TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KÜLTÜR HÜCRELERİNDE AGONİST UYARIMI İLE OLUŞAN KALSİYUM SALINIMININ İLERİ YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Figen ÇİÇEK

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. MEHMET UĞUR

2010- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KÜLTÜR HÜCRELERİNDE AGONİST UYARIMI İLE OLUŞAN KALSİYUM SALINIMININ İLERİ YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Figen ÇİÇEK

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. MEHMET UĞUR

2010- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyofizik Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi:24/09/2010

Prof. Dr. Ongun ONARAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. Mehmet UĞUR
Ankara Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Nuhan PURALI
Hacettepe Üniversitesi

Doç. Dr. Can AKÇALI
Bilkent Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay ii

İçindekiler iii

Önsöz v

Simgeler ve Kısaltmalar vi

Şekiller vii

Çizelgeler xii

1. GİRİŞ

1.1. G Protein Kenetli Reseptörler ve Heterotrimerik G Proteinleri 1

1.2. IP_3 ve Fosfolipaz C 2

1.3. Bir Hücre İçi Haberci Olarak Ca^{2+} ve Önemi 3

1.4. IP_3 Reseptörü 7

1.5. Kuantal Kalsiyum Salınımı 9

1.6. Matematik Modelleme 11

1.7. Çalışmanın Amacı 14

2. **GEREÇ VE YÖNTEM**

2.1. Kültür Hücre Serilerinin Büyütülmesi 16

2.2. Hücrelerin Fluo-3 veya Fura-2 ile Yüklenmesi 16

2.3. Hücre içi Ca^{2+} Derişiminin Ölçümü ve Analizi 17

2.4. Kalıcı Transfeksiyonlar 18

2.5. IP_3 Derişim Değişimlerinin Ölçümü ve Analizi 18

2.6. Ca^{2+} Derişiminin Kalibrasyonu 19

2.7. Matematik Modelleme 20

2.7.1. Othmer Tang Modelinin Genel Özellikleri 20

2.7.2. Hücre Modelinde Kullanılan IP_3 Reseptör Modeli 21

2.7.3. Modelde Kullanılan Akılar ve Akı Denklemleri 23

2.8. İstatiksel Yöntem 31

3. **BULGULAR**

3.1. Agonist Uyarısı ile Oluşan Farklı Uzay_Zaman Desenli Yanıtlar 32

3.2. PMCA İnhibisyonunun $[Ca^{2+}]_i$ Etkisi 40

3.3. SERCA İnhibisyonunun Etkisi 44

3.4. SERCA ve PMCA'nın Birlikte İnhibisyonunun ACh Yanıtlarına Etkisi 48
3.5. Pompaların İnhibisyon Miktarı 49
3.6. Kalibre $[Ca^{2+}]_i$ Ölçümü 51
3.7. Kuantal Salınım 53
3.8. La^{3+} Varlığında Kuantal Salınım 54
3.9. Agonist Uyarısı Sonucunda Değişen $[IP_3]$ Kinetiği 58
3.10. Matematik Modelleme Bulguları 60
4. TARTIŞMA 62
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 89
ÖZET 91
SUMMARY 92
KAYNAKLAR 93
ÖZGEÇMİŞ 98

ÖNSÖZ

Bir ikinci haberci olan Inositol (1,4,5)-trisphosphate (IP_3) Endoplazmik Retikulum (ER) membranı üzerinde bulunan kendi reseptörüne bağlanarak bu organelde depolanan Ca^{2+}'un sitoplazmaya salınımına neden olur. Sitoplazmada Ca^{2+} derişiminin ($[Ca^{2+}]_i$) değişimi hücredeki pek çok fonksiyonun kontrolü için önemlidir. Uyarı ardından oluşan $[Ca^{2+}]_i$ artışı çok farklı uzaysal ve zamansal desenlerde olabilmektedir. Bu çalışmada Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) matematik modelini kullanarak deney bulgularımızı ve bu karmaşık salınım prosesini açıklamaya çalıştık.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında kıymetli yardımlarını ve desteklerini gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Belma TURAN'a ve danışman hocam Prof. Dr. Mehmet UĞUR'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasındaki matematik modelin oluşmasında çok büyük katkıları olan Dr. Kemal SAYAR'a, ayrıca Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Ab.D. Öğretim Üyeleri ve Asistanlarına, Ankara Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Teknolojileri AR-GE Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca hep yanımda olan sevgili Anne Babam; Selva-Gazi AMBER'e, Ağabeyim Gökhan AMBER'e ve gösterdiği anlayışa daima minnettar kalacağım çok değerli eşim Dr. Hakan ÇİÇEK'e teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
ATP	Adenozin trifosfat
CICR	**C**alcium **I**nduce **C**alcium **R**elease (Kalsiyum İndüklü Kalsiyum Salınımı)
CPA	Siklopiazonik Asit
DAG	Diaçilgliserol
ER	Endoplazmik Retikulum
FCS	Fetal Kalf Serum
GDP	Guanozin difosfat
GPCR	G-Protein Kenetli Reseptörleri
GTP	Guanozin trifosfat
GFP-PH	**G**reen **F**lourescent **P**rotein – **P**leckstrin **H**omology (Yeşil Floresan Protein – Plekstrin Homoloji)
IP_3	İnositol 1,4,5-trisfosfat
IP_3R	İnositol 1,4,5-trisfosfat Reseptörü
MC	**M**onte **C**arlo
PIP_2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PKC	Protein Kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
PMCA	Plazma Membran Ca^{2+} ATPaz
RYR	Ryanodin Reseptörü
SERCA	**S**arkoplazmik-**E**ndoplazmik **R**etikulum **C**a^{2+} **A**TPaz
SR	**S**arkoplazmik Retikulum
$[Ca^{2+}]_i$	Sitoplazmik Ca^{2+} derişimi
$[Ca^{2+}]_{ER}$	Endoplazmik Retikulum Ca^{2+} Derişimi
7-TM	7-**T**rans **M**embran

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. G Proteini Kenetli Reseptörler Aracılığı ile Oluşan Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Ana Hatları. 3

Şekil 1.2 $[Ca^{2+}]_{ER}$, Ca^{2+}'un depoya alınım hızını belirler. Üst panel; $[Ca^{2+}]_i$ BAPTA kullanılarak kenetlenmiş tek bir DRG nöronuna, 20 mM kafein ve 10 μM thapsigargin (TG) uygulanması sonrası elde edilen $[Ca^{2+}]_{ER}$ ölçümleri. **Alt panel;** Ca^{2+} un kafein uygulanması sonrası ER'ye SERCA aracılığı ile geri alınması ve TG uygulaması sonrası ER'den görünen Ca^{2+} sızıntısı sonucu ouşan $[Ca^{2+}]_{ER}$ değişim hızları ile $[Ca^{2+}]_{ER}$ arasındaki ilişki çizdirilmiştir (Solovyova ve ark., 2002, Verkhratsky., 2005). 6

Şekil. 1.3 Tip I ve Tip III IP_3R'ünün $[Ca^{2+}]$ cinsinden tek kanal açılma olasılıkları. a. Tip III IP_3R'ünün kanal aktivitesi. b. Tip I ve Tip III IP_3R'ünün sitozolik Ca^{2+} derişimine karşı tek kanal açılma olasılıkları (Hagar ve ark., 1998). 7

Şekil 1.4. Othmer-Tang Modeli. R: Çıplak reseptörü, I: IP_3'ü, RI: IP_3 bağlamış reseptörü, RIC^+: Aktivasyon bölgesine Ca^{2+} bağlı RI'yı, RIC^+C^-: İnhibitör bölgesine ek bir Ca^{2+} bağlı reseptörü temsil etmektedir. Ca^{2+} geçişi reseptör RIC^+ durumundayken gerçekleşir (Tang ve ark., 1996). 11

Şekil 1.5. Bezprozvanny-Ehrlich Modeli. Modele göre RIC^+ iletken durum (state) değildir. Sadece R^*IC^+ iletkendir. Ayrıca modelde tanımlanan açık durumdan inhibisyon durumuna olan doğrudan geçiş ER Ca^{2+}'nun kanal üzerindeki inhibitör etkisini temsil etmektedir (Tang ve ark., 1996). 11

Şekil 1.6. De Young-Keizer Modeli: Reseptörün 1 IP_3, 2 adet de Ca^{2+} bağlanma bölgesi vardır. Reseptörün bulunabileceği 8 ayrı durumdan yalnızca IP_3 ve Ca^{2+}'un pozitif bağlanma bölgesine bağlı durumunda iletkenlik olabilir (Tang ve ark., 1996). 12

Şekil 1.7. Atri-Amundson-Clapham-Sneyd Modeli. Bu modelde diğer 3 modelden farklı olarak, kanalın kapanabilmesi için negatif bölgeye 2 Ca^{2+} iyonunun kooperatif bağlanması gerekmektedir (Tang ve ark., 1996). 12

Şekil 1.8. Sneyd-Dufour Modeli (Sneyd ve Dufour, 2002) Reseptörün sadeleştirilmiş alt ünitesinin şeması. 13

Şekil 2.1. Othmer-Tang (Tang ve ark, 1996) modeline göre reseptöre, IP_3' ün ve Ca^{2+}'un sıralı bağlanma şeması. 21

Şekil 2.2. Şekil 2.2 IP_3 aracılı Ca^{2+} dinamiğini yaratan akıları gösteren diagram. Hücre içi Ca^{2+} dinamiğinde rol oynayan başlıca akılar: IP_3R'nden Ca^{2+} salınımı (Jr channel), Ca^{2+}'un tekrar sitoplazmaya alınması (Jr SERCA), PMCA tarafından sitoplazmadan uzaklaştırılması (Jm PMCA), ayrıca ER'den Ca^{2+}'un sızıntı şekilde çıkışı (Jr Leak). 23

Şekil 3.1. HEK 293 hücrelerinin farklı derişimlerde uygulanan ACh'e verdikleri Ca^{2+} yanıtları. A. 10^{-6} M ACh uygulaması (n= 46 hücre). **B.** 10^{-4} M ACh uygulaması (n= 40 hücre). 32

Şekil 3.2. 10^{-4} M ACh 20. s'de uygulanması ile birlikte oluşan farklı zamansal desenlere sahip ve tek hücrede ölçülmüş Ca^{2+} yanıtları. A. S (Sığ) olarak sınıflandırılan Ca^{2+} yanıtlarını temsil eden iki örnek. **B.** D (Derin) olarak sınıflandırılan Ca^{2+} yanıtlarına iki örnek. 34

Şekil 3.3. Hücrelerin 10^{-6} M ACh ve 10^{-4} M ACh'e verdikleri yanıtların tiplerine göre karşılaştırılması. Lacivert çubuklar; 10^{-6} M ACh, **kırmızı çubuklar;** 10^{-4} M ACh. *p<0,05 vs 10^{-6} M ACh S tipi yanıtlar, **#**p<0,05 vs 10^{-4} M ACh D tipindeki yanıtlar. 35

Şekil 3.4. Ca^{2+} Salınımın iki dönem olarak değerlendirilmesi. Salınım Boyunca (SB) ve Salınım Sonrası (SS). SB: $[Ca^{2+}]_i$'nun uyarı öncesi değerine dönene kadar olan dönem. SS: SB dönemi sonrası dönem. SZ: SB dönemi boyunca geçen zaman. TZ: SB ve SS dönemleri için toplam zaman. Örnekteki tek bir hücrenin yanıtı bu sınıflandırmaya göre değerlendirildiğinde SB için 5 osilasyon, SS için 2 osilasyon sayılmıştır. SZ 50 s iken, TZ 88 s'dir. 36

Şekil 3.5. Yanıtların 10^{-6} M ACh ve 10^{-4} M ACh uyarısı sonrasında yaptıkları osilasyon sayılarına göre karşılaştırılması. A. Hücrelerin gösterdikleri toplam osilasyon sayılarının dağılımının iki farklı ACh dozu için karşılaştırılması. **B.** SB ve tüm yanıt boyunca ortalama osilasyonların iki farklı doz için karşılaştırılması. ***** p<0,05 10^{-4} M vs 10^{-6} M ACh. 38

Şekil 3.6. Yanıt sürelerinin 10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh için karşılaştırılması. Kırmızı çubuklar; 10^{-4} M ACh, **lacivert çubuklar;** 10^{-6} M.ACh. 39

Şekil. 3.7. Yalnızca ACh (10^{-6} ve 10^{-4} M) uygulaması ve ACh uygulaması öncesi La^{3+} (1 mM) uygulaması ile elde edilen tipik yanıtların karşılaştırılması. A ve C, sırasıyla 10^{-6} M ve 10^{-4} M ACh uygulaması ile, **B ve D**, 1 mm La^{3+} ve sırasıyla 10^{-6} M ve 10^{-4} M ACh uygulaması ile görülen tipik yanıt örnekleri. (B'de Derin ve Sığ osilasyon gösteren iki ayrı hücreninin yanıtı aynı şekil üzerinde lacivert ve mavi olarak gösterilmiştir.) **D küçük şekil:** 1 mM La^{3+} uygulamasının tek başına etkisi. 40

Şekil 3.8. La^{3+}'ın 10^{-6} M ve 10^{-4} M ACh ile oluşan yanıt tiplerinin dağılımına etkisi. Lacivert çubuklar; 10^{-6} M ACh, **mavi çubuklar;** 1 mM La^{3+} ve 10^{-6} M ACh. **Kırmızı çubuklar;** 10^{-4} M ACh, **pembe çubuklar;** 1 mM La^{3+} ve 10^{-4} M ACh. 41

Şekil 3.9. Hücrelerin 1 mM La^{3+} varlığında 10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh uyarısı sonrasında yaptıkları osilasyonların sayıları, blokör uygulanmadığı durumdaki sayılarına göre karşılaştırılması. **A.** Hücrelerin yaptıkları osilasyonların yüzdelerinin 1 mM La^{3+} varlığında ve yokluğunda iki farklı doz için karşılaştırılması. **B.** SB dönemdeki ve toplamdaki osilasyon sayılarının iki farklı ACh dozu için La^{3+} varlığındaki ve yokluğunda karşılaştırılması. *****p<0,05 vs 10^{-4} M ACh SB dönem için ortalama osilasyon sayısı, #p<0,05 vs 10^{-4} M ACh SB dönemi ve toplam için ortalama osilasyon sayısı. 42

Şekil 3.10. Hücrelere 1 mM La^{3+} uygulamasının 10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh ile oluşan Ca^{2+} yanıtlarına süre bakımından etkisi. Lacivert çubuklar; 10^{-6} M ACh, **mavi çubuklar;** 1 mM La^{3+} ve 10^{-6} M ACh**. Kırmızı çubuklar;** 10^{-4} M ACh, **pembe çubuklar;** 1 mM La^{3+} ve 10^{-4} M ACh. *p<0,05 vs 10^{-4} M ACh SZ. **#**p<0,05 vs 10^{-4} M ACh TZ. 43

Şekil. 3.11. SERCA blokajı. SERCA inhibisyonunun tek başına $[Ca^{2+}]_i$ nasıl değiştirdiği 20 μM CPA uygulanarak incelendi. **Siyah eğri**, sitoplazmada yavaş artan ve yine yavaş azalan yanıtları, **noktalı eğri** sitoplazmada bir anda artan Ca^{2+} yanıtlarını temsil etmektedir. **Küçük grafik:** Her iki yanıt tipinin görülme oranları. **Siyah çubuk**, yavaş, **noktalı çubuk**, hızlı yanıtları temsil etmektedir. 44

Şekil 3.12. Tek başına ACh yanıtları ile CPA varlığında ACh yanıtları. A. 10^{-4} M ACh uygulaması. **B.** Deney solüsyonuna 20. s'de 20 μM CPA eklenmesi ardından 10^{-4} M ACh uygulaması. **C.** 10^{-6} M ACh uygulaması. **D.** Deney solüsyonuna 20. s'de 20 μM CPA eklenmesi ardından 10^{-4} M ACh uygulaması ile elde edilen eğriler. 45

Şekil 3.13 CPA'in Ca^{2+} osilasyonlarına etkisi. Hücrelerin CPA varlığında 10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh uyarısı sonrasında yaptıkları toplam osilasyon sayılarının dağılımının blokör uygulanmadığı durumdaki sayılarla karşılaştırılması. **Kırmızı ve mavi çubuklar** CPA uygulanmamış, **pembe ve buz mavisi çubuk** ise 20 μM CPA uygulanmış hücrelerde sırasıyla 10^{-4} ve 10^{-6} M ACh uyarısı ile oluşan yanıtlardaki osilasyon sayılarının dağılımını göstermektedir. 46

Şekil 3.14. CPA'in tek başına ve agonist uyarılarıyla oluşan Ca^{2+} yanıt sürelerine etkisi. Kırmızı Çubuklar: 10^{-4} M ACh uygulaması. **Mavi Çubuklar:** 10^{-6} M ACh uygulanması ile elede edilen yanıt sürelerinin ortalaması. **Açık mavi ve pembe renkteki çubuklar:** Agonist öncesinde 20 μM CPA'in uygulandığı durumlardaki ortalamaları göstermektedir. **Siyah Çubuk:** Tek başına 20 μM CPA uygulaması ile elde edilen yanıt sürelerinin ortalamasını göstermektedir. *p<0,05 vs tek başına 20 μM CPA yanıt süresi, **#**p<0,05 vs tek başına 20 μM CPA yanıt süresi. 47

Şekil 3.15. Her iki ATPaz blokajının $[Ca^{2+}]_i$'nun değişimine etkisi. Eğriler farklı hücrelerden ölçülmüştür. Farklı kimyasalların uygulandığı kayıtlar değişik renk kodları ile aynı grafikte gösterilmiştir. **Sarı eğri;** yalnızca 20. s'deki SERCA blokajını, **yeşil eğri**; 20. s'de SERCA ve PMCA'nın birlikte blokajını göstermektedir. **Kırmızı eğri:** 65. s'de sadece 10^{-4} M ACh uygulamasını, **kahverengi eğri**; 20. s'de SERCA ve PMCA inhibe edildikten sonra 65. s'de 10^{-4} M ACh uygulamasını göstermektedir. 48

Şekil 3.16. Ca^{2+} pompa inhibitörlerinin varlığında ACh uygulamasının kesilmesinin Ca^{2+} yanıtlarına etkisi. Farklı kimyasalların uygulandığı kayıtlar değişik renk kodları ile aynı grafikte gösterilmiştir. **Yeşil eğri:** 20 μM CPA ve 1 mM La^{3+} 35. s'de birlikte uygulanması. **Kırmızı eğri:** 45. s'de tek başına 10^{-4} M ACh uygulaması. **Kahverengi eğri:** 35. s'de 20 μM CPA ve 1 mM La^{3+} ardından 45. s'de 10^{-4} M ACh uygulanmıştır. 80. s'de deney solüsyonu içindeki kimyasalların derişimi değiştirilmeden perfüzyon yapılmıştır**. Siyah eğri:** 35. s'de 20 μM CPA ve 1 mM La^{3+} ardından 45. s'de 10^{-4} M ACh uygulanmıştır. 80. s'de deney solüsyonu içinden 10^{-4} M ACh uzaklaştırılıp (diğer kimyasalların derişimi değişmeden) perfüzyon gerçekleştirilmiştir. Tek bir kayıt sırasında Fura-2 AM ile yüklenmiş yaklaşık 50 hücrenin ortalama floresan şiddeti kaydedilmiştir. 50

Şekil 3.17. Maksimum doz agonist uygulamasıyla sitoplazmadaki $[Ca^{2+}]$ değişiminin nM olarak gösterimi. Hücrelere 10^{-4} M ACh 50. s'de uygulanmıştır. Kayıt sırasında yaklaşık 50 hücrenin ortalama floresan şiddeti kaydedilmiştir. 51

Şekil 3.18. SERCA inhibitörü uygulamasıyla sitoplazmadaki $[Ca^{2+}]$ değişiminin nM olarak gösterimi. Hücrelere 20 μM CPA 30. s'de uygulanmıştır. Kayıt sırasında yaklaşık 50 hücrenin ortalama floresan şiddeti kaydedilmiştir. 52

Şekil 3.19. SERCA inhibitörü ve ardından maksimum doz agonist uygulamasıyla sitoplazmadaki $[Ca^{2+}]$ değişiminin nM olarak gösterimi. Hücrelere 20 μM CPA 40. s'de, ardından 10^{-4} M ACh 65. s'de uygulanmıştır. Kayıt sırasında yaklaşık 50 hücrenin ortalama floresan şiddeti kaydedilmiştir. 52

Şekil 3.20. Kuantal Salınım. Hücreler önce 10^{-6} M ACh ile ardından 10^{-4} M ACh ile uyarıldı. **A ve B** de bu şekilde uyarılmış hücrelerde en sık görülen iki farklı yanıt desenine örnek verilmiştir. Bununla birlikte daha az rastlanan yanıt desenleri de sağ üstte küçük şekillerde gösterilmiştir. 53

Şekil 3.21. PMCA blokajının kuantal salınıma etkisi. A. Blokör uygulanmadığı durumda kuantal salınım. Deney sırasında önce 10^{-6} M ardından 10^{-4} M ACh uygulaması yapıldı. **B.** Deney solüsyonunda 1 mM La^{3+} varlığında 10^{-6} M ve ardından 10^{-4} M ACh uygulaması yapıldı. 54

Şekil 3.22. Kuantal salınımda PMCA blokajının ikinci yanıtların sürelerine etkisi. Daireler: 10^{-6} M ACh ardından uygulanan 10^{-4} M ACh yanıt süreleri. **Üçgenler:** 1 mM La^{3+} varlığında 10^{-6} M ACh ardından uygulanan 10^{-4} M ACh için yanıt süreleri. *p<0,05 La^{3+} yokluğunda vs varlığında ikinci ACh uygulaması ile oluşan yanıtın süresi (10^{-4} M ACh). Yatay siyah çizgiler ortalama, kırmızı çizgiler ise SEM değerlerini göstermektedir. Her iki grup için n=100. 55

Şekil 3.23. Kuantal yanıtlarda tepe değerlerin oranı. Yıldızlar; La^{3+} yokken, **dörtgenler;** La^{3+} varken yapılan deneylerde ikinci yanıtların tepe değerlerinin birinci yanıtların tepe değerlerine oranını göstermektedir. Her iki grup için n=100, *p<0,05 La^{3+} yokluğunda vs varlığında ikinci yanıt süreleri (10^{-4} M ACh/10^{-6} M ACh). 56

Şekil 3.24. Kuantal salınımda ilk yanıt ile ikinci yanıt arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon verisi. Kırmızı noktalar; 10^{-6} M ACh F/F_0 tepe değeri ile 10^{-4} M ACh F/F_0 tepe değerleri, (n=154 r: 0.44, p<0,0001), **siyah üçgenler;** La^{3+} varlığında 10^{-6} M ACh F/F_0 tepe değeri ile 10^{-4} M ACh F/F_0 tepe değerleri (n=103, r:0.63, p<0,0001) göstermektedir. 57

Şekil 3.25. IP_3'ün basamaklı artış kinetiği. Aynı gün yapılan iki ayrı deneyde, **A.** Tek hücre $[Ca^{2+}]_i$ yanıtları $10^{-6.5}$ M ACh ve ardından 10^{-4} M ACh uygulanarak elde edildi. **B.** eGFP–PH_{PLC} proteini eksprese eden diğer bir grup hücrede aynı agonist uygulamalarının yapılması ile elde edilen tek hücrede IP_3 kinetiği. 59

Şekil 4.1. Düşük doz olarak belirlenen IP_3 derişiminde her bir kombinasyon için simülasyon sonuçları ile deney bulgusu. **A.** Tek bir HEK 293 hücresinde 10^{-6} M (düşük doz) ACh uygulaması sonucu gözlenen tipik bir yanıt. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda 0,5 μM IP_3 uyarısı ile yapılmış simülasyon sonuçları. ACh ve IP_3 uyarı zamanları okla belirtilmiştir. 65

Şekil 4.2. Yüksek doz olarak belirlenen IP_3 derişiminde her bir kombinasyon için simülasyon sonuçları ile deney bulgusu. **A.** Tek bir HEK 293 hücresine 10^{-4} M (yüksek doz) ACh uygulaması sonrasında ölçülen tipik bir yanıt **B.** 10^{-4} M ACh uygulaması için Kalibre $[Ca^{2+}]_i$ ölçümleri. **C.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **F.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda 10 μM IP_3 uyarısı yapılmış simülasyon sonuçları. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. **Kırmızı kesikli çizgiler;** 10^{-4} M ACh için kalibre edilmiş $[Ca^{2+}]_i$ öçümümüzün ortalama tepe değerlerini, **mavi kesikli çizgiler;** literatürde bildirilen ortalama tepe değerlerini göstermektedir. 66

Şekil 4.3. Yüksek doz uyaran için simülasyon sonuçlarındaki birinci ve ikinci piklerin tepe değerlerinin karşılaştırılması. **A.** Belirtilen ER ve sitozolik $[Ca^{2+}]$ başlangıç değerlerindeki çözümlerinin yüksek doz uyarana verdiklerin yanıtın birinci piklerinin tepe değerlerinin, ölçtüğümüz 10^{-4} M ACh ile oluşan ve literatürde verilen agonist uyarısı ile oluşan tepe değerleri ile karşılaştırılması. **B.** Belirtilen ER ve sitozolik $[Ca^{2+}]$ başlangıç değerlerindeki model çözümlerinin yüksek doz uyarana verdiklerin yanıtın birinci piklerinin tepe değerlerinin, ölçtüğümüz 10^{-4} M ACh ile oluşan ve literatürde verilen agonist uyarısı ile oluşan tepe değerleri ile karşılaştırılması. 68

Şekil 4.4. Önce düşük doz ve ardından yüksek doz olarak uygulanan uyarılar için her bir kombinasyon için simülasyon sonuçları ile deney bulgusu. A. Tek bir HEK 293 hücresine önce 10^{-6} M ve sonra 10^{-4} M ACh uygulaması ile oluşan kuantal yanıtlar. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda önce 0,5 μM ve sonra 10 μM IP_3 uyarısı yapılmış simülasyon sonuçları. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. 69

Şekil 4.5. PMCA blokajı ve düşük doz IP_3 uygulaması. A. Tek bir HEK 293 hücresine önce 1 mM La^{3+} ve ardından 10^{-6} M ACh uygulaması ile elde edilen yanıt. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşuluyla önce PMCA blokajı ve ardından 0,5 μM IP_3 uyarısı yapılmış simülasyon sonuçları. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. 71

Şekil 4.6. PMCA blokajı ve yüksek doz IP_3 uygulaması. A. Tek bir HEK 293 hücresine önce 1 mM La^{3+} ve ardından 10^{-4} M ACh uygulaması ile elde edilen yanıt. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda PMCA blokajı ve ardından 10 μM IP_3 uyarısı yapılmış simülasyon sonuçları. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. **Kesikli çizgiler: Kırmızı kesikli çizgiler;** 10^{-4} M ACh uyarısındaki kalibre öçümümüzün tepe değerlerini, **mavi kesikli çizgiler;** literatürdeki agonist uyarısı için bildirilmiş ortalama tepe değerlerini göstermektedir. La^{3+} uygulaması bu değerleri etkilemediği için La^{3+} yokluğunda elde edilen değerler karşılaştırma için kullanılmıştır. 72

Şekil 4.7. Her bir kombinasyon için üç parametre setinde PMCA blokajı varlığında ve yokluğunda düşük ve yüