Ancak, bulgularımıza göre hipoksida NBCe1 akısında değişiklik olmadığından hücrede pH_i regülasyonunda enerji tasarrufu olduğu yönünde bir bulgu elde edilmedi. Ayrıca hipoksida kalp hücresinde aksiyon potansiyeli süresinin değişmesi de yüksek olasılıklı gözükmemektedir (NBCe1 akısı membran hiperpolarizasyonu oluşturur).



Şekil 4.1. HL-1 hücrelerinde NBC izoformlarının hipoksi veya DMOG ile regülasyon mekanizmasını gösteren model. ↑ geri dönüşsüz stimülasyonu, ⊥ geri dönüşlü inhibisyonu göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular HL-1 hücrelerinde NHE1 ve NBC (NBCe1 ve NBCn1) proteinleri aracılığıyla asit atımının gerçekleştiğini göstermektedir. Hipoksik koşullarda (%1 O₂, 48 saat) NBC aktivitesindeki artışın NBCn1'in H⁺'na afinite artışından kaynaklandığına işaret etmektedir. Bu artışın mekanizmasında Hif'in rolünün olduğu anlaşılmaktadır. NBCe1 ise hipoksik şartlardan etkilenmedi. Kısa süreli anoksi ise NBC aktivitesini inhibe ettiği ve kısa sürede Hif'in etki göstermesi olası gözükmediğinden Hif'in rolünün olmadığını düşündürdü.

İleriki çalışmalarımızda hipoksida gözlenen NBCn1 artışındaki ROS/ERK, CA9 yolaklarının rolünü araştırmak amacıyla hipoksik hücrelerde bu yolda etkili inhibitörler kullanılarak deneylerin tekrar edilmesi planlanmaktadır. Ayrıca, akut anoksideki NBC inhibisyon yolağındaki PIP₂ katkısı inhibitörleri kullanılarak aydınlatılacaktır.

ÖZET

Kardiyomiyositlerde Hipoksi ile İndüklenen Bikarbonat Transport Regülasyonunun İncelenmesi

Hücre içi pH (pH_i) hücre fonksiyonunun ana modülatörüdür. Memeli kalbinde pH_i hücre membranında bulunan asit baz transportörleri ile dar bir aralıkta (7,1-7,3) tutulur. Na^+/H^+ değiş-tokuşçusu (NHE1) ve Na^+/HCO_3^- ko-transportörü (NBC), kardiyomiyositlerde asit atan başlıca membran proteinleridir. Kalpte, NBC proteininin elektrojenik (NBCe1/NBCE2) ve elektronötral (NBCn1) izoformları bulunur. Memeli kardiyomiyositlerinde hipoksinin NBC akısı üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, fare atrial tümör kökenli HL-1 hücrelerinde hipoksinin (%1 O_2 , 48 saat) ve akut anoksinin (1 mM DT, 10 dakika) NBC akısı üzerindeki etkisi ilk kez araştırıldı. Bu hücrelere amonyum ön-yükleme işlemi ile asit yüklendi ve NBC akısı pH-duyarlı SNARF boyası kullanılarak ölçüldü. HL-1 hücrelerinde NBCe1 ve NBCn1 izoformlarının eksprese olduğu ancak NBCE2 izoformunun eksprese olmadığı bulundu. Hücre dışı pH (pH_o) 7,4'te tutulduğunda hipoksik koşullarda NBC akısının pH duyarlılığında artış gözlemlendi. Bu artış hipoksik koşullardaki tamponlama kapasitesi değişikliklerine bağlı değildi. Hipoksi ile NBCe1 ve NBCn1 protein seviyelerini etkilemedi ancak NBCE1 mRNA düzeyinde artış gözlemlendi. Normoksida hücre içinde hipoksi ile indüklenen faktör (Hif) birikimi yaparak hipoksiyi taklit eden dimetiloksalilglisin (DMOG) ile hipoksida gözlenen protein ve NBC akısı sonuçları tekrarlandı. Bu sonuçlar hipoksida NBC akısındaki artışın Hif aracılı olduğuna işaret etmektedir. Ancak, akut anoksida ise NBC akısı inhibe oldu. Sonuç olarak, akut anoksi ve uzun süreli hipoksi NBC akısını farklı yollar aracılığı ile regüle etmektedir. Hipoksida artan NBC akısının hiperkalemik solüsyonlara duyarlılığından elektrojenik (NBCe1) ve nötral (NBCn1) izoformların katkısı aydınlatıldı. Sonuçlarımız Hif bağımlı NBC akı artışından NBCn1 izoformunun sorumlu olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Bikarbonat transportu, Hif, Hipoksi, Hücre içi pH.

SUMMARY

Investigation of hypoxia induced bicarbonate transport regulation in cardiomyocytes

Intracellular pH (pH_i) is a major modulator of cell function. pH_i is controlled strictly by sarcolemmal acid-base transporters between tight limits (7.1-7.3) in mammalian heart. Na^+/H^+ exchanger (NHE1) and $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ co-transporter (NBC) are the main acid extruding membrane proteins in cardiomyocytes. There are electrogenic (NBCe1 /NBCe2) and electroneutral (NBCn1) isoforms in heart tissue. The effect of hypoxia on NBC flux in mammalian cardiomyocytes is currently unknown. In this thesis, the effect of hypoxia (1% O_2 , 48 hours) and acute anoxia (1 mM DT, 10 minutes) on NBC flux was investigated for the first time in mouse atrial derived HL-1 cells. Intracellular acid load was achieved with ammonium prepulse method and NBC flux was measured using pH-sensitive SNARF dye. NBCe1 and NBCn1 isoforms were detected but not NBCe2 in HL-1 cells. When extracellular pH (pH_o) was kept at 7.4, pH_i -sensitivity of NBC flux was increased in hypoxia. This increased sensitivity was not due to buffering capacity changes under hypoxic conditions. Moreover, hypoxia did not affect NBCe1 and NBCn1 protein levels but interestingly NBCe1 mRNA levels were increased. These results were also repeated with a hypoxia mimetic agent, dimethylloxalilglycine (DMOG), that accumulates hypoxia inducible factor (Hif) in cytoplasm under normoxic conditions. According to these findings the increased sensitivity of NBC flux is Hif-mediated. In contrast, NBC flux was inhibited under acute anoxia conditions. As a result, acute anoxia and long term hypoxia regulate NBC flux by different mechanisms. Contribution of electrogenic (NBCe1) and electroneutral (NBCn1) isoforms was dissected out by the response of the acidic recovery to hyperkalemic solutions under hypoxia. Our results showed that NBCn1 isoform is responsible from the hypoxia induced Hif-dependent increase in NBC flux.

Keywords: Bicarbonate transport, Hif, Hypoxia, Intracellular pH.

KAYNAKLAR

- AIELLO EA, PETROFF MG, MATTIAZZI AR, CINGOLANI HE (1998). Evidence for an electrogenic Na^+ - HCO_3^- symport in rat cardiac myocytes. *J Physiol*,**512** (Pt 1): 137-148.
- AMBROSE LJ, ABD-JAMIL AH, GOMES RS, CARTER EE, CARR CA, CLARKE K, HEATHER LC (2014). Investigating mitochondrial metabolism in contracting HL-1 cardiomyocytes following hypoxia and pharmacological HIF activation identifies HIF-dependent and independent mechanisms of regulation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*,**19**: 574-585.
- BAETZ D, HAWORTH RS, AVKIRAN M, FEUVRAY D (2002). The ERK pathway regulates Na^+ - HCO_3^- cotransport activity in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,**283**: H2102-2109.
- BORON WF, BOULPAEP EL (1983). Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO_3^- transport. *J Gen Physiol*,**81**: 53-94.
- BORON WF, CHEN L, PARKER MD (2009). Modular structure of sodium-coupled bicarbonate transporters. *J Exp Biol*,**212**: 1697-1706.
- BOURSEAU-GUILMAIN E, MENARD JA, LINDQVIST E, INDIRA CHANDRAN V, CHRISTIANSON HC, CEREZO MAGAÑA M, LIDFELDT J, MARKO-VARGA G, WELINDER C, BELTING M (2016). Hypoxia regulates global membrane protein endocytosis through caveolin-1 in cancer cells. *Nat Commun*,**7**: 11371.
- BUGAISKY LB, ZAK R (1989). Differentiation of Adult-Rat Cardiac Myocytes in Cell-Culture. *Circ Res*,**64**: 493-500.
- CARROLL CP, BOLLAND H, VANCAUWENBERGHE E, COLLIER P, RITCHIE AA, CLARKE PA, GRABOWSKA AM, HARRIS AL, MCINTYRE A (2022). Targeting hypoxia regulated sodium driven bicarbonate transporters reduces triple negative breast cancer metastasis. *Neoplasia*,**25**: 41-52.
- CH'EN FF, VILLAFUERTE FC, SWIETACH P, COBDEN PM, VAUGHAN-JONES RD (2008). S0859, an N-cyanosulphonamide inhibitor of sodium-bicarbonate cotransport in the heart. *Br J Pharmacol*,**153**: 972-982.
- CHOI I, AALKJAER C, BOULPAEP EL, BORON WF (2000). An electroneutral sodium/bicarbonate cotransporter NBCn1 and associated sodium channel. *Nature*,**405**: 571-575.
- CLAYCOMB WC, LANSON NA, STALLWORTH BS, EGELAND DB, DELCARPIO JB, BAHINSKI A, IZZO NJ (1998). HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *P Natl Acad Sci USA*,**95**: 2979-2984.
- DANIELSEN AA, PARKER MD, LEE S, BORON WF, AALKJAER C, BOEDTKJER E (2013). Splice cassette II of Na^+ , HCO_3^- cotransporter NBCn1 (slc4a7) interacts with calcineurin A: implications for transporter activity and intracellular pH control during rat artery contractions. *J Biol Chem*,**288**: 8146-8155.
- DART C, VAUGHAN-JONES RD (1992). Na^+ - HCO_3^- symport in the sheep cardiac Purkinje fibre. *J Physiol*,**451**: 365-385.

- DE GIUSTI VC, CIANCIO MC, ORLOWSKI A, AIELLO EA (2013). Modulation of the cardiac sodium/bicarbonate cotransporter by the renin angiotensin aldosterone system: pathophysiological consequences. *Front Physiol*,**4**: 411.
- DE GIUSTI VC, GARCARENA CD, AIELLO EA (2009). Role of reactive oxygen species (ROS) in angiotensin II-induced stimulation of the cardiac Na⁺/HCO₃⁻ cotransport. *J Mol Cell Cardiol*,**47**: 716-722.
- DE GIUSTI VC, ORLOWSKI A, AIELLO EA (2010). Angiotensin II inhibits the electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransport of cat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*,**49**: 812-818.
- DE GIUSTI VC, ORLOWSKI A, VILLA-ABRILLE MC, DE CINGOLANI GE, CASEY JR, ALVAREZ BV, AIELLO EA (2011). Antibodies against the cardiac sodium/bicarbonate cotransporter (NBCe1) as pharmacological tools. *Br J Pharmacol*,**164**: 1976-1989.
- DOUGLAS RM, XUE J, CHEN JY, HADDAD CG, ALPER SL, HADDAD GG (2003). Chronic intermittent hypoxia decreases the expression of Na/H exchangers and HCO₃⁻-dependent transporters in mouse CNS. *J Appl Physiol* (1985),**95**: 292-299.
- GIANNAKI M, RUF DE, PFEIFER E, EVERAERTS K, HEILAND DH, SCHNELL O, ROSE CR, ROUSSA E (2022). Cell-Type Dependent Regulation of the Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporter 1 (NBCe1) by Hypoxia and Acidosis in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*,**23**
- GORBATENKO A, OLESEN CW, BOEDTKJER E, PEDERSEN SF (2014). Regulation and roles of bicarbonate transporters in cancer. *Front Physiol*,**5**: 130.
- GOTTLIEB RA, GRUOL DL, ZHU JY, ENGLER RL (1996). Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J Clin Invest*,**97**: 2391-2398.
- GRACE AA, KIRSCHENLOHR HL, METCALFE JC, SMITH GA, WEISSBERG PL, CRAGOE EJ, JR., VANDENBERG JI (1993). Regulation of intracellular pH in the perfused heart by external HCO₃⁻ and Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange. *Am J Physiol*,**265**: H289-298.
- GROSS E, HAWKINS K, PUSHKIN A, SASSANI P, DUKKIPATI R, ABULADZE N, HOPFER U, KURTZ I (2001). Phosphorylation of Ser(982) in the sodium bicarbonate cotransporter kNBC1 shifts the HCO₃⁽⁻⁾ : Na⁽⁺⁾ stoichiometry from 3 : 1 to 2 : 1 in murine proximal tubule cells. *J Physiol*,**537**: 659-665.
- HONG JH, YANG D, SHCHEYNIKOV N, OHANA E, SHIN DM, MUALLEM S (2013). Convergence of IRBIT, phosphatidylinositol (4,5) biphosphate, and WNK/SPAK kinases in regulation of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporters family. *Proc Natl Acad Sci U S A*,**110**: 4105-4110.
- HU SJ, HUANG M, LI ZJ, JIA FJ, GHOSH ZM, LIJKWAN MA, FASANARO P, SUN N, WANG X, LI FM, ROBBINS RC, WU JC (2010). MicroRNA-210 as a Novel Therapy for Treatment of Ischemic Heart Disease. *Circulation*,**122**: S124-S131.
- HUBBI ME, SEMENZA GL (2015). Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. *Am J Physiol Cell Physiol*,**309**: C775-782.
- HULIKOVA A, HARRIS AL, VAUGHAN-JONES RD, SWIETACH P (2013). Regulation of intracellular pH in cancer cell lines under normoxia and hypoxia. *J Cell Physiol*,**228**: 743-752.
- HUNTON DL, LUCCHESI PA, PANG Y, CHENG X, DELL'ITALIA LJ, MARCHASE RB (2002). Capacitative calcium entry contributes to nuclear factor of activated T-cells nuclear translocation and hypertrophy in cardiomyocytes. *J Biol Chem*,**277**: 14266-14273.

- JACOBSON SL, PIPER HM (1986). Cell-Cultures of Adult Cardiomyocytes as Models of the Myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*,**18**: 661-678.
- JAKAB RL, COLLACO AM, AMEEN NA (2011). Physiological relevance of cell-specific distribution patterns of CFTR, NKCC1, NBCe1, and NHE3 along the crypt-villus axis in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,**300**: G82-98.
- KANDILCI HB, RICHARDS MA, FOURNIER M, ŞİMŞEK G, CHUNG YJ, LAKHAL-LITTLETON S, SWIETACH P (2020). Cardiomyocyte Na(+)/H(+) Exchanger-1 Activity Is Reduced in Hypoxia. *Front Cardiovasc Med*,**7**: 617038.
- KE Q, COSTA M (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*,**70**: 1469-1480.
- KHANDOUDI N, ALBADINE J, ROBERT P, KRIEF S, BERREBI-BERTRAND I, MARTIN X, BEVENSEE MO, BORON WF, BRIL A (2001). Inhibition of the cardiac electrogenic sodium bicarbonate cotransporter reduces ischemic injury. *Cardiovasc Res*,**52**: 387-396.
- KHANDRIKA L, LIEBERMAN R, KOUL S, KUMAR B, MARONI P, CHANDHOKE R, MEACHAM RB, KOUL HK (2009). Hypoxia-associated p38 mitogen-activated protein kinase-mediated androgen receptor activation and increased HIF-1alpha levels contribute to emergence of an aggressive phenotype in prostate cancer. *Oncogene*,**28**: 1248-1260.
- LAGADIC-GOSSMANN D, BUCKLER KJ, VAUGHAN-JONES RD (1992). Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol*,**458**: 361-384.
- LAGADIC-GOSSMANN D, VAUGHAN-JONES RD (1993). Coupling of dual acid extrusion in the guinea-pig isolated ventricular myocyte to alpha 1- and beta-adrenoceptors. *J Physiol*,**464**: 49-73.
- LAN X, YIN X, WANG R, LIU Y, ZHANG Y (2009). Comparative study of cellular kinetics of reporter probe [(131)I]FIAU in neonatal cardiac myocytes after transfer of HSV1-tk reporter gene with two vectors. *Nucl Med Biol*,**36**: 207-213.
- LANSON NA, EGELAND DB, ROYALS BA, CLAYCOMB WC (2000). The MRE11-NBS1-RAD50 pathway is perturbed in SV40 large T antigen-immortalized AT-1, AT-2 and HL-1 cardiomyocytes. *Nucleic Acids Research*,**28**: 2882-2892.
- LAZDUNSKI M, FRELIN C, VIGNE P (1985). The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol*,**17**: 1029-1042.
- LEEM CH, LAGADIC-GOSSMANN D, VAUGHAN-JONES RD (1999). Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol*,**517** (Pt 1): 159-180.
- LEEM CH, VAUGHAN-JONES RD (1998). Out-of-equilibrium pH transients in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol*,**509** (Pt 2): 471-485.
- LI JM, LEE S, ZAFAR R, SHIN E, CHOI I (2021). Sodium bicarbonate transporter NBCe1 regulates proliferation and viability of human prostate cancer cells LNCaP and PC3. *Oncol Rep*,**46**
- LIU Y, YANG J, CHEN LM (2015). Structure and Function of SLC4 Family [Formula: see text] Transporters. *Front Physiol*,**6**: 355.
- LOH SH, JIN JS, TSAI CS, CHAO CM, CHIUNG CS, CHEN WH, LIN CI, CHUANG CC, WEI J (2002). Functional evidence for intracellular acid extruders in human ventricular myocardium. *Jpn J Physiol*,**52**: 277-284.

- LOISELLE FB, MORGAN PE, ALVAREZ BV, CASEY JR (2004). Regulation of the human NBC3 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter by carbonic anhydrase II and PKA. *Am J Physiol Cell Physiol*,**286**: C1423-1433.
- LOUCH WE, BITO V, HEINZEL FR, MACIANSKIENE R, VANHAECKE J, FLAMENG W, MUBAGWA K, SIPIDO KR (2004). Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules-a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*,**62**: 63-73.
- LOUCH WE, SHEEHAN KA, WOLSKA BM (2011). Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol*,**51**: 288-298.
- LU M, JIA M, WANG Q, GUO Y, LI C, REN B, QIAN F, WU J (2021). The electrogenic sodium bicarbonate cotransporter and its roles in the myocardial ischemia-reperfusion induced cardiac diseases. *Life Sci*,**270**: 119153.
- LUCIEN F, BROCHU-GAUDREAU K, ARSENAULT D, HARPER K, DUBOIS CM (2011). Hypoxia-induced invadopodia formation involves activation of NHE-1 by the p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK). *PLoS One*,**6**: e28851.
- MCINTYRE A, HULIKOVA A, LEDAKI I, SNELL C, SINGLETON D, STEERS G, SEDEN P, JONES D, BRIDGES E, WIGFIELD S, LI JL, RUSSELL A, SWIETACH P, HARRIS AL (2016). Disrupting Hypoxia-Induced Bicarbonate Transport Acidifies Tumor Cells and Suppresses Tumor Growth. *Cancer Res*,**76**: 3744-3755.
- ORLOWSKI A, CIANCIO MC, CALDIZ CI, DE GIUSTI VC, AIELLO EA (2014). Reduced sarcolemmal expression and function of the NBCe1 isoform of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter in hypertrophied cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res*,**101**: 211-219.
- ORLOWSKI A, DE GIUSTI VC, CIANCIO MC, ESPEJO MS, AIELLO EA (2016). The cardiac electrogenic sodium/bicarbonate cotransporter (NBCe1) is activated by aldosterone through the G protein-coupled receptor 30 (GPR 30). *Channels (Austin)*,**10**: 428-434.
- ORLOWSKI A, DE GIUSTI VC, MORGAN PE, AIELLO EA, ALVAREZ BV (2012). Binding of carbonic anhydrase IX to extracellular loop 4 of the NBCe1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter enhances NBCe1-mediated HCO₃⁻ influx in the rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol*,**303**: C69-80.
- PERRY C, QUISSELL DO, REYLAND ME, GRICHTCHENKO, II (2008). Electrogenic NBCe1 (SLC4A4), but not electroneutral NBCn1 (SLC4A7), cotransporter undergoes cholinergic-stimulated endocytosis in salivary ParC5 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*,**295**: C1385-1398.
- PFAFFL MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*,**29**: e45.
- POWELL T, TWIST VW (1976). A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochem Biophys Res Commun*,**72**: 327-333.
- PRASAD V, LORENZ JN, MILLER ML, VAIRAMANI K, NIEMAN ML, WANG Y, SHULL GE (2013). Loss of NHE1 activity leads to reduced oxidative stress in heart and mitigates high-fat diet-induced myocardial stress. *J Mol Cell Cardiol*,**65**: 33-42.
- PUSHKIN A, ABULADZE N, NEWMAN D, LEE I, XU G, KURTZ I (2000). Cloning, characterization and chromosomal assignment of NBC4, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *Biochim Biophys Acta*,**1493**: 215-218.

- ROMERO MF (2001). The electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter, *NBC. Jop*,**2**: 182-191.
- ROMERO MF, CHEN AP, PARKER MD, BORON WF (2013). The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. *Mol Aspects Med*,**34**: 159-182.
- ROMERO MF, FULTON CM, BORON WF (2004). The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. *Pflugers Arch*,**447**: 495-509.
- ROMERO MF, HEDIGER MA, BOULPAEP EL, BORON WF (1997). Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *Nature*,**387**: 409-413.
- ROOS A, BORON WF (1981). Intracellular pH. *Physiol Rev*,**61**: 296-434.
- SEMENZA GL, WANG GL (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*,**12**: 5447-5454.
- SHCHEYNIKOV N, SON A, HONG JH, YAMAZAKI O, OHANA E, KURTZ I, SHIN DM, MUALLEM S (2015). Intracellular Cl⁻ as a signaling ion that potently regulates Na⁺/HCO₃⁻ transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*,**112**: E329-337.
- SHIRAKABE K, PRIORI G, YAMADA H, ANDO H, HORITA S, FUJITA T, FUJIMOTO I, MIZUTANI A, SEKI G, MIKOSHIBA K (2006). IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter 1 (pNBC1). *Proc Natl Acad Sci U S A*,**103**: 9542-9547.
- ŞİMŞEK G, KANDILCI HB (2018). Hipoksi- Reoksijenasyon ile İndüklenen Kardiyak Mitokondrial Disfonksiyon. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*.**71(3)**: 139-144.
- SIMSEK G, VAUGHAN-JONES RD, SWIETACH P, KANDILCI HB (2019). Recovery from hypoxia-induced internalization of cardiac Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 1 requires an adequate intracellular store of antioxidants. *J Cell Physiol*,**234**: 4681-4694.
- SUN B, LEEM CH, VAUGHAN-JONES RD (1996). Novel chloride-dependent acid loader in the guinea-pig ventricular myocyte: part of a dual acid-loading mechanism. *J Physiol*,**495** (Pt 1): 65-82.
- SWIETACH P, VAUGHAN-JONES RD (2005). Spatial regulation of intracellular pH in the ventricular myocyte. *Ann N Y Acad Sci*,**1047**: 271-282.
- THORNELL IM, BEVENSEE MO (2015). Regulators of Slc4 bicarbonate transporter activity. *Front Physiol*,**6**: 166.
- THORNELL IM, WU J, LIU X, BEVENSEE MO (2012). PIP₂ hydrolysis stimulates the electrogenic Na⁺-bicarbonate cotransporter NBCe1-B and -C variants expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol*,**590**: 5993-6011.
- TRACEY WR, ALLEN MC, FRAZIER DE, FOSSA AA, JOHNSON CG, MARALA RB, KNIGHT DR, GUZMAN-PEREZ A (2003). Zoniporide: a potent and selective inhibitor of the human sodium-hydrogen exchanger isoform 1 (NHE-1). *Cardiovasc Drug Rev*,**21**: 17-32.
- VAIRAMANI K, PRASAD V, WANG Y, HUANG W, CHEN Y, MEDVEDOVIC M, LORENZ JN, SHULL GE (2018). NBCe1 Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter ablation causes reduced apoptosis following cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo. *World J Cardiol*,**10**: 97-109.
- VAUGHAN-JONES RD, SPITZER KW, SWIETACH P (2006a). Spatial aspects of intracellular pH regulation in heart muscle. *Prog Biophys Mol Biol*,**90**: 207-224.

- VAUGHAN-JONES RD, SPITZER KW, SWIETACH P (2009). Intracellular pH regulation in heart. *J Mol Cell Cardiol*,**46**: 318-331.
- VAUGHAN-JONES RD, VILLAFUERTE FC, SWIETACH P, YAMAMOTO T, ROSSINI A, SPITZER KW (2006b). pH-Regulated Na⁽⁺⁾ influx into the mammalian ventricular myocyte: the relative role of Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange and Na⁽⁺⁾-HCO⁻ Co-transport. *J Cardiovasc Electrophysiol*,**17 Suppl 1**: S134-s140.
- VILLA-ABRILLE MC, PETROFF MG, AIELLO EA (2007). The electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransport modulates resting membrane potential and action potential duration in cat ventricular myocytes. *J Physiol*,**578**: 819-829.
- VILLAFUERTE FC, SWIETACH P, YOUM JB, FORD K, CARDENAS R, SUPURAN CT, COBDEN PM, ROHLING M, VAUGHAN-JONES RD (2014). Facilitation by intracellular carbonic anhydrase of Na⁺ -HCO₃⁻ co-transport but not Na⁺ / H⁺ exchange activity in the mammalian ventricular myocyte. *J Physiol*,**592**: 991-1007.
- WANG HS, CHEN Y, VAIRAMANI K, SHULL GE (2014). Critical role of bicarbonate and bicarbonate transporters in cardiac function. *World J Biol Chem*,**5**: 334-345.
- WEIDEMANN A, JOHNSON RS (2008). Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ*,**15**: 621-627.
- XU L, PATHAK PS, FUKUMURA D (2004). Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res*,**10**: 701-707.
- YAMAGUCHI S, ISHIKAWA T (2012). IRBIT reduces the apparent affinity for intracellular Mg²⁺ in inhibition of the electrogenic Na⁺ -HCO₃⁻ cotransporter NBCe1-B. *Biochem Biophys Res Commun*,**424**: 433-438.
- YAMAMOTO T, SHIRAYAMA T, SAKATANI T, TAKAHASHI T, TANAKA H, TAKAMATSU T, SPITZER KW, MATSUBARA H (2007). Enhanced activity of ventricular Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,**293**: H1254-1264.
- YAMAMOTO T, SWIETACH P, ROSSINI A, LOH SH, VAUGHAN-JONES RD, SPITZER KW (2005). Functional diversity of electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in ventricular myocytes from rat, rabbit and guinea pig. *J Physiol*,**562**: 455-475.
- YAO H, AZAD P, ZHAO HW, WANG J, POULSEN O, FREITAS BC, MUOTRI AR, HADDAD GG (2016). The Na⁽⁺⁾/HCO₃⁽⁻⁾ co-transporter is protective during ischemia in astrocytes. *Neuroscience*,**339**: 329-337.

