



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DEMİR EKSİKLİĞİNİN HL-1 KARDİYOMİYOSİTLERİNDE MİTOKONDİRİ FONKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ VE HİPOKSİ İLE İNDÜKLENEN FAKTÖRLERİN ROLÜ

Tuğba ZIRAPLI

**GIDA METABOLİZMA VE KLİNİK BESLENME ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ

ANKARA

2021

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DEMİR EKSİKLİĞİNİN HL-1 KARDİYOMİYOİTİLERİNDE
MİTOKONDİR FONKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ VE
HİPOKSİ İLE İNDÜKLENEN FAKTÖRLERİN ROLÜ**

Tuğba ZİRAPLI

**GIDA METABOLİZMA VE KLİNİK BESLENME ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ

**Bu araştırma Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
19L0230012 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum 'Demir Eksikliğinin Mitokondri Fonksiyonu Üzerine Etkisi ve Hipoksi ile İndüklenen Faktörlerin Rolü' 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.

Tuğba ZIRAPLI

21.01.2021

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Gıda Metabolizma ve Klinik Beslenme Anabilim Dalında
Tuğba ZIRAPLI tarafından hazırlanan
“Demir Eksikliğinin HL-1 Kardiyomiyositlerinde Mitokondri Fonksiyonu Üzerine
Etkisi ve Hipoksi ile İndüklenen Faktörlerin Rolü” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri
tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23.02.2021

Prof. Dr. Nuray YAZIHAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ
Ankara Üniversitesi
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Merve DENİZALTI
Hacettepe Üniversitesi
Üye

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

İmza
Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Simgeler ve kısaltmalar	vi
Şekiller	ix
1.GİRİŞ	1
1.1. Hücrelerde Demir Homeostazı ve Önemi	1
1.2. Demir Eksikliğinin Hücrede Hipoksi ile İlgili Yolaklara Etkisi	2
1.3. Normal Kalp Metabolizması ve Mitokondrial Fonksiyon	3
1.4. Mitokondrial Sitrik Asit Döngüsü ve Oksidatif Fosforilasyon	4
1.5. Kalpte Demir Eksikliği ve Hipoksi ile İlgili Yolakların Mitokondri Fonksiyonuna Etkileri	7
1.6. Demir Şelatörü Deferoksamin ve Etkisi	8
1.7. Çalışmanın Amacı	9
2. GEREÇ VE YÖNTEM	10
2.1. HL-1 Hücre Kültürü	10
2.2. İmmunofloresans	10
2.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü	11
2.4. Hücre İçi ATP Ölçümü	12
2.5. HL-1 Hücre Canlılığı Ölçümü	13
2.6. Kullanılan Solüsyonlar	13
2.7. İstatistik	13
3. BULGULAR	14
3.1. HL-1 Hücrelerinde Uzun Süreli DFO ve DMOG İnkübasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	14
3.2. HL-1 Hücrelerinde Uzun Süreli DFO ve DMOG İnkübasyonunun Çekirdek Hif-1 α Birikimine Etkisi	15
3.3. HL-1 Hücrelerinde Uzun Süreli DFO ve DMOG İnkübasyonunun Mitokondri Fonksiyonuna Etkisi	17
3.4. HL-1 Hücrelerinde Uzun Süreli DFO ve DMOG İnkübasyonunun Hücre İçi ATP Düzeyine Etkisi	20
4. TARTIŞMA	21
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	25
ÖZET	27
SUMMARY	28
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	34

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının kurgulanmasında ve gerçekleştirilmesinde her aşamada bilgi ve birikimi ile beni yönlendiren ve yol gösteren saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. H. Burak KANDİLCİ'ye içtenlikle teşekkür ederim. Çalışmaların yürütülmesinde verdiği değerli katkıları için Disiplinlerarası Gıda, Metabolizma ve Klinik Beslenme Anabilim Dalı Bölüm Başkanı saygıdeğer Prof. Dr. Nuray YAZIHAN'a ve tüm bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Biyofizik Anabilim Dalı Arş. Gör. Gül ŞİMŞEK'e tez deneylerimdeki desteğinden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca, bu süreçte her zaman yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
β	Beta
CaCl_2	Kalsiyum klorür
CO_2	Karbondioksit
Co^{2+}	Kobalt
DEA	Demir eksikliği anemisi
DFO	Deferoksamin
DMOG	2-oksooglutarat analogu dimetiloksalilglisin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMT1	Divalan metal transportörü 1
DNP	Dinitrofenol
DT	Sodyum ditionit
ETZ	Elektron transfer zinciri
e^-	Elektron
F_1F_0 -ATP sentaz	Mitokondrial ATP sentaz/kompleks V
FADH	Flavin adenin dinükleotid
FBS	Fetal sığır serumu
FCCP	Karbonil siyanid-p-trifluorometoksi-fenilhidrazon
Fe	Total demir
Fe^{2+}	Ferröz demir
Fe^{3+}	Ferrik demir

Fe-S	Demir-sülfür
H	Hidrojen iyonu/proton
Hif-1 α	Hipoksi ile indüklenen faktör 1 α
Hif-1 β	Hipoksi ile indüklenen faktör 1 β
Hepes	4-(2-hidroksietil)-1 piperazinethano sulfonik asit
HEK293	İnsan embriyonik böbrek kökenli hücre serisi
HRE	Hipoksiye duyarlı element
IF1	İnhibitör faktör 1
JC-1	1,1',3,3'-tetra etil benzamidazol karbosiyanin iyodür
KCl	Potasyum klorür
Kd	Reaksiyon ayrışma sabiti
MEF	Fare embriyonik fibroblast kökenli hücre serisi
Mg ⁺²	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum klorür
μ M	Mikro molar
mM	Mili molar
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojen fosfat
Ni ⁻²	Nikel
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen molekülü
P _i	İnorganik fosfat

PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PHD	Prolilhidroksilaz
Ψ	Mitokondri membran potansiyeli
ROS	Reaktif oksijen türevi
Sit C	Sitokrom C
Ub	Ubikutin
VHL	von Hippel Lindau



ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Hücre içindeki Hif-1 α sinyali ve yıkımını gösteren şematik model. PHD, oksijen varlığında (%21 O₂) Hif-1 α alt ünitesinin prolin rezidülerini hidroksiller. Bu hidroksilasyon, VHL, E3 Ub ligaz kompleksinin aktive eder ve Hif-1 α 'nın Ub-proteozom yolağı ile yıkılmasını sağlar. Oksijen konsantrasyonunun azalması ile Hif-1 α yıkımdan kaçarak sitoplazmada birikir ve çekirdeğe transloke olarak Hif-1 β ile birleşir. Burada hedef genlerin HRE bölgelerine bağlanarak transkripsiyonu etkiler. Benzer etkiyi PHD inhibitörü DMOG veya DFO ile PHD enziminin kofaktörü olan demirin ortamdan şelasyon ile uzaklaştırılması da yapar. PHD: prolinhidroksilaz, VHL: Von Hippel Lindau, Ub: ubiquitin, DMOG: dimetiloksalilglisin, DFO: deferoksamin, HRE: hipoksiye duyarlı element. 3
- Şekil 1.2.** Hücre mitokondrisinde sitrik asit döngüsündeki aracı molekülleri ve ATP üretimi. Pirüvik asit sitrik asit döngüsüne girmeden önce asetilko-enzim molekülüne dönüşür. 4
- Şekil 1.3.** Mitokondri iç membranındaki elektron (e⁻) transfer zinciri (ETZ) bir dizi yükseltgenme-indirgenme reaksiyonunu sürdüren moleküllerdir. ATP sentaz kompleksi membranlar arası boşluktaki H gradientini kullanarak ADP'den tekrar ATP oluşturur. Sit C: Sitokrom C; NADH: nikotinamid adenin dinükleotit; FADH: flavin adenin dinükleotit; I, II, III, IV: sırasıyla protein kompleks I, II, III ve IV; ATP sentaz: F₁F₀-ATP sentaz ya da protein kompleks V. 6
- Şekil 2.1.** HL-1 kontrol hücrelerinden kaydedilen maksimum Ψ depolarizasyon oluşturan sodyum ditionit (DT) uygulamasını (ok) gösteren örnek irase. 0,1 Hz frekansta uyarılan hücrelerde JC-1 sinyalinin dengeye gelmesinden sonra elde edilen değer bazal Ψ olarak kabul edildi. 1 mM DT uygulamasına ile oluşan yanıt hızı (eğim), başlangıçından tepe değerine kadar her noktada ayrı ölçüldü ve ortalama eğim şeklinde hesaplandı. 12
- Şekil 2.2.** Standart ATP konsantrasyonlarına karşılık gelen ışıık miktarını gösteren grafik. Kitin talimatları doğrultusunda 96'luk opak kuyularda ATP'nin iki kat seri dilüsyonları hazırlandı. 10 dakika sonra luminometrede ATP konsantrasyonuna (0,004 - 4 μ M) karşılık gelen toplam ışıık miktarından doğrusal (r²: 0,99) standart eğri oluşturuldu. Kitin çalışma prensibi kısaca luciferinin oksijenasyonunun Mg⁺² varlığında lusiferaz enzimi ile katalizlenmesine dayanmaktadır. 13
- Şekil 3.1.** IIL-1 hücrelerinde 48 saat DFO (30, 50, 100 μ M) ve DMOG (1 mM) inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi. Hücre sayıları aynı konfokal büyütmesi kullanılarak çekirdek boyanmasından elde edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ve normalize edilerek verilmiştir. (n= 3; * kontrole göre, # DMOG'a göre, ‡50 μ M DFO'ya göre p<0,05). 15
- Şekil 3.2.** IIL-1 hücrelerinin 48 saat normokside DFO (30, 50, 100 μ M) ve DMOG (1 mM) inkübasyonu ile çekirdekte Hif-1 α proteini birikimini gösteren konfokal görüntüsü. Hücreler sırasıyla Hif-1 α birincil antikor, Alexa flor 594 ikincil antikor (kırmızı) ve 2,5 μ M Yo-Pro-1 DNA boyası ile inkübe edildi. Hücre çekirdek sınırları Yo-pro-1 sinyali ile belirlendikten sonra çekirdek sınırları beyaz çizgiler ile gösterildi. Sütun grafik ise, konfokal mikrosapta birim alan başına düşen floresans şiddet ölçümünden hesaplanan çekirdek Hif-1 α miktarını göstermektedir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak ve normalize edilerek verilmiştir. (n= 3; * kontrole göre, # DMOG'a göre p<0,05). 16
- Şekil 3.3.a.** HL-1 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında 48 saat DFO (50, 100 μ M) ve DMOG (1 mM) inkübasyonunun bazal ve sodyum ditionit (DT) uygulamasının ardından kaydedilen Ψ konfokal mikroskopta çekilen anlık görüntüleri (JC-1 floresan, n=3). Hücrelerinin mitokondrileri bazal durumda (Ψ hiperpolarize, kırmızı) belirgin olarak gözlenirken DT uygulamasından sonra Ψ depolarizasyon sonucu JC-1 boyasının mitokondrideki agregat formuna ait floresan (kırmızı) kaybolmakta ve boya sitoplazmaya dağılarak yeşil floresan artmaktadır. Böylece mitokondriler artık ayırt edilememektedir (Ψ depolarize, difüz yeşil). 18
- Şekil 3.3.b.** Kontrol ve deney gruplarından (DFO ve DMOG) 0,1 Hz frekansında kaydedilen bazal ve sodyum ditionit (DT) uygulamasından (ok) sonraki JC-1 sinyalinin (Ψ) grafikleri. Deney protokolü ekli olarak şekil üstüne yerleştirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir (n=3-5). 19

Şekil 3.3.c. Kontrol ve deney gruplarında (DFO ve DMOG) sodyum ditionit (DT) uygulaması sonrasında JC-1 sinyalinin (Ψ) zamana bağlı değişim hızı. Veriler ortalama + standart hata olarak gösterilmiştir (n=3-5; * kontrole göre, $p<0,05$). 19

Şekil 3.3.d. Kontrol ve deney gruplarında (DFO ve DMOG) bazal ve sodyum ditionit (DT) uygulaması sonrasında JC-1 sinyal (Ψ) değerleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir (n=3-5). 20

Şekil 3.4. HL-1 hücrelerinde 48 saat normokside DFO ya da DMOG inkübasyonu sonrasında ölçülen ATP miktarları. Sonuçlar hücre sayısına normalize edilerek ve ortalama + SEM olarak verilmiştir (n=5, * kontrole göre, # DMOG'a göre $p<0,05$). 20

Şekil 4.1 HL-1 hücrelerinde hücre içi total demir (Fe) şelasyonunun doğrudan ve dolaylı etkilerinin şematik gösterimi. Hücre içinde Fe azalması doğrudan hücre siklusunu durdurur. Fe azalması aynı zamanda Hif-1 α üzerinden mitokondride disfonksiyona sebep olarak oksidatif fosforilasyon kaynaklı ATP üretimini azaltırken diğer taraftan glikolitik ATP üretimini artıracak yolları tetikler. —: inhibisyon; $\rightarrow$: aktivasyon; $\rightsquigarrow$: azalan aktivasyon. 25



1.GİRİŞ

1.1. Hücrelerde Demir Homeostazi ve Önemi

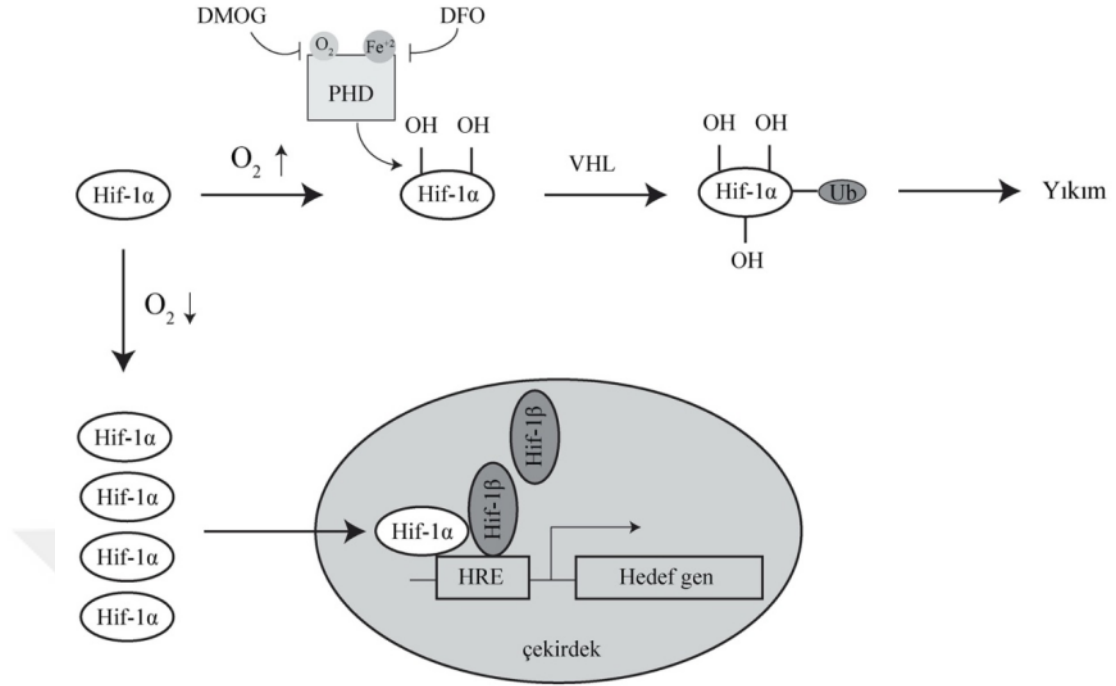
Demir, diyetle hem demir (hemoglobin ve miyoglobin yapısında) ve hem olmayan demir (inorganik) olmak üzere iki formda alınmaktadır. Hem demir, hayvansal proteinlerden (et, balık, deniz ürünleri ve kümes hayvanlarından) alınırken; hem olmayan demir bitkisel proteinlerden (tahıllar, bitkiler, sebze ve meyvelerden) alınmaktadır. Hem formu yapısında bulunan demir Fe^{-2} (ferröz), hem olmayan demir yapısında ise Fe^3 (ferrik) iyonu şeklindedir (Denic ve Agarwal, 2007). Yetersiz diyet alımı ile düşük emilim düzeylerinin sonucu olarak fizyolojik gereksinimlerin karşılanamaması ile demir eksikliği oluşmaktadır. Demir eksikliği gelişmekte olan ülkelerde %50, gelişmiş ülkelerde %10 oranlarında görülen bir sağlık sorunudur (Demaeyer ve Adiels-Tegman, 1985).

Kan plazması içindeki demir transferrine bağlı olarak taşınır. Hücreler transferrin bağlı demiri hücre yüzeyindeki transferrin reseptörleri aracılığıyla hücre içine alırlar (Lane ve ark., 2015; Young ve ark., 2018). Demir, tüm memeli hücre tiplerinde metabolik ve sinyal transdükleme için gereklidir (Lakhal-Littleton, 2019). Hem olmayan demir redoks, elektron transfer işlemi, gen ekspresyonu gibi hücresel olaylara katılan birçok enzimin kofaktörüdür (Lawen ve Lane, 2013). Hemoglobinin yapısında bulunan demir ise, oksijen alımı ve taşınmasındaki rolünün yanı sıra oksijen depolanması (myoglobin) ve metabolizmasında da (mitokondrial elektron transport zinciri komponentleri gibi) önemli role sahiptir (Haddad ve ark., 2017; Hoes ve ark., 2018). Demir, mitokondriden sentezlenen demir-sülfür ($Fe-S$) kümeleri (ilk üç kompleks) ve hem fonksiyonel grupları (sitokrom C, Kompleks II, III) için bir kofaktördür ve mitokondrial fonksiyon için gereklidir. Demir eksikliği dünyada yaygın görülen hastalıklardan biridir. Kalp yetmezliği hastalarının %50'sinde demir eksikliği görüldüğü rapor edilmiştir (Chung ve ark., 2019; Mordi ve ark., 2018). Ayrıca, etiolojisinden bağımsız olarak mitokondrial disfonksiyon kalp yetmezliğinde yaygın olarak gözlenen bir durumdur (Zhou ve Tian, 2018). Dolayısı ile,

kardiyomiyositler gibi metabolizması yüksek olan hücrelerde demir homeostazının sağlanması ve sürdürülmesi gerekir (Hoes ve ark., 2018). Mitokondri fonksiyon bozukluğu, reaktif oksijen türlerinin artmasına ya da adenosin trifosfat (ATP) üretiminde azalmaya sebep olabilir (Rineau ve ark., 2018b; Xu ve ark., 2015).

1.2. Demir Eksikliğinin Hücrede Hipoksi ile İlgili Yolaklara Etkisi

Kalpde, mitokondrial solunum haricinde hücre içi demir eksikliğinden etkilenecek bir diğer yolak prolinhidroksilaz (PHD) enzimidir (Lakhal-Littleton, 2019). Bu yolak, oksijen metabolizması ile ilişkilidir. Hücre içi oksijen konsantrasyonu azaldığında hücre içinde hipoksi ile indüklenen faktör 1 α (Hif-1 α) proteini birikmektedir. Oksijen varlığında ise PHD enzimi aracılığıyla hızla yıkılmaktadır. PHD enzimi 2-oksoglutarat bağımlı dioksijenazdır ve kofaktör olarak Fe² ve askorbatı kullanır. Oksijeni substrat olarak kullanan PHD, Hif-1 α proteininin prolin rezidülerini hidroksiller. Bu hidroksillenme sayesinde von Hippel Lindau (VHL) ubiquitin (Ub) E3 ligaz kompleksi Hif-1 α proteinini tanıır ve ubiquitin moleküllü ekler. Daha sonra poli-ubikütinasyona uğrayan Hif-1 α proteosomda yıkılır. Ortamda oksijen olmadığında ise Hif-1 α hidroksillenemez ve yıkılamadığı için sitoplazmada birikmeye başlar. Daha sonra çekirdeğe transloke olan Hif-1 α , çekirdekte Hif-1 β ile birleşerek Hif kompleksini oluşturur ve gen ekspresyonu etkiler (Ke ve Costa, 2006; Weidemann ve Johnson, 2008). PHD enziminin normoksik koşullarda, demir şelatörü deferoksamin (DFO) veya 2-oksoglutarat analogu dimetiloksalilglisin (DMOG) ile inhibe olduğu bilinmektedir. Benzer şekilde, PHD enzimindeki Fe² bağlanma bölgesine yarışmalı olarak +2 değerlikli diğer iyonlar (Ni²⁺, Co²⁺ gibi) bağlandığında enzim inaktive olmaktadır (Weidemann ve Johnson, 2008) (Şekil 1.1).



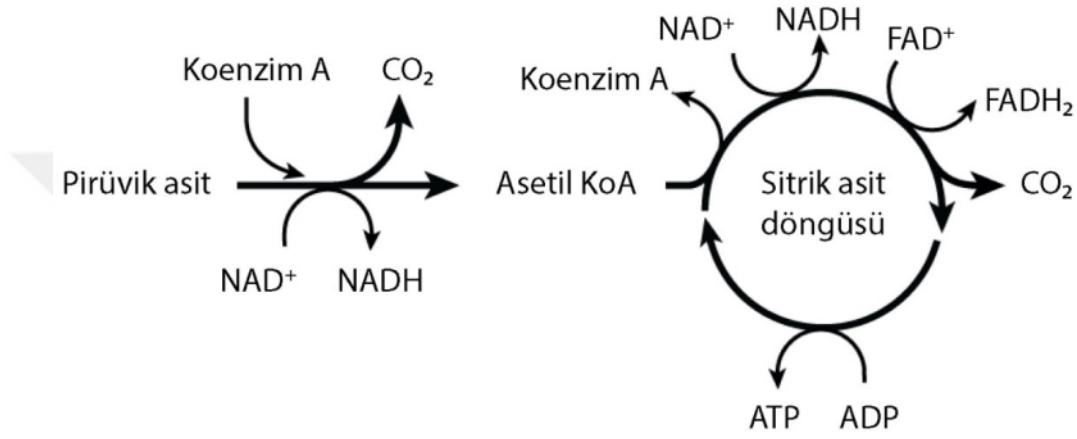
Şekil 1.1. Hücre içindeki Hif-1α sinyali ve yıkımını gösteren şematik model. PHD, oksijen varlığında (%21 O₂) Hif-1α alt ünitesinin prolin rezidülerini hidroksiller. Bu hidroksilasyon, VHL, E3 Ub-ligaz kompleksinin aktive eder ve Hif-1α'nın Ub-proteozom yoluyla yıkılmasını sağlar. Oksijen konsantrasyonunun azalması ile Hif-1α yıkımdan kaçarak sitoplazmada birikir ve çekirdeğe transloke olarak Hif-1β ile birleşir. Burada hedef genlerin HRE bölgelerine bağlanarak transkripsiyonu etkiler. Benzer etkiyi PHD inhibitörü DMOG veya DFO ile PHD enziminin kofaktörü olan demirin ortamdan şelasyon ile uzaklaştırılması da yapar. PHD: prolinhidroksilaz, VHL: Von Hippel Lindau, Ub: ubikutin, DMOG: dimetiloksalilglisin, DFO: deferoxamin, HRE: hipoksiye duyarlı element.

1.3. Normal Kalp Metabolizması ve Mitokondrial Fonksiyon

Kalp hücresinin ATP ihtiyacının büyük bir çoğunluğu mitokondrideki oksidatif fosforilasyon yoluyla karşılanır. Glikoliz ve sitrik asit döngüsünün katkısı sınırlıdır. Kalbin kesintisiz olarak mekanik iş yapabilmesi hızlı bir şekilde ATP'yi hidroliz etmesine bağlıdır. Kalpteki ATP havuzu göreceli olarak az olduğundan ATP üretiminin kesintiye uğraması ile saniyeler içinde tükenir ve kardiyak disfonksiyon gelişir. Kardiyak ATP'nin %70 ile %90'ı yağ asidi oksidasyonundan, kalanı glukoz, laktat, keton cisimcikleri ve bazı amino asitlerin oksidasyonundan karşılanır (Doenst ve ark., 2013; Gertz ve ark., 1988; Wisneski ve ark., 1985).

1.4. Mitokondrial Sitrik Asit Döngüsü ve Oksidatif Fosforilasyon

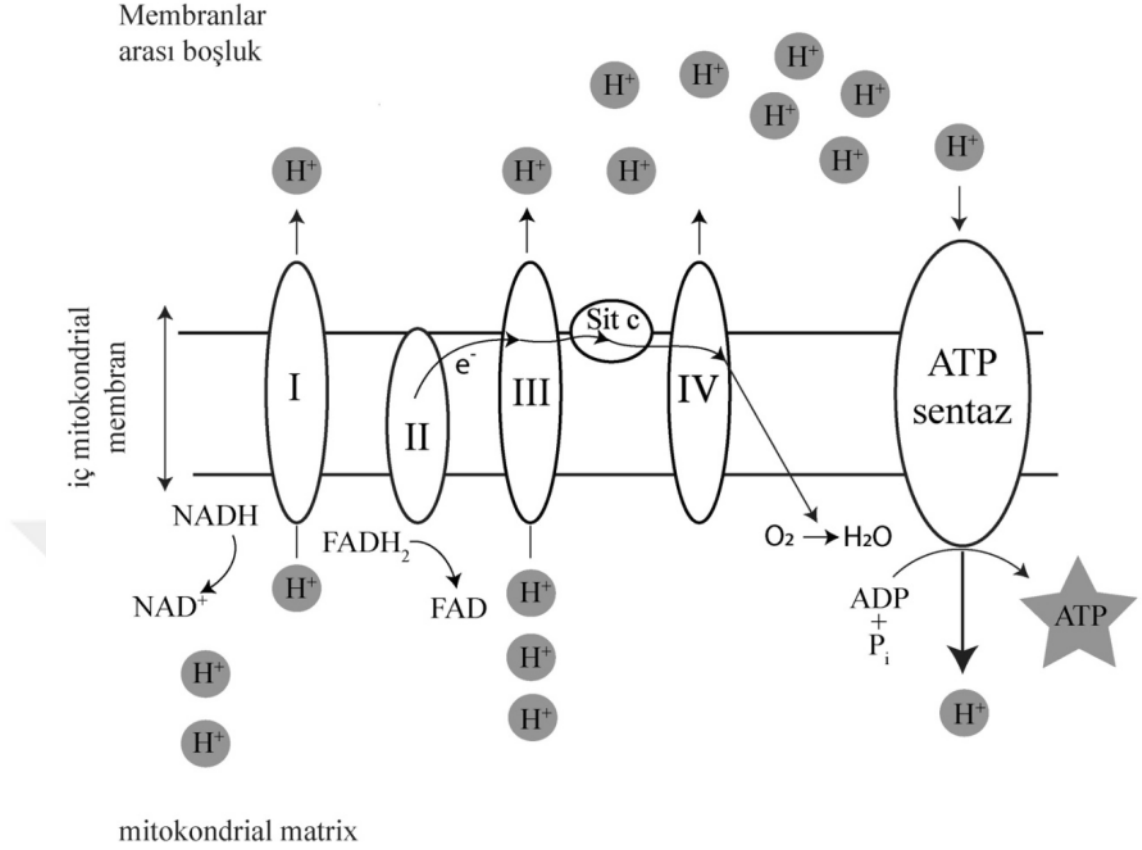
Ökaryot hücrelerde, glikoliz sonucu oluşan pirüvat molekülü hücrede oksijenli solunumun yapıldığı yer olan mitokondriye transfer edilir. Mitokondride pirüvatdan karbondioksit molekülü ayrılır ve iki karbonlu asetil yapısına dönüşür. Asetil molekülü ko-enzim A ile birleşerek sitrik asit döngüsüne katılır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Hücre mitokondrisinde sitrik asit döngüsündeki aracı moleküller ve ATP üretimi. Pirüvik asit sitrik asit döngüsüne girmeden önce asetilko-enzim molekülüne dönüşür.

Sitrik asit döngüsünde CO₂, ATP ya da eşdeğeri, nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ve flavin adenin dinükleotid (FADH₂) üretilir (Gray ve ark., 2014; Skarka ve Ostadal, 2002). Glikoliz ve sitrik asit döngüsü adımlarında ATP üretilse de en fazla ATP üretimi NADH ve FADH₂'den gelen elektronların mitokondri iç membranında yer alan bir dizi protein kompleksinden geçtikten sonra oksijene aktarılması ile gerçekleşir. Oksijen olmaz ise bu aktarım gerçekleşmez. Elektronların aktarımı sırasında ortaya çıkan enerji iç mitokondri membranı boyunca elektrokimyasal proton gradientin yaratılması için kullanılır. Bu gradientin potansiyel enerjisi de ATP üretimine harcanır. Mitokondrideki bütün bu aşamalar oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır (Doenst ve ark., 2013). Elektron taşıyan protein kompleksleri dört tanedir ve I-IV şeklinde isimlendirilir. Dört kompleks ve mobil aksesuar kompleksler beraber elektron transfer zinciri (ETZ) olarak adlandırılır. Elektronun ETZ'deki her transferi sırasında elektron enerji kaybeder ve bu enerji iç mitokondri membranından

membranlar arası boşluğa proton (H^+) pompalanmasında kullanılır. Bu durum iç mitokondri membranında potansiyel (Ψ) oluşmasına sebep olur (bazal durumda ~ -140 mV) (Baracca ve ark., 2003). Hidrojen iç mitokondri membranından içeri ATP sentaz adlı bir integral membran proteini aracılığı ile girer ve ATP oluşur (Mitchell, 1961) (Şekil 1.3). Kalpte mitokondrial ATP sentaz (F_1F_0 -ATP sentaz ya da kompleks V) enerji üreten protein kompleksidir. Bu kompleks de iç mitokondri membranında diğer ETZ ile birlikte yer almaktadır. Enzim iki yönlü çalışabildiğinden ATP sentez ve hidrolizi gerçekleştirebilir. Adenozin difosfat (ADP) ve fosfat (P_i)’den ATP sentezini gerçekleştirmek için ETZ tarafından mitokondri membranlar arası boşlukta oluşturulan elektrokimyasal sürdürücü kuvveti kullanır (Walker, 2013; Yoshida ve ark., 2001). Hücrede hipokside olduğu gibi Ψ ve hücre içi ATP azaldığı şartlarda ATP sentez ters yönde çalışarak ATP’yi hidroliz edebilir. Bu sırada protonları membranlar arası boşluğa geri pompalandığından Ψ korunur. ATP sentaz birbirini fonksiyonel olarak tamamlayan birbirine bağlı iki ayrı alt kompleksten oluşur. F_0 kompleksi transmembran alt ünitesi protonları membranlar arası boşluktan iç mitokondri matriksine taşır. F_1 perferik iç matriksteki alt ünite ise ATP sentazı için nükleotid bağlanmasını katalizler (Abrahams ve ark., 1994; Chen ve ark., 2004; Chen ve ark., 2006; Van Raaij ve ark., 1996). Yapılan çalışmalarda inhibitör faktör 1 (IF1) gibi bazı proteinlerin ATP sentaz aktivitesini regüle edebildikleri bilinmektedir (Long ve ark., 2015).



Şekil 1.3. Mitokondri iç membranındaki elektron (e⁻) transfer zinciri (ETZ) bir dizi yükseltgenme-indirgenme reaksiyonunu sürdüren moleküllerdir. ATP sentaz kompleksi membranlar arası boşluktaki H⁺ gradientini kullanarak ADP'den tekrar ATP oluşturur. Sit C: Sitokrom C; NADH: nikotinamid adenin dinükleotit; FADH₂: flavin adenin dinükleotit; I, II, III, IV: sırasıyla e⁻ taşıyan protein kompleks I, II, III ve IV; ATP sentaz: F₁F₀-ATP sentaz ya da protein kompleks V.

Mitokondrideki ETZ komplekslerine etki eden kimyasallar bulunmaktadır. Siyanür, karbon monoksit ETZ'deki sitokrom c oksidaz, rotenon kompleks I, antimisin A ve mikсотiazol ise kompleks III inhibitörüdür. İnhibitörler ETZ'deki elektron transferrini durduracağından mitokondride membranlar arası boşluğa proton pompalanması durur. Böylece oksijen tüketimi ve ATP sentezi gerçekleşmez (Davoudi ve ark., 2014; Degli Esposti, 1998). Oligomisin mitokondrial F₁F₀-ATP sentaz inhibitörüdür ve hücrenin oksijen tüketimi ile ATP üretimini durdurur (Shchepina ve ark., 2002). 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) veya karbonil siyanid-p-trifluorometoksi-fenilhidrazon (FCCP) gibi maddeler ise mitokondri membranında delikler oluşturarak iç ve dış membranlar arasındaki boşluktaki proton gradientini azaltan yani eşleşmeyi bozan

maddelerdir. Bunun sonucunda ATP sentezi durur ancak ETZ etkilenmediği için genelde hücre azalan ATP'yi yerine koymak için ETZ ve oksijen tüketimini artırmaya çalışır (Readnower ve ark., 2012). Ortamdaki oksijenin sodyum ditionit (DT) gibi oksijen süpürücüleri ile uzaklaştırılması ETZ ve ATP üretimini durdurur.

1.5. Kalpte Demir Eksikliği ve Hipoksi ile İlgili Yolakların Mitokondri Fonksiyonuna Etkileri

Daha önce yapılan çalışmalarda demir eksikliğinin kardiyomiyositlerde mitokondri disfonksiyonu yaparak ATP üretimini etkilediği bildirilmiştir (Blayney ve ark., 1976; Dong ve ark., 2005; Finch ve ark., 1976). Ancak, bu modellerde demir eksikliği ile birlikte şiddetli anemide geliştiğinden demir eksikliği ve aneminin etkilerini birbirinden ayırmak zordur. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında da benzer bir durum söz konusudur. Örnek olarak, Hoes ve ark. (2018), insan embriyonik kök hücresi kökenli kardiyomiyositlerde yaptıkları çalışmada DFO kullanarak demir eksikliği modeli oluşturmuşlardır. Çalışmada 48 saatlik DFO inkübasyonun Hif-1 α birikimine, ATP'de %46 azalmaya ve mitokondri disfonksiyonuna yol açtığı gözlenmiş ve bu etkilerin demir tekrar yerine konulduğunda geri dönüşlü olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da demir uzaklaştırılması ve Hif birikimi aynı anda gözleendiğinden demir eksikliğinin yol açtığı kardiyak disfonksiyon hakkında fikir yürütülmesi zordur. Rineau ve ark. (2018b)'nın geliştirdikleri anemisiz demir eksikliği oluşturulan fare modelinde ise kompleks I aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada bütün solunum zinciri fonksiyonunu ölçülmeden bağımsız kompleks aktivitesinin ölçülmüştür. Dolayısı ile tüm mitokondri fonksiyonu hakkında bulgu yoktur. Anemisiz demir eksikliğinin oluşturulduğu bir diğer fare modelinden elde edilen kardiyomiyositlerde ise, benzer şekilde kompleks I aktivitesinde azalma görülmüş ancak bazal ATP üretiminde fark gözlenmemiştir. Bu çalışmada maksimum mitokondrial solunum kapasitesi azalırken bazal solunum miktarı değişmemiştir (Haddad ve ark., 2017). Hif-1 α hücrenin redoks ve enerji seviyesini koruyabilmek için mitokondri ile ilgili bir dizi moleküler mekanizmayı kontrol eder. İlk olarak ETZ'deki kompleks IV aktivitesinin verimi artırır (Fukuda ve ark., 2007). İkinci olarak pürivat dehidrojenaz enziminin aktivitesini azaltan bir proteinin miktarını artıran fosfoinositid

bağımlı kinaz 1 geninin transkripsiyonunu artırarak pürivatın asetil KoA'yı dönüşümünü önler (Kim ve ark., 2006; Papandreou ve ark., 2006). Son olarak mitokondrial solunumu baskılar ve uzun hipoksik koşullarda (>24 saat) reaktif oksijen türevi (ROS) oluşumunu artırır (Kim ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2007). Hipoksi gibi oksijen seviyesinin azaldığı durumlarda ATP azalmasından sorumlu ana yolak olarak glikolizden gelen ATP'nin ters yönde çalışan F_1F_0 -ATP sentaz tarafından hidroliz edilmesine bağlı olduğu öne sürülmektedir (Rouslin ve Broge, 1993; Solaini ve Harris, 2005). Bu durumda hücrede ATP kaybı doğal bir protein olan inhibitör faktör 1 (IF1)'in F_1 katalitik alt ünitesine bağlanması ile önlendiği ileri sürülmektedir. IF1'in ATP sentaz aktivitesini hızlı ve geri dönüşlü olarak %50 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir (Bosetti ve ark., 2000; Campanella ve ark., 2009). Kardiyomiyositlerde eksprese olan IF1'in Hif-1 α ile regüle olabildiği düşünülmektedir (Brealey ve ark., 2004; Huang ve ark., 2011; Rouslin, 1991).

HL-1 atrial hücre serisinde daha önce elde ettiğimiz bulgulara göre 48 saatlik hipoksi mitokondrial bazal ve maksimum solunumunu etkilemeden mitokondrial ROS üretiminin arttığı, hücre içi ATP miktarının azaldığı bir disfonksiyon olduğu yönündedir (Simsek ve Kandilci, 2018; Simsek ve ark., 2019). Dolayısı ile maksimum solunum kapasitesi değişikliğinden demir eksikliği sorumlu gözükmektedir. Bu hipotezin test edilmesi için bu tez çalışmasında normokside Hif-1 α birikimi yapan DMOG ve DFO'nun etkisi ayrı deney gruplarında test edildi.

1.6. Demir Şelatörü Deferoksamin ve Etkisi

Demir şelatörleri, farklı kimyasal yapıda olmalarına rağmen genel ortak özellikleri demir ile koordine bağlar oluşturacak oksijen, azot ya da sülfür gibi donör atomları içermeleridir. Şelatörün donör atomları demirin formlarına karşı (Fe^{12} veya Fe^3) seçiciliğini belirler. Şelatörler, mikroorganizmalardan türetilen doğal bileşenler (*siderophores*) veya sentetik olarak üretilmektedir. Tıpta en çok kullanılan ve en iyi bilinen siderophore DFO'dur. Sentetik şelatörlere örnek olarak, deferipron ve deferasiroks verilebilir (Hatcher ve ark., 2009). DFO, ferrik demire yani demirin

okside formuna (Fe^{3+}) yüksek afinite ile bağlanır ($K_d=10^{-31}$ M), ferröz demir yani demirin redükte formuna (Fe^{2+}) ise çok daha düşük afinite ($K_d\sim 10^{-10}$ M) gösterir (Keberle, 1964). DFO hidrofilik yapısı nedeniyle hücre zarından geçişi zordur ancak uzun süreli inkübasyonlarda hücre içi demiri şelate ettiği, hücre proliferasyonunu ve hücre içi ferritin miktarını azalttığı bildirilmiştir (De Domenico ve ark., 2009; Hatcher ve ark., 2009; Kicic ve ark., 2001). HL-1 hücre serisinde DFO'nun hücre içi Hif-1 α birikimine yol açtığı gösterilmiştir (Ronkainen ve ark., 2007).

1.7. Çalışmanın Amacı

Demir eksikliği, kalp yetmezliği olan hastalarda yaygın olarak görülmekte ve zayıf kardiyak fonksiyon ile ilişkilendirilmektedir. Bu tez çalışmasında, fare atrial kökenli HL-1 hücrelerinde, klinik uygulamalara uygun ve yaygın kullanılan bir demir şelatörü olan deferoksamin (DFO) kullanılarak demir eksikliği modeli oluşturuldu. Bu deney koşullarında mitokondri fonksiyonunun nasıl etkilendiği araştırıldı ve kardiyak fonksiyona muhtemel etkisi tartışıldı. Demir eksikliği aynı zamanda hücrede hif birikimine de yol açtığından normokside hif birikimi yapan pirolil hidroksilaz inhibitörü DMOG kullanılarak etkiler birbirinden ayrıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar ile demir eksikliğine bağlı kalp yetmezliğinin fizyopatolojik mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi stratejileri oluşturulması hedeflenmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. HL-1 Hücre Kültürü

HL-1 (spontan atım göstermeyen) hücreleri önceden jelatin (%0,02) ve fibronektin (Sigma F1141, %0,5) ile kaplanmış flaskda 2 mM L-glutamin (Sigma G7513), %10 fetal sığır serumu (FBS, Gibco 10270), 100 U/ml penisilin, 100 µM/ml streptomisin (Gibco 15140) ve 0,1 mM norepinefrin (Sigma A0937) ve içeren Claycomb (Sigma 51800C) hücre besiyerine konuldu. Hücreler standart koşullarda (%5 CO₂, %95 nem, 37°C) inkübe edilerek büyütüldü. 48-72 saat sonra %80-100 yoğunluğa ulaşan hücreler %0,05 tripsin/EDTA (Gibco 25300-054) ile pasajlandı. Deney grubu oluşturmak için pasajlanan hücrelerin bir bölümü 2 ml besiyeri bulunan 6'lık kuyularda önceden jelatin (%0,02) ve fibronektin (%0,5) ile kaplanmış yuvarlak camlara ekildi. 6'lık kuyulara ekilen hücreler 24-36 saat sonra %70 yoğunluğa ulaştı. Daha sonra kuyulardaki besiyeri tazelandı ve hücrelere demir şelatörü DFO mesilat (30-50-100 µM, Sigma D9533) veya prolilhidroksilaz enzim inhibitörü DMOG (1mM, Sigma D3695) eklenerek 48 saat boyunca inkübe edildi. Deneyde kullanılmayan kalan hücreler ise %95 FBS ve %5 dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma 41639) içinde aşamalı olarak -80°C'de bir gece tutulduktan sonra sıvı azot tankında donduruldu.

2.2. İmmunofloresans

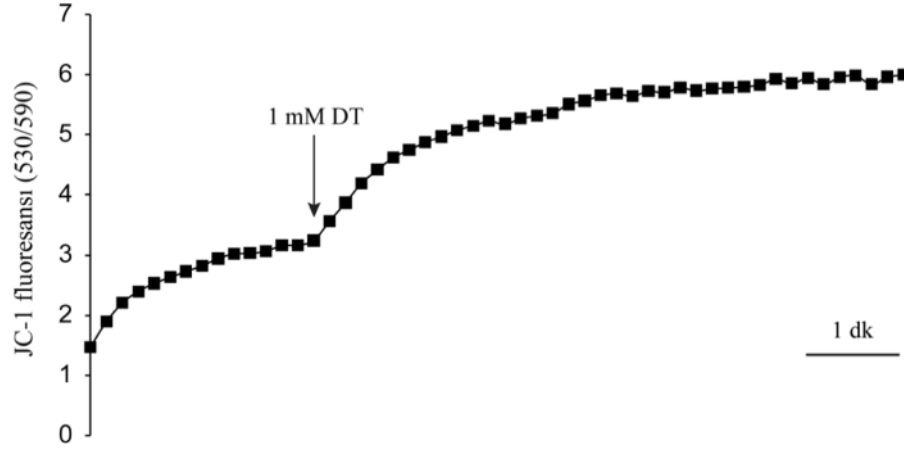
HL-1 hücrelerinde demir eksikliğinin hipoksi ile indüklenen faktör-1α (Hif-1α) birikimi üzerine etkisi immünofloresans yöntemi ile ölçüldü. Bu amaçla, kontrol ve 48 saat DFO (30, 50, 100 µM) ya da DMOG (1 mM) ile inkübe edilen hücreler fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile iki kere yıkandıktan sonra %2 (ağırlık/hacim) paraformaldehit ile 20 dakika boyunca fikse edildi. Tekrar iki kere PBS ile yıkanan hücreler %0,1 Triton-X içeren PBS ile 15 dakika inkübe edilerek membran geçirgen hale getirildi. Bloklama için hücreler %0,1 triton-X (Applichem A4975) ve % 1 albumin (Sigma A7906) içeren PBS'de 1 saat bekletildi. Daha sonra hücreler primer

antikor ile (fare monoklonal Hif-1 α , NovusBiologica NB100-105, 1:500) 1 saat inkübe edildi. PBS ile 3 kere yıkamadan sonra hücreler sekonder antikor ile (keçi anti fare Alexa Fluor 594, Jacksons Immunoresearch 115-585-003, 1:100) 1 saat inkübe edildi. Son aşamada hücreler çekirdek sınırlarını belirlemek için nükleik asit boyası Yo-Pro-1 (Molecular Probes Y3603, 2,5 μ M) boyasında 40 saniye bekletildi ve preparat kurumayı engelleyen koruyucu ortam ile (Diamond Antifade Mountant Life Tech P36961) kapatıldı. Hücreler karanlık ortamda 12 saat bekletildikten sonra konfokal mikroskopta (Leica, SP5) immüno Floresans ölçümü yapıldı. Sitoplazmik ve çekirdek Hif-1 α miktarı birim alan başına düşen immüno Floresan şiddetinden hesaplandı. Deneyler 25°C’de sabit lazer şiddetinde yapıldı. Hücreler çekirdek boyası için 488 nm, Alexa Fluor için ise 594 nm dalga boyunda uyarıldı ve sırasıyla 495-550 nm ve 600-700 nm dalga boyu aralıklarında emisyon sinyalleri toplandı.

2.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü

HL-1 hücrelerinden Ψ ölçümü için 1,1',3,3'-tetra etil benamidazol karbosiyanin iyodür (JC-1, Anaspec AS-88060) Floresan boyası kullanıldı. JC-1 boyası, mitokondri polarize olduğunda mitokondrial membranlar arasında toplanarak (j-agregat formu) kırmızı Floresansta (590 nm) artış, depolarize olduğunda ise boya sitoplazmada difüz şekilde dağılarak (j-monomer formu) yeşil Floresansta (530 nm) artış göstermektedir. HL-1 hücreleri 48 saat DFO (50 ve 100 μ M) veya DMOG (1 mM) ile karbondioksitli inkübatörde bekletildi. Daha sonra inkübasyondan çıkartılan kontrol ve deney grubu hücrelere 37°C’de 20 dakika 10 μ M JC-1 boyası yüklendi ve konfokal mikroskopta 25°C’de görüntülendi. HL-1 hücrelerinden mitokondri potansiyelini ölçümü için hücreler 488 nm uyarıldı ve emisyon sinyali 530 ve 590 nm dalga boylarından eş zamanlı (ratiometrik) olarak toplandı. Deney gruplarının başlangıç bazal (Ψ hiperpolarize) ve maksimum solunum kapasitesi (Ψ depolarize) yanıtları karşılaştırıldı. Bu amaçla banyo ortamına doğrudan sodyum ditionit (DT, Merck 106507, 1 mM) eklenerek solüsyondaki oksijen süpürüldü (Şekil 2.1). Oksijenin süpürülmesi, oksidatif fosforilasyonu durdurarak mitokondrideki elektrokimyasal gradientin ortadan kalkmasına ve Ψ depolarizasyonuna yol açmaktadır. Sodyum

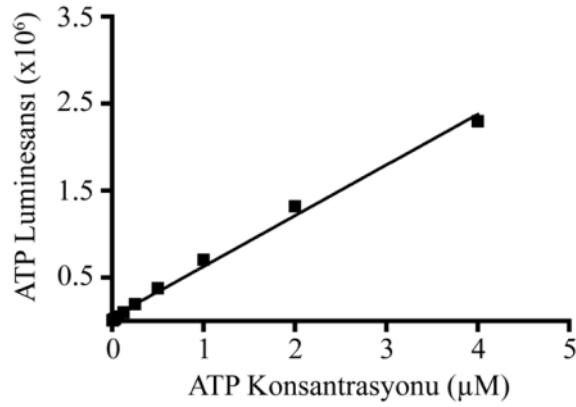
ditionit uygulaması ile oluşan maksimum Ψ depolarizasyon yanıtının hızı (ortalama eğim) deney grupları arasında karşılaştırıldı.



Şekil 2.1. IIL-1 kontrol hücresinden kaydedilen maksimum Ψ depolarizasyon oluşturan sodyum ditionit (DT) uygulamasını (ok) gösteren örnek trase. 0,1 Hz frekansta uyarılan hücrelerde JC-1 sinyalinin dengeye gelmesinden sonra elde edilen değer bazal Ψ olarak kabul edildi. 1 mM DT uygulamasına ile oluşan yanıt hızı (eğim), başlangıcından tepe değerine kadar her noktada ayrı ölçüldü ve ortalama eğim şeklinde hesaplandı.

2.4. Hücre İçi ATP Ölçümü

Demir eksikliği oluşturulan hücrelerde, hücre içi ATP miktarını ölçmek için Cell Titer-Glo-2.0 Assay (Promega G9242) kiti kullanıldı. Hücreler, DFO (50 ve 100 μ M), DMOG (1 mM) ile 48 saat karbondioksitli inkübatörde inkübe edildi. ATP hücreler inkübasyondan çıkartıldıktan hemen sonra lüminometrede (Envision 2104; Perkin Elmer) ölçüldü. Bu amaçla, ilk başta farklı ATP konsantrasyonları karşılık gelen ışık miktarı ölçülerek standart eğri oluşturuldu (Şekil 2.2). Deney için 6'lık kuyulardaki hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırdıktan sonra eşit oranda taze besiyer ve kitin lizis çözeltisi eklenerek 10 dakika karanlıkta düzenli aralıklarda çalkalanarak bekletildi. Daha sonra lizatdan $\frac{1}{2}$ oranında seri dilüsyon hazırlanarak standart eğri aralığında kalan dilüsyondan ölçüm gerçekleştirildi. Hücre başına düşen ATP miktarı kontrol hücrelerdeki ATP miktarına oranlanarak gösterildi.



Şekil 2.2. Standart ATP konsantrasyonlarına karşılık gelen ışık miktarını gösteren grafik. Kitin talimatları doğrultusunda 96'lık opak kuyularda ATP'nin iki kat seri dilüsyonları hazırlandı. 10 dakika sonra luminometrede ATP konsantrasyonuna (0,004 - 4 µM) karşılık gelen toplam ışık miktarından doğrusal (r^2 : 0,99) standart eğri oluşturuldu. Kitin çalışma prensibi kısaca luciferinin oksijenasyonunun Mg^{+2} varlığında lusiferaz enzimi ile katalizlenmesine dayanmaktadır.

2.5. HL-1 Hücre Canlılığı Ölçümü

DFO veya DMOG ile 48 saat inkübe edilen hücrelerin proliferasyon miktarı immünofloresans yöntemi ile ölçüldü. Bu amaçla DNA boyası olan Yo-Pro-1 (Molecular Probes Y3603, 2,5 µM) kullanılarak her deney grubu için aynı alana düşen çekirdek sayısı konfokal mikroskopta belirlendi.

2.6. Kullanılan Solüsyonlar

Mitokondri membran potansiyel ölçümü deneylerinde kullanılan HEPES tamponlu tirod çözeltisi (mM olarak): 135 NaCl, 20 HEPES (4-(2-hidroksietil)-1 piperazinethano sulfonik asit, pK_a :7,5), 11 Glukoz, 4,5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$ kullanılarak hazırlandı. İmmünofloresans deneyleri ve hücreleri yıkamak için kullanılan PBS; 1,67 g Na_2HPO_4 , 0,57 g NaH_2PO_4 ve 8,5 g NaCl kullanılarak hazırlandı. Solüsyonlar için kullanılan kimyasallar Sigma'dan temin edildi.

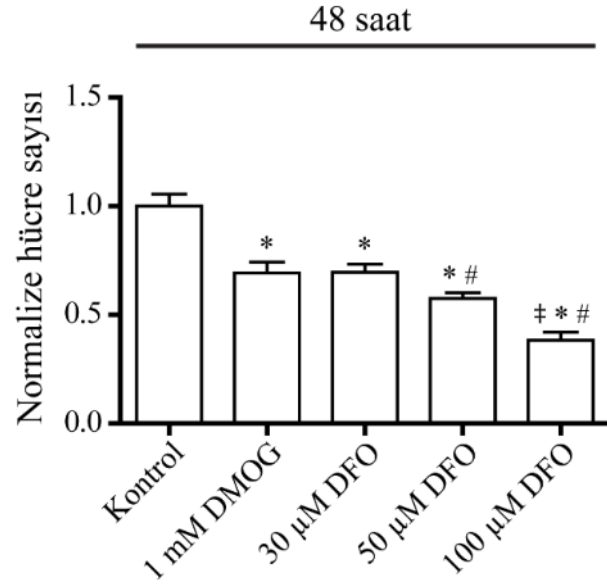
2.7. İstatistik

Sonuçlar ortalama $\pm$ S.E.M şeklinde gösterildi. Gruplar arası fark için çift yönlü Student's *t*-test'i kullanıldı (Graphpad Prism 5) ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. HL-1 Hücrelerinde Uzun Süreli DFO ve DMOG İnkübasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Bu tez çalışmasında, hücre kültürü ortamından demiri uzaklaştırmak amacı ile demir şelatörü DFO (30-50-100 μ M) ve hücrelerde Hif-1 α birikimi yapan PHD enzim inhibitörü DMOG (1mM) kullanıldı. Deneylerde uygun DFO konsantrasyonu belirlemek için ilk olarak maddelerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerine bakıldı. DFO'nun hücre canlılığı üzerine etkisi konfokal mikroskopta hücre çekirdek sayısından hesaplandı. DFO (30 μ M) ya da DMOG (1 mM) ile 48 saat inkübasyon hücre canlılığını ~%50 oranında azalttı (Şekil 3.1). Uzun süreli DMOG uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi hücre tipine göre farklılık göstermektedir (Crifo ve ark., 2019; Menon ve ark., 2018; Simsek ve ark., 2019). 48 saat daha yüksek konsantrasyonlarda DFO (50, 100 μ M) inkübasyonu ise, konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını DMOG'dan daha fazla azalttı (Şekil 3.1). Böylece, 100 μ M DFO hücreler için toksik, 30 ve 50 μ M DFO ise hücre canlılığını daha az ve DMOG ile benzer oranlarda etkilemesinden dolayı uygun dozlar olarak değerlendirildi. Bu sonuçlar, demir eksikliğinin Hif-1 α 'nın etkisinden bağımsız olarak hücre canlılığını etkileyebileceğini düşündürmektedir.

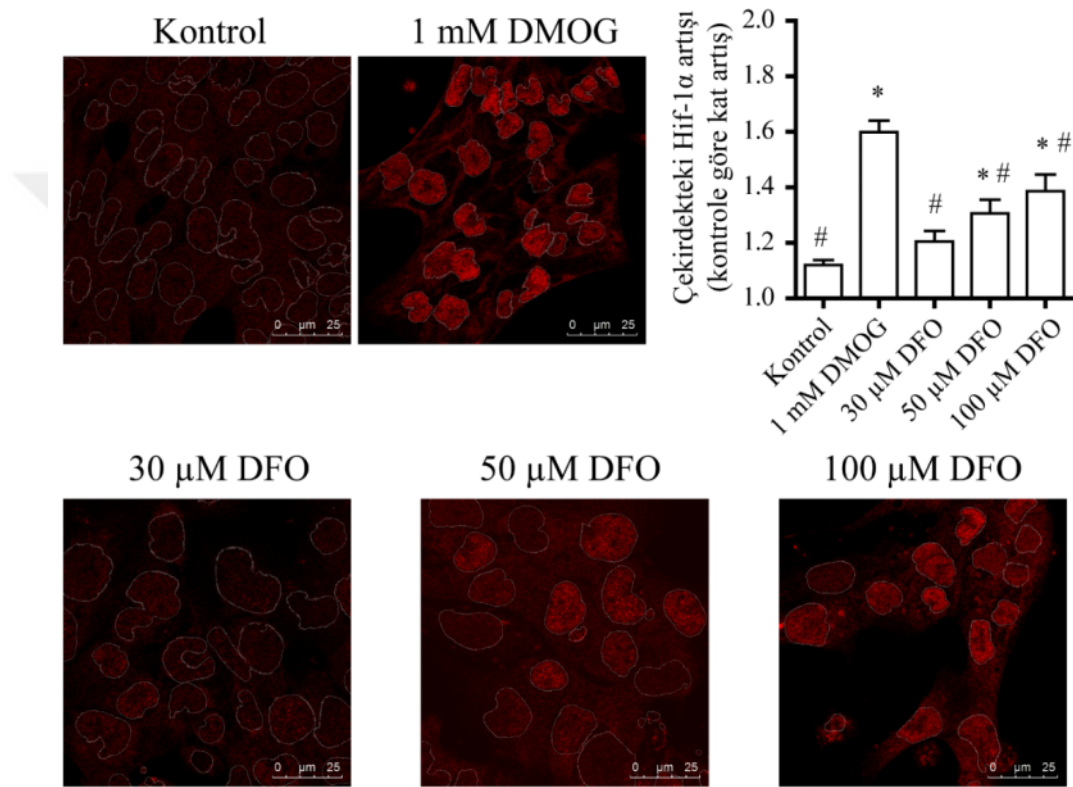


Şekil 3.1. HL-1 hücrelerinde 48 saat DFO (30, 50, 100 µM) ve DMOG (1 mM) inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi. Hücre sayıları aynı konfokal büyütmesi kullanılarak çekirdek boyanmasından elde edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ve normalize edilerek verilmiştir. (n=3; * kontrole göre, # DMOG'a göre, ‡50 µM DFO'ya göre $p<0,05$).

3.2. HL-1 Hücrelerinde Uzun Süreli DFO ve DMOG İnkübasyonunun Çekirdek Hif-1 α Birikimine Etkisi

Bu tez çalışmasının amacı, HL-1 hücrelerinde uzun süreli demir eksikliğinin mitokondri fonksiyonu üzerindeki doğrudan (Hif-1 α aracısız) ve dolaylı (Hif-1 α aracılı) etkilerini aydınlatmaktır. Demir, hücre içinde Hif-1 α protein yıkımından sorumlu PHD enziminin kofaktörüdür ve daha önceki çalışmalarda hücre kültürü ortamından demirin uzaklaştırması ile enzimin inhibe olduğu öne sürülmüştür (Ronkainen ve ark., 2007; Weidemann ve Johnson, 2008). Dolayısı ile ortamdan demirin uzaklaştırılması doğrudan etkiler yanında PHD enzim inhibisyonuna bağlı dolaylı etkiler de oluşturabilir. Bu potansiyel etkilerin birbirinden ayrıştırılması amacı ile hücreler standart demir içeren ortamda PHD enzim inhibitörü DMOG veya DFO ile ayrı ayrı inkübe edildi. HL-1 hücrelerinde 48 saat 30 µM DFO inkübasyonu çekirdekteki Hif-1 α miktarını etkilemedi. Hücre canlılığını yaklaşık DMOG kadar etkileyen 50 µM DFO inkübasyonu çekirdekteki Hif-1 α miktarını kontrole göre artırdı.

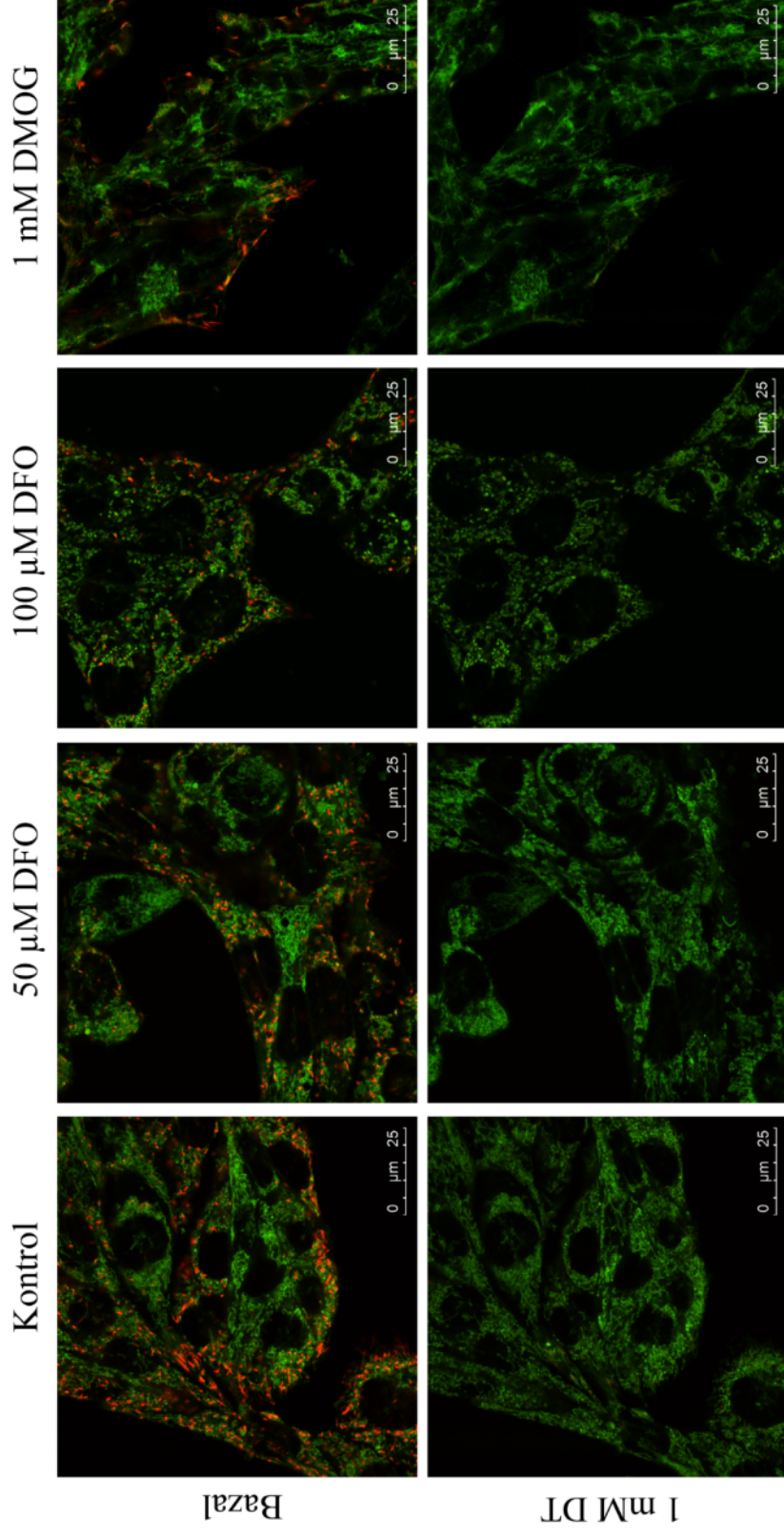
48 saat 100 μ M DFO inkübasyonu ise, hücre canlılığı açısından güçlü toksik konsantrasyon olsa da sağ kalan hücrelerde Hif-1 α birikimine yol açtı. Benzer şekilde, 48 saat DMOG inkübasyonu ile çekirdekte anlamlı Hif-1 α artışı gözlemlendi. Ancak DMOG inkübasyonu DFO'ya göre çekirdekte daha fazla Hif-1 α birikimine yol açtı (Şekil 3.2). Bu etki, hücre canlılığı üzerindeki etkisi ile birlikte düşünüldüğünde DFO'nun Hif-1 α 'dan bağımsız hücre canlılığını etkilediğini desteklemektedir.



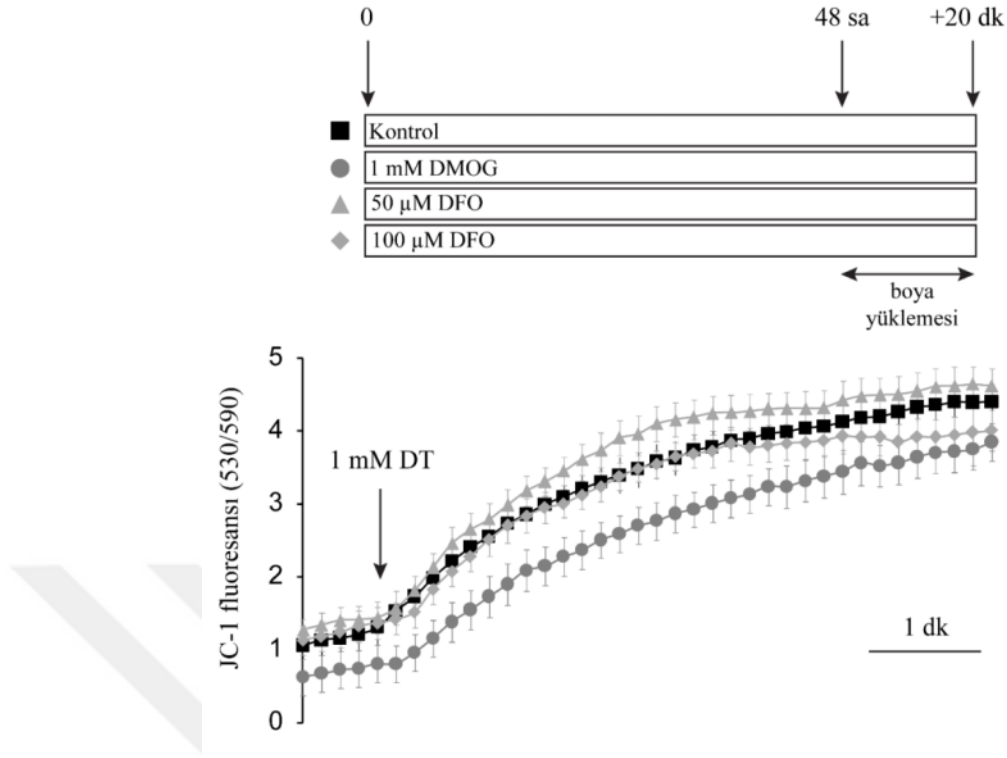
Şekil 3.2. HL-1 hücrelerinin 48 saat normokside DFO (30, 50, 100 μ M) ve DMOG (1 mM) inkübasyonu ile çekirdekte Hif-1 α proteinini birikimini gösteren konfokal görüntüsü. Hücreler sırasıyla Hif-1 α birincil antikor, Alexa flor 594 ikincil antikor (kırmızı) ve 2,5 μ M Yo-Pro-1 DNA boyası ile inkübe edildi. Hücre çekirdek sınırları Yo-pro-1 sinyali ile belirlendikten sonra çekirdek sınırları beyaz çizgiler ile gösterildi. Sütun grafik ise, konfokal mikroskopta birim alan başına düşen floresans şiddet ölçümünden hesaplanan çekirdek Hif-1 α miktarını göstermektedir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak ve normalize edilerek verilmiştir. (n= 3; * kontrole göre, # DMOG'a göre p<0,05).

3.3. HL-1 Hücrelerinde Uzun Süreli DFO ve DMOG İnkübasyonunun Mitokondri Fonksiyonuna Etkisi

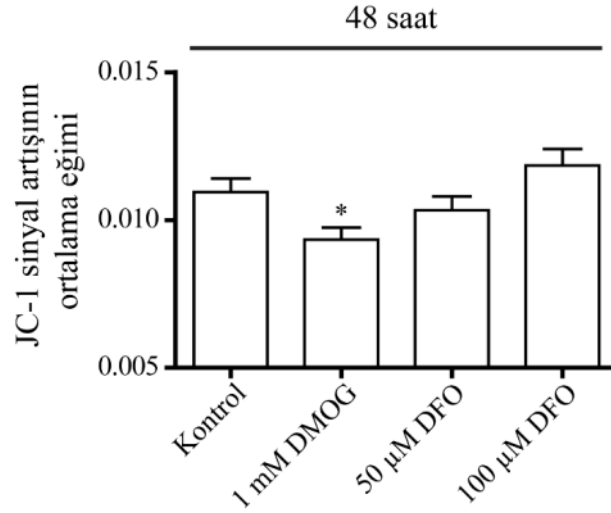
Daha önce yapılan çalışmalarda insan kardiyomiyosit kültüründe 48 saat DFO inkübasyonu ile Hif-1 α birikimi gözlenmiş ayrıca mitokondri fonksiyonunun göstergeleri olan bazal Ψ ve maksimum solunum kapasitesinde azalma olduğu bulunmuştur (Hoes ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında, HL-1 hücrelerinde demir uzaklaştırılmasının mitokondri solunum kapasitesine etkisini araştırmak için oksijen süpürücüsü sodyum ditionit kullanıldı. Bazal koşullarda hiperpolarize olan Ψ ortamdan oksijen uzaklaştırıldığında depolarize olmaktadır. Sodyum ditionit uygulaması ile Ψ 'de oluşan bu fark mitokondrinin solunum kapasitesinin bir göstergesi olarak kullanıldı. Kontrole göre anlamlı Hif-1 α birikimi gözlenen DFO (50 ve 100 μ M) ve DMOG (1 mM) ile 48 saat inkübe edilen hücrelerden bazal ve sodyum ditionit uygulaması sonrasında oluşan maksimum Ψ depolarizasyon ölçüldü. Toksik 100 μ M DFO konsantrasyonda canlı kalan hücrelere ait ölçümler konfokal mikroskopta her hücreden ayrı olarak kaydedilebildiğinden değerlendirilmeye alındı. DFO veya DMOG inkübasyonları bu yanıtları kontrole göre değiştirmede (Şekil 3.3 a,b,d). Daha önceki çalışmamızda, HL-1 hücrelerinde 48 saat hipoksinin Hif-1 α birikimine yol açarak, mitokondri bazal ve maksimum solunum kapasitesinde değişiklik oluşturmada maksimum Ψ depolarizasyona ulaşma ortalama hızını (ortalama eğim) yavaşlattığı gösterildi (Simsek ve Kandilci, 2018). Bu tez çalışmasında da normoksida 48 saat DMOG inkübasyonu hipoksiyi taklit ederek maksimum Ψ depolarizasyona ulaşma ortalama hızını yavaşlattı. Ancak 48 saat DFO inkübasyonlarında böyle bir etki gözlenmedi (Şekil 3.3c). Maksimum Ψ depolarizasyona ulaşma hızı, mitokondride elektron transferi ortamdaki oksijeni süpüren sodyum ditionit uygulaması ile durdurulduğunda mitokondrial matriks boşluğundaki proton gradientinin bozulma hızını göstermektedir. Bu durumda mitokondriye matriksine geri proton akışı büyük ölçüde F₁F₀ ATP sentaz enzimi aracılığı ile olabileceğinden aslında bu enzimin aktivitesinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Bu sonuçlar, demir eksikliğinin mitokondri fonksiyonu üzerine doğrudan etkisi olmadığını, ancak Hif-1 α aracılı etki oluşturabileceğini ileri sürmektedir.



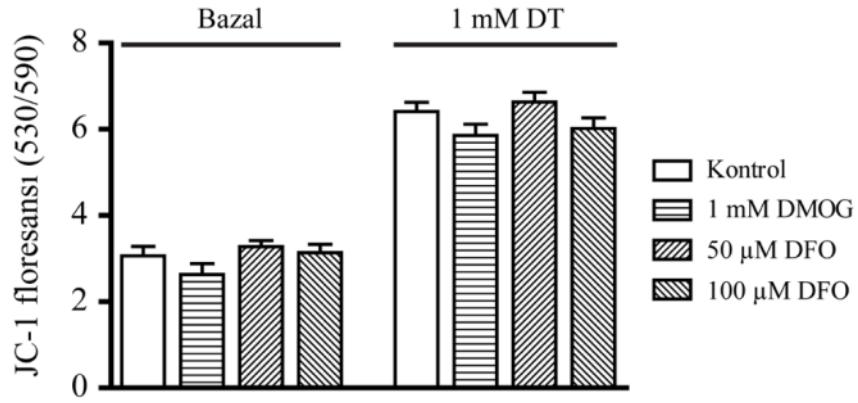
Şekil 3.3.a. HL-1 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında 48 saat DFO (50, 100 μ M) ve DMOG (1 mM) inkübasyonunun bazal ve sodyum ditionit (DT) uygulamasının ardından kaydedilen Ψ konfolkal mikroskopta çekilen anlık görüntüleri (JC-1 floresan, $n=3$). Hücrelerinin mitokondrileri bazal durumda (Ψ hiperpolarize, kırmızı) belirgin olarak gözlenirken Df uygulamasından sonra Ψ depolarizasyon sonucu JC-1 boyasının mitokondrideki agregat formuna ait floresan (kırmızı) kaybolmaya dağılıp yeşil floresan artmaktadır. Böylece mitokondriler artık ayırt edilememektedir (Ψ depolarize, difüz yeşil).



Şekil 3.3.b. Kontrol ve deney gruplarından (DFO ve DMOG) 0,11Hz frekansında kaydedilen bazal ve sodyum ditionit (DT) uygulamasından (ok) sonraki JC-1 sinyalinin (Ψ) grafikleri. Deney protokolü ekli olarak şekil üstüne yerleştirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir (n=3-5).



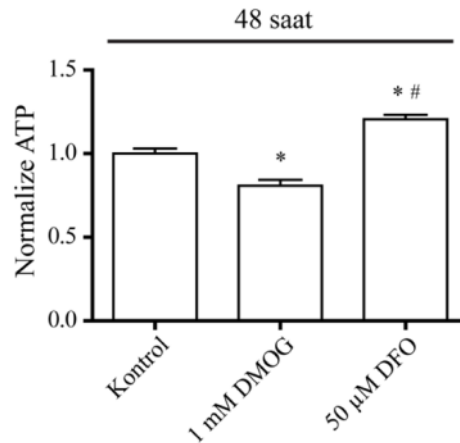
Şekil 3.3.c. Kontrol ve deney gruplarında (DFO ve DMOG) sodyum ditionit (DT) uygulaması sonrasında JC-1 sinyalinin (Ψ) zamana bağlı değişim hızı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir (n=3-5; * kontrolle göre, $p<0,05$).



Şekil 3.3.d. Kontrol ve deney gruplarında (DFO ve DMOG) bazal ve sodyum ditionit (DT) uygulaması sonrasında JC-1 sinyal (Ψ) değerleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir (n=3-5).

3.4. HL-1 Hücrelerinde Uzun Süreli DFO ve DMOG İnkübasyonunun Hücre İçi ATP Düzeyine Etkisi

HL-1 hücrelerinde 48 saat 50 ve 100 μ M DFO inkübasyonu mitokondrial fonksiyonu etkilemedi (Şekil 3.3). Ancak, aynı koşullarda 50 μ M DFO inkübasyonu hücre içi ATP miktarını artırırken DMOG inkübasyonu ATP seviyesini azalttı (Şekil 3.4). HL-1 hücrelerindeki daha önceki bulgularımız uzun süreli hipoksi ile hücre içi ATP seviyesini Hif-1 α aracılı olarak azalttığını göstermektedir (Simsek ve ark., 2019). Bu sonuçlar uzun süreli demir eksikliğinin doğrudan ve hücrenin oksidatif fosforilasyon mekanizmasını etkilemeden glikoliz yollarına etkili olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 3.4. HL-1 hücrelerinde 48 saat normoksida DFO ya da DMOG inkübasyonu sonrasında ölçülen ATP miktarları. Sonuçlar hücre sayısına normalize edilerek ve ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir (n=5, * kontrolle göre, # DMOG'a göre p<0,05).

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, HL-1 memeli atrial kardiyomiyositlerinde 48 saatlik DFO inkübasyonu ile oluşturulan demir eksikliği modeli hücre çekirdeğinde Hif-1 α birikimine yol açmaktadır. Deneylerde PHD enzim inhibitörü DMOG ile 48 saatlik inkübasyon demir eksikliğinden anlamlı olarak ve daha fazla miktarda Hif-1 α birikimine yol açtı (Şekil 3.2). Ancak DMOG grubundan daha az olsa da DFO inkübasyonu süresince biriken Hif-1 α miktarının hipoksi ile ilgili genlerin transkripsiyonunu etkileme potansiyeline sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. HL-1 hücrelerinde Hif-1 α yolağının aktive olabildiği daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Ambrose ve ark., 2014). Çalışmamızda, normoksik koşullarda 48 saat DMOG inkübasyonunun indüklediği Hif-1 α aktivasyonu hücrede mitokondri fonksiyonunu etkileyerek hücre içi ATP miktarını azalttı. Daha önceki bulgularımız 48 saat hipoksi ile (PO₂: %1) indüklenen Hif-1 α 'nın da ATP miktarını mitokondrial disfonksiyon sonucu azalttığı yönündedir (Simsek ve Kandilci, 2018). Demir eksikliği ve oluşturduğu Hif-1 α birikimi ise mitokondri fonksiyonu etkilemedi ve ATP miktarını artırdı (Şekil 3.4). Bu durum DFO'nun DMOG'a göre daha az Hif-1 α birikimi yapması ile açıklanabilir. İnsan embriyonik kök hücre kökenli kardiyomiyositlerde DFO (30 μ M) ile oluşturulan demir eksikliği 48 saatte güçlü Hif-1 α birikimi oluşturmadan mitokondrial disfonksiyona yol açarak ATP seviyesini azaltmaktadır (Hoes ve ark., 2018). Bu zıt bulgular demir eksikliği ile hücre kültürü ve dokuya özgü farklı mekanizmaların aktive olabileceğini düşündürmektedir. Sonuçlarımız, HL-1 hücrelerinde DFO ile oluşturulan uzun süreli demir eksikliği modelinde hücrenin mitokondri fonksiyonunun doğrudan etkilenmediğini ancak biriktirdiği Hif-1 α miktarı ile orantılı olarak dolaylı etkiler oluşturabileceğini öne sürmektedir (Şekil 4.1).

Bulgularımıza göre DFO ve DMOG inkübasyonları hücre canlılığını azalttı (Şekil 3.1). DMOG inkübasyonu ise hücre canlılığını daha az etkiledi. DMOG'un hücre canlılığına etkisi hücre tipine göre değişiklik gösterebilmektedir. Örnek olarak, 24 saat DMOG inkübasyonunun insan monositlerinde hücre canlılığını azalttığı,

HEK293 ve MEF hücre serilerinde ise hücre canlılığını etkilemediği bildirilmiştir (Crifo ve ark., 2019). DFO 30 μ M konsantrasyonda Hif-1 α birikimi yapmadan hücre canlılığını DMOG kadar etkilediğinden demir eksikliğinin hücre canlılığına etkisi Hif-1 α 'dan bağımsız gerçekleşmektedir (Şekil 4.1). DFO inkübasyonunun hücre canlılığını azalttığı daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Kicic ve ark., 2001). DFO'nun bu etkisini, bütün hücrelerde DNA sentezi için gerekli olan ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere indirgenmesinden sorumlu ribonükleotid redüktaz enzimini bloke ederek gösterdiği düşünülmektedir (Barankiewicz ve Cohen, 1987; Hoyes ve ark., 1992).

Çalışmamızda, HL-1 hücrelerinde demir eksikliğinin mitokondri fonksiyonuna etkisini değerlendirmek için Ψ 'nin bazal (ATP sentez miktarı), maksimum depolarizasyon miktarı (ATP sentezleme kapasitesi) ve ortamdan oksijen uzaklaştırıldığında maksimum Ψ depolarizasyona ulaşma hızı (F_1F_0 ATP sentaz aktivitesinin göstergesi) ölçüldü. 50 ve 100 μ M DFO ve DMOG inkübasyonları bazal Ψ ve maksimum Ψ depolarizasyon miktarını etkilemedi. Bu sonuçlardan mitokondride membranlar arası boşluktaki proton gradientinin değişmediği anlaşılmaktadır. Dolayısı ile tüm deney gruplarının oksidatif fosforilasyon kapasiteleri arasında fark bulunmamaktadır. Bu sonuçlar ile uyumlu olarak fare neonatal kardiyomiyositlerinde 24 saatlik DMOG inkübasyonunun bazal Ψ değerini etkilemediği gösterilmiştir (Sridharan ve ark., 2007). Proton gradienti oluşumunda ön planda mitokondrideki kompleks I ve III aktivitelerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Lenaz ve ark., 2006). Literatür genel olarak demir eksikliği modellerinde ETZ'deki komplekslerin aktivitelerinin azaldığı yönündedir. Hoes ve ark. (2018) Hif-1 α birikiminin eşlik ettiği DFO ile demir eksikliği oluşturulmuş kardiyomiyositlerde, bazal solunumun etkilenmediğini, elektron transport zincirindeki kompleks I, II, III aktivitelerinin azaldığını bulmuşlardır. Hücrelerin kompleks IV, V aktivitelerinin ise değişmediği gözlenmiştir. Anemisiz (Hif-1 α birikimi olmadan) demir eksikliği oluşturulmuş canlı hayvan modelinde ise kalpte kompleks I dışındaki ETZ enzim kompleks aktivitelerinin (II, III ve IV) etkilenmediği bildirilmiştir (Rineau ve ark., 2018a). Bu sonuçlara göre demir eksikliğinin kompleks I aktivitesini Hif-1 α 'dan bağımsız olarak, kompleks III aktivitesinin ise Hif-1 α aracılı etkilenebileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan 24

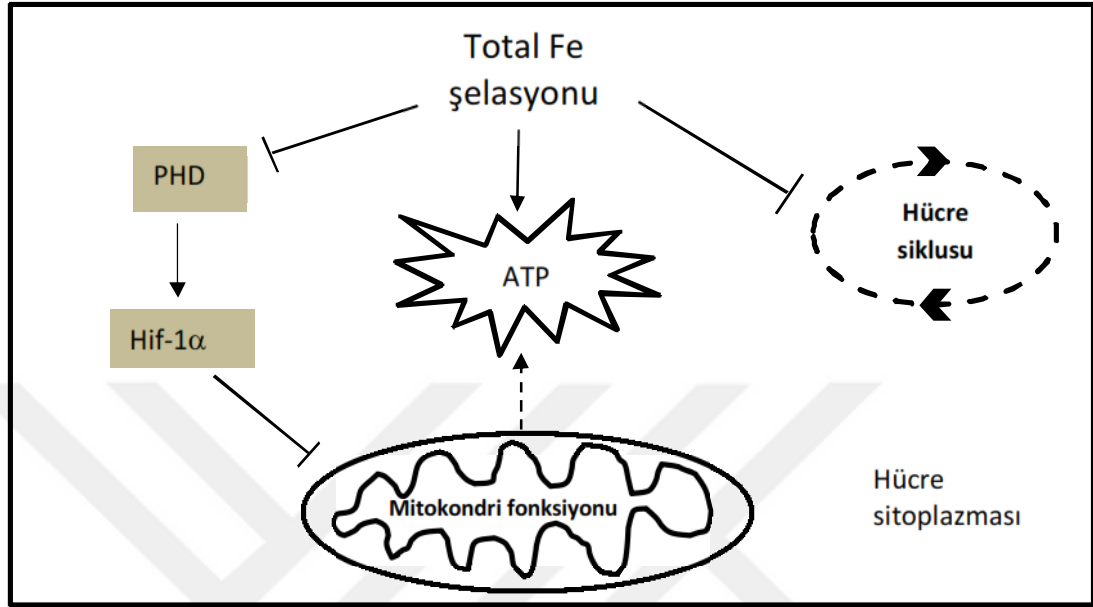
saatlik DMOG inkübasyonunun mitokondrideki proton gradientinden sorumlu kompleks I aktivitesini etkilemediği bildirilmiştir (Sridharan ve ark., 2007). Benzer şekilde bu tez çalışmasından elde edilen bulgular da demir eksikliğinin doğrudan veya Hif-1 α aracılı ETZ'deki kompleks I ve/veya III aktivitelerini etkilenmediği yönündedir.

Çalışmamızda, mitokondride maksimum Ψ depolarizasyona ulaşma hızı DMOG inkübasyonu ile azalırken DFO inkübasyonundan etkilenmedi (Şekil 3.3.d.). DFO grubunda maksimum Ψ depolarizasyona ulaşma hızı değişmediğinden F_1F_0 -ATP sentaz enziminin aktivitesinin değişmediği, DMOG grubunda ise azalmış olabileceği düşünüldü. F_1F_0 -ATP sentaz aktivitesi normal olan hücrelerde oligomisinin hücre içi ATP miktarını azaltabilme olasılığını test etmek amacıyla hücreler 48 saat DFO (50 ve 100 μ M) inkübasyonunun üzerine F_1F_0 -ATP sentaz inhibitörü oligomisin (1 μ g/ml) ile 2 saat daha inkübe edildi. Daha önceki çalışmalarda da benzer bir deney protokolü uygulanmış ve 24 saat DMOG inkübasyonu sonrasında 2 saat süreyle oligomisin inkübasyonunun F_1F_0 -ATP sentaz aktivitesine etkisi bazal Ψ oluşumuna katkısı üzerinden değerlendirilmiştir (Sridharan ve ark., 2007). Ancak 48 saat DFO üzerine oligomisin ile ATP sentezinin önlenmesi hücre ölümünü daha fazla artırdığından bu grup deneylere devam edilmedi (sonuçlar gösterilmedi). Yukarıda tartışıldığı gibi DFO ve DMOG gruplarında oksidatif fosforilasyon kenetli ATP üretim kapasitesinde kontrole göre bir fark olmadığını göstermektedir. Ancak DFO grubunun aksine DMOG grubunda ATP'nin azalması oksidatif fosforilasyon gradienti korunsada ATP üretimi ile kenetinde bozulmalar olabileceğine işaret etmektedir. Normal fizyolojik şartlarda, mitokondri ETZ'deki elektron akışının %1-2 kadarının reaktif oksijen türevi (ROS) oluşumuna kaydığı tahmin edilmektedir (Gnaiger ve Kuznetsov, 2002; Turrens, 1997). Hif-1 α birikiminin olduğu hipoksik şartlarda mitokondrideki ETZ'in ATP üretimini yerine daha fazla ROS oluşumuna kaydığı düşünülmektedir (Chandel ve ark., 1998). Bu durumda oksidatif fosforilasyon yolu ile oluşan ATP miktarı azalır. Daha önceki çalışmamızda 48 saatlik hipoksi ile Hif-1 α birikiminin indüklendiği HL-1 hücrelerinde ROS oluşumunun arttığını göstermektedir (Simsek ve Kandilci, 2018). Ek olarak, bizim çalışmamıza benzer şekilde HL-1 hücrelerinde normoksik koşullarda Hif-1 α birikiminin hücreleri metabolik olarak oksidatif fosforilasyondan daha az net

ATP üreten glikoliz yolağına kaydırıldığı gösterilmiştir (Ong ve ark., 2014). Bu koşullar ve/veya F_1F_0 -ATP sentaz aktivitesinin azalması DMOG grubunda ATP azalmasının sebebi olabilir. Hücre kültüründe 24 saat DFO inkübasyonunun sitrik asit döngüsü enzimlerinin miktarını ve oksidatif fosforilasyonu azalttığı öne sürülmüştür. Hücrelerin azalan ATP'yi yerine koymak için glikoliz yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (Oexle ve ark., 1999). Diyet ile aneminin eşlik ettiği demir yetmezliği oluşturulmuş sıçan iskelet kas dokusunda, ATP sentezini artıran mitokondrial matriks enzim miktarlarında (sitrat sentaz, izositrat dehidrogenaz gibi) artış gözlenmiştir (Ohira ve ark., 1987). Bizim DFO inkübasyonu deney sonuçlarımıza göre, mitokondrideki oksidatif fosforilasyon değişmemektedir ancak yukarıda bahsedildiği gibi sitoplazmada ATP miktarını artıran bir kompanzasyon mekanizmasının devreye girmiş olabilir.

Bu çalışmada demir şelasyonu oluşturmak için DFO kullanıldı. HL-1 hücre kültürü besiyerindeki demir ferritine (31.8 mg/l) bağlı şekilde bulunmaktadır (White ve ark., 2004). Ferritin, ferrik demiri yüksek afinite ($K_d: 10^{-29} M$) ile bağlar. Besiyerine doğrudan yüksek konsantrasyonda (1 mM) eklenen DFO'nun ferrik demire daha yüksek afinite ile bağlandığı ($K_d=10^{-31} M$) düşünüldüğünde hücre dışı demiri şelate ettiği düşünülebilir. DFO'nun hidrofilik yapısı kısa sürelerde (~2 saat) hücre içine girişini önlemektedir ancak daha uzun süreli inkübasyonlarda (24 saat) hücre içine girdiği bildirilmiştir (Bottomley ve ark., 1985; Richardson ve ark., 1994). DFO'nun hidrofilik yapısı hücre içindeki mitokondrial membranlardan geçişini de zorlaştırdığından mitokondrideki Fe-S komplekslerinde şelasyon yapmadığı düşünülmektedir (Ponka ve ark., 1979; Richardson ve ark., 2001). Nitekim, demir fazlalığının olduğu β -talasemi ve benzeri hastalıklarda demir şelasyonu amacıyla kullanılan DFO, mitokondrial demir birikiminin ön planda olduğu hastalıklarda (Friedreich ataksisi) kullanılmamaktadır (Babcock ve ark., 1997; Foury ve Cazzalini, 1997). HL-1 hücrelerinde demir eksikliğinden mitokondrial fonksiyonun ve ATP miktarının etkilenmemesi DFO'nun 48 saatte hücre membranından geçmiş olsa da (Hif-1 α birikimine yol açması ve hücre canlılığını etkilemesi) mitokondrial membranları aşamamış olmasına bağlı olabilir. Bu durumda DFO ile indüklenen demir eksikliğinin hücre canlılığını azaltıcı etkisi mitokondri fonksiyonu ile ilişkili

gözükmemektedir. Bu tez çalışmasından elde edilen ana bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 HL-1 hücrelerinde hücre içi total demir (Fe) şelasyonunun doğrudan ve dolaylı etkilerinin şematik gösterimi. Hücre içinde Fe azalması doğrudan hücre siklusunu durdurur. Fe azalması aynı zamanda Hif-1α üzerinden mitokondride disfonksiyona sebep olarak oksidatif fosforilasyon kaynaklı ATP üretimini azaltırken diğer taraftan glikolitik ATP üretimini artıracak yolları tetikler. ⊥: inhibisyon; →: aktivasyon; --->: azalan aktivasyon.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar demir eksikliğine aneminin eşlik ettiği durumlarda aneminin derecesine göre kardiyak enerji döngüsü ve kardiyomiyosit canlılığının olumsuz etkilenebileceğini ileri sürmektedir. Deneylerde demir eksikliği modeli için kullanılan şelatör DFO, mitokondrial oksidatif fosforilasyon yollarını doğrudan etkilemedi. İlerde bu yolların aktivitesinin Ψ ölçülerek değerlendirilmesi planlanmaktadır. Sonuçlarımız vücuttaki fazla demiri şelate etmek için yaygınca kullanılan DFO'nun doğrudan hücre mitokondrisine ulaşmadığı, dolayısı ile klinik kullanımda mitokondrial demir birikime bağlı hastalıklarda etkili bir şelatör olmadığını yönündeki bulguları desteklemektedir. Konunun daha açık şekilde anlaşılması için ilerde hücreye girişi daha kolay olan farklı bir demir şelatörünün kullanılması faydalı olacaktır.

Elde ettiğimiz bulgular ile demir eksikliğinin mitokondri fonksiyonu üzerindeki doğrudan ve dolaylı etkisi ortaya çıkartılmıştır. Bu sonuçların ileride kalp yetmezliği hastalıklarında klinik tedavi stratejileri geliştirilmesinde katkı sağlayabileceği ön görülmektedir.

ÖZET

Demir eksikliğinin HL-1 kardiyomiyositlerinde mitokondri fonksiyonu üzerine etkisi ve hipoksi ile indüklenen faktörlerin rolü

Demir eksikliği kalp yetmezliği hastalarının yaklaşık yarısında gözlenen bir durumdur. Yapılan *in vivo* çalışmalarda demir eksikliğinin hipoksi ile indüklenen faktör (Hif) gibi kardiyak hipoksi markerlarını artırdığı gösterilmiştir. Hücresel düzeyde yapılan çalışmalarda besiyerinden demirin uzaklaştırılması hif birikimi ve mitokondri disfonksiyonuna yol açtĐı öne sürülmüştür. Özellikle kalp gibi yüksek enerji ihtiyacı olan dokularda demir homeostazının korunması kritik öneme sahiptir ve demir eksikliği ve/veya hipoksi ilişkisi kalp yetmezliğine giden mekanizmalarda rol oynayabilir. Bu projede ilk defa fare atrial kökenli HL-1 hücrelerinde *in vitro* demir uzaklaştırılmasının mitokondrial fonksiyon üzerindeki etkisi incelendi. Hücre kültürü besiyerinden demiri uzaklaştırmak için demir şelatörü deferoksamin (DFO) kullanıldı ve hif birikimine etkisi gözlemlendi. Deneylerde mitokondrial disfonksiyonun demirin doğrudan elektron transport zinciri enzimleri üzerindeki ve hif aracılı etkilerini ayırtılabilmek için normoksida hif birikimi yapan dimetiloksalilglisin (DMOG) kullanıldı. Mitokondri fonksiyonu, hücresel ATP miktarı ve mitokondri potansiyeli (Ψ) ölçülerek değerlendirildi. 48 saatlik DFO inkübasyonu hücre çekirdeğinde Hif-1 α birikimine yol açtı. Bulgularımız, HL-1 hücrelerinde DFO ile oluşturulan uzun süreli demir eksikliği modelinde hücrenin mitokondri fonksiyonunun doğrudan etkilenmediğini ancak Hif-1 α üzerinden dolaylı etkiler oluşturabileceğini öne sürmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre demir eksikliği hücre canlılığını konsantrasyon bağımlı olarak etkilemektedir. DFO tarafından oluşturulan demir eksikliğinin bu etkisi Hif-1 α 'dan bağımsız gerçekleşmektedir. Özetle, bu çalışma demir eksikliğine aneminin eşlik ettiği durumlarda aneminin derecesini göre kardiyak enerji döngüsünün olumsuz etkilenebileceğini ileri sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hipoksi, Kalp yetmezliği, Demir yetersizliği, Mitokondri disfonksiyonu

SUMMARY

The effect iron deficiency and the role of hypoxia inducible factors on mitochondrial function in HL-1 cardiomyocytes

Iron deficiency is present in nearly half of the heart failure patients. *In vivo* previous studies suggest an upregulation on markers of cardiac tissue hypoxia such as hypoxia inducible factor (hif) by iron deficiency. Moreover, at cellular level it was shown that iron removal resulted in hif accumulation and mitochondrial dysfunction. Therefore, maintaining a normal iron homeostasis is crucial for cells that have a high energy demand such as cardiomyocytes and iron deficiency and/or hypoxia inter-relation may possibly take role in mechanisms leading to cardiac failure. In this project, the effect of iron depletion on mitochondrial function is originally investigated in vitro using atrium derived HL-1 cells. For the removal of iron from culture medium, iron chelating agent deferoxamine (DFO) was used and induction of hif accumulation was observed. In order to decouple the mixed direct effect of iron on electron transport chain enzymes and the indirect effects via hif, dimethyloxallylglycine (DMOG) was used which accumulates hif in normoxic conditions. Mitochondrial function was evaluated by measuring cellular ATP content and by quantifying mitochondrial potential (Ψ). 48 hours of DFO incubation resulted in Hif-1 α accumulation in nucleus. Our findings support the idea that mitochondrial function is not directly influenced by DFO induced iron deprivation in HL-1 cells but somewhat it may be indirectly affected by Hif-1 α . Moreover, iron deprivation decreases cell viability dose dependently. The effect of DFO induced iron deprivation on cell viability occurs independently from Hif-1 α . Briefly, iron deficiency with anemia, depending on the anemia level, may negatively affect cardiac energy metabolism.

Key words: Hypoxia, Heart failure, Iron deficiency, mitochondria dysfunction

KAYNAKLAR

- ABRAHAM J, LESLIE AG, LUTTER R, WALKER JE (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**: 621-628.
- 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.
- BABCOCK M, DE SILVA D, OAKS R, DAVIS-KAPLAN S, JIRALERSPONG S, MONTERMINI L, PANDOLFO M, KAPLAN J (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*, **276**: 1709-1712.
- BARACCA A, SGARBI G, SOLAINI G, LENA Z G (2003). Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Bba-Bioenergetics*, **1606**: 137-146.
- BARANKIEWICZ J, COHEN A (1987). Impairment of nucleotide metabolism by iron-chelating deferoxamine. *Biochem Pharmacol*, **36**: 2343-2347.
- BLAYNEY L, BAILEY-WOOD R, JACOBS A, HENDERSON A, MUIR J (1976). The effects of iron deficiency on the respiratory function and cytochrome content of rat heart mitochondria. *Circ Res*, **39**: 744-748.
- BOSETTI F, YU G, ZUCCHI R, RONCA-TESTONI S, SOLAINI G (2000). Myocardial ischemic preconditioning and mitochondrial F₁F₀-ATPase activity. *Mol Cell Biochem*, **215**: 31-37.
- BOTTOMLEY SS, WOLFE LC, BRIDGES KR (1985). Iron metabolism in K562 erythroleukemic cells. *J Biol Chem*, **260**: 6811-6815.
- BREALEY D, KARYAMPUDI S, JACQUES TS, NOVELLI M, STIDWILL R, TAYLOR V, SMOLENSKI RT, SINGER M (2004). Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol-Reg I*, **286**: R491-R497.
- CAMPANELLA M, PARKER N, TAN CH, HALL AM, DUCHEN MR (2009). IF(1): setting the pace of the F(1)F(o)-ATP synthase. *Trends Biochem Sci*, **34**: 343-350.
- CHANDEL NS, MALTEPE E, GOLDWASSER E, MATHIEU CE, SIMON MC, SCHUMACKER PT (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *P Natl Acad Sci USA*, **95**: 11715-11720.
- CHEN C, KO Y, DELANNOY M, LUDTKE SJ, CHIU W, PEDERSEN PL (2004). Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*, **279**: 31761-31768.
- CHEN C, SAXENA AK, SIMCOKE WN, GARBOCZI DN, PEDERSEN PL, KO YH (2006). Mitochondrial ATP synthase. Crystal structure of the catalytic F₁ unit in a vanadate-induced transition-like state and implications for mechanism. *J Biol Chem*, **281**: 13777-13783.
- CHUNG YJ, LUO A, PARK KC, LOONAT AA, LAKHAL-LITTLETON S, ROBBINS PA, SWIETACH P (2019). Iron-deficiency anemia reduces

- cardiac contraction by downregulating RyR2 channels and suppressing SERCA pump activity. *JCI Insight*, **4**
- CRIFO B, SCHAIBLE B, BROWN E, HALLIGAN DN, SCHOLZ CC, FITZPATRICK SF, KIRWAN A, ROCHE HM, CRISCUOLI M, NALDINI A, GIFFNEY H, CREAN D, BLANCO A, CAVADAS MA, CUMMINS EP, FABIAN Z, TAYLOR CT (2019). Hydroxylase Inhibition Selectively Induces Cell Death in Monocytes. *J Immunol*, **202**: 1521-1530.
- DAVOUDI M, KALLIJARVI J, MARJAVAARA S, KOTARSKY H, HANSSON E, LEVEEN P, FELLMAN V (2014). A mouse model of mitochondrial complex III dysfunction induced by myxothiazol. *Biochem Biophys Res Commun*, **446**: 1079-1084.
- DE DOMENICO I, WARD DM, KAPLAN J (2009). Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation. *Blood*, **114**: 4546-4551.
- DEGLI ESPOSTI M (1998). Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta*, **1364**: 222-235.
- DEMAEYER E, ADIELS-TEGMAN M (1985). The prevalence of anaemia in the world. *World Health Stat Q*, **38**: 302-316.
- DENIC S, AGARWAL MM (2007). Nutritional iron deficiency: an evolutionary perspective. *Nutrition*, **23**: 603-614.
- DOENST T, NGUYEN TD, ABEL ED (2013). Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res*, **113**: 709-724.
- DONG F, ZHANG X, CULVER B, CHEW HG, JR., KELLEY RO, REN J (2005). Dietary iron deficiency induces ventricular dilation, mitochondrial ultrastructural aberrations and cytochrome c release: involvement of nitric oxide synthase and protein tyrosine nitration. *Clin Sci (Lond)*, **109**: 277-286.
- FINCH CA, MILLER LR, INAMDAR AR, PERSON R, SEILER K, MACKLER B (1976). Iron deficiency in the rat. Physiological and biochemical studies of muscle dysfunction. *J Clin Invest*, **58**: 447-453.
- FOURY F, CAZZALINI O (1997). Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett*, **411**: 373-377.
- FUKUDA R, ZHANG H, KIM JW, SHIMODA L, DANG CV, SEMENZA GL (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, **129**: 111-122.
- GERTZ EW, WISNESKI JA, STANLEY WC, NEESE RA (1988). Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest*, **82**: 2017-2025.
- GNAIGER E, KUZNETSOV AV (2002). Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem Soc T*, **30**: 252-258.
- GRAY LR, TOMPKINS SC, TAYLOR EB (2014). Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci*, **71**: 2577-2604.
- HADDAD S, WANG Y, GALY B, KORF-KLINGEBIEL M, HIRSCH V, BARU AM, ROSTAMI F, REBOLL MR, HEINEKE J, FLÖGEL U, GROOS S, RENNER A, TOISCHER K, ZIMMERMANN F, ENGELI S, JORDAN J, BAUERSACHS J, HENTZE MW, WOLLERT KC, KEMPF T (2017). Iron-regulatory proteins secure iron availability in cardiomyocytes to prevent heart failure. *Eur Heart J*, **38**: 362-372.

- HATCHER HC, SINGH RN, TORTI FM, TORTI SV (2009). Synthetic and natural iron chelators: therapeutic potential and clinical use. *Future Med Chem*, **1**: 1643-1670.
- HOES MF, GROTE BEVERBORG N, KIJLSTRA JD, KUIPERS J, SWINKELS DW, GIEPMANS BNG, RODENBURG RJ, VAN VELDHUISEN DJ, DE BOER RA, VAN DER MEER P (2018). Iron deficiency impairs contractility of human cardiomyocytes through decreased mitochondrial function. *Eur J Heart Fail*, **20**: 910-919.
- HOYES KP, HIDER RC, PORTER JB (1992). Cell cycle synchronization and growth inhibition by 3-hydroxypyridin-4-one iron chelators in leukemia cell lines. *Cancer Res*, **52**: 4591-4599.
- HUANG LJ, CHUANG IC, DONG HP, YANG RC (2011). HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1 alpha REGULATES THE EXPRESSION OF THE MITOCHONDRIAL ATPase INHIBITOR PROTEIN (IF1) IN RAT LIVER. *Shock*, **36**: 90-96.
- KE Q, COSTA M (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, **70**: 1469-1480.
- KEBERLE H (1964). The Biochemistry of Desferrioxamine and Its Relation to Iron Metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, **119**: 758-768.
- KICIC A, CHUA AC, BAKER E (2001). Effect of iron chelators on proliferation and iron uptake in hepatoma cells. *Cancer*, **92**: 3093-3110.
- KIM JW, TCHERNYSHYOV I, SEMENZA GL, DANG CV (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*, **3**: 177-185.
- LAKHAL-LITTLETON S (2019). Mechanisms of cardiac iron homeostasis and their importance to heart function. *Free Radic Biol Med*, **133**: 234-237.
- LANE DJ, MERLOT AM, HUANG ML, BAE DH, JANSSON PJ, SAHNI S, KALINOWSKI DS, RICHARDSON DR (2015). Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim Biophys Acta*, **1853**: 1130-1144.
- LAWEN A, LANE DJ (2013). Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxid Redox Signal*, **18**: 2473-2507.
- LENAZ G, BARACCA A, FATO R, GENOVA ML, SOLAINI G (2006). New insights into structure and function of mitochondria and their role in aging and disease. *Antioxid Redox Signal*, **8**: 417-437.
- LONG Q, YANG K, YANG Q (2015). Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. *Am J Cardiovasc Dis*, **5**: 19-32.
- MENON A, CREO P, PICCOLI M, BERGANTE S, CONFORTI E, BANFI G, RANDELLI P, ANASTASIA L (2018). Chemical Activation of the Hypoxia-Inducible Factor Reversibly Reduces Tendon Stem Cell Proliferation, Inhibits Their Differentiation, and Maintains Cell Undifferentiation. *Stem Cells Int*, **2018**: 9468085.
- MITCHELL P (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, **191**: 144-148.
- MORDI IR, TEE A, LANG CC (2018). Iron Therapy in Heart Failure: Ready for Primetime? *Card Fail Rev*, **4**: 28-32.

- OEXLE H, GNAIGER E, WEISS G (1999). Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation. *Bba-Bioenergetics*, **1413**: 99-107.
- OHIRA Y, CARTIER LJ, CHEN M, HOLLOSZY JO (1987). Induction of an increase in mitochondrial matrix enzymes in muscle of iron-deficient rats. *Am J Physiol*, **253**: C639-644.
- ONG SG, LEE WH, THEODOROU L, KODO K, LIM SY, SHUKLA DH, BRISTON T, KIRIAKIDIS S, ASHCROFT M, DAVIDSON SM, MAXWELL PH, YELLON DM, HAUSENLOY DJ (2014). HIF-1 reduces ischaemia-reperfusion injury in the heart by targeting the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*, **104**: 24-36.
- PAPANDREOU I, CAIRNS RA, FONTANA L, LIM AL, DENKO NC (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*, **3**: 187-197.
- PONKA P, BOROVA J, NEUWIRT J, FUCHS O (1979). Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS Lett*, **97**: 317-321.
- READNOWER RD, BRAINARD RE, HILL BG, JONES SP (2012). Standardized bioenergetic profiling of adult mouse cardiomyocytes. *Physiol Genomics*, **44**: 1208-1213.
- RICHARDSON D, PONKA P, BAKER E (1994). The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell. *Cancer Res*, **54**: 685-689.
- RICHARDSON DR, MOURALIAN C, PONKA P, BECKER E (2001). Development of potential iron chelators for the treatment of Friedreich's ataxia: ligands that mobilize mitochondrial iron. *Biochim Biophys Acta*, **1536**: 133-140.
- RINEAU E, GAILLARD T, GUEGUEN N, PROCACCIO V, HENRION D, PRUNIER F, LASOCKI S (2018a). Iron deficiency without anemia is responsible for decreased left ventricular function and reduced mitochondrial complex I activity in a mouse model. *Int J Cardiol*, **266**: 206-212.
- RINEAU E, GAILLARD T, GUEGUEN N, PROCACCIO V, HENRION D, PRUNIER F, LASOCKI S (2018b). Iron deficiency without anemia is responsible for decreased left ventricular function and reduced mitochondrial complex I activity in a mouse model. *Int J Cardiol*, **266**: 206-212.
- RONKAINEN VP, RONKAINEN JJ, HANNINEN SL, LESKINEN H, RUAS JL, PEREIRA T, POELLINGER L, VUOLTEENAHO O, TAVI P (2007). Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J*, **21**: 1821-1830.
- ROUSLIN W (1991). Regulation of the mitochondrial ATPase in situ in cardiac muscle: role of the inhibitor subunit. *J Bioenerg Biomembr*, **23**: 873-888.
- ROUSLIN W, BROGE CW (1993). Mechanisms of ATP conservation during ischemia in slow and fast heart rate hearts. *Am J Physiol*, **264**: C209-216.
- SHCHEPINA LA, PLETJUSHKINA OY, AVETISYAN AV, BAKEEVA LE, FETISOVA EK, IZYUMOV DS, SAPRUNOVA VB, VYSSOKIKH MY, CHERNYAK BV, SKULACHEV VP (2002). Oligomycin, inhibitor of the F0 part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene*, **21**: 8149-8157.

- SIMSEK G, KANDILCI HB (2018). Hipoksi- Reoksijenasyon ile İndüklenen Kardiyak Mitokondrial Disfonksiyon. *J Ankara Univ Fac Med*, **71**: 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.
- SKARKA L, OSTADAL B (2002). Mitochondrial membrane potential in cardiac myocytes. *Physiol Res*, **51**: 425-434.
- SOLAINI G, HARRIS DA (2005). Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J*, **390**: 377-394.
- SRIDHARAN V, GUICHARD J, BAILEY RM, KASIGANESAN H, BEESON C, WRIGHT GL (2007). The prolyl hydroxylase oxygen-sensing pathway is cytoprotective and allows maintenance of mitochondrial membrane potential during metabolic inhibition. *Am J Physiol-Cell Ph*, **292**: C719-C728.
- TURRENS JF (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Rep*, **17**: 3-8.
- VAN RAAIJ MJ, ABRAHAMS JP, LESLIE AG, WALKER JE (1996). The structure of bovine F1-ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 6913-6917.
- WALKER JE (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans*, **41**: 1-16.
- WEIDEMANN A, JOHNSON RS (2008). Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ*, **15**: 621-627.
- WHITE SM, CONSTANTIN PE, CLAYCOMB WC (2004). Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol-Heart C*, **286**: H823-H829.
- WISNESKI JA, GERTZ EW, NEESE RA, GRUENKE LD, CRAIG JC (1985). Dual carbon-labeled isotope experiments using D-[6-¹⁴C] glucose and L-[1,2,3-¹³C₃] lactate: a new approach for investigating human myocardial metabolism during ischemia. *J Am Coll Cardiol*, **5**: 1138-1146.
- XU W, BARRIENTOS T, MAO L, ROCKMAN HA, SAUVE AA, ANDREWS NC (2015). Lethal Cardiomyopathy in Mice Lacking Transferrin Receptor in the Heart. *Cell Rep*, **13**: 533-545.
- YOSHIDA M, MUNHEYUKI E, HISABORI T (2001). ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**: 669-677.
- YOUNG I, PARKER HM, RANGAN A, PRVAN T, COOK RL, DONGES CE, STEINBECK KS, O'DWYER NJ, CHENG HL, FRANKLIN JL, O'CONNOR HT (2018). Association between Haem and Non-Haem Iron Intake and Serum Ferritin in Healthy Young Women. *Nutrients*, **10**
- ZHANG H, GAO P, FUKUDA R, KUMAR G, KRISHNAMACHARY B, ZELLER KI, DANG CV, SEMENZA GL (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell*, **11**: 407-420.
- ZHOU B, TIAN R (2018). Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest*, **128**: 3716-3726.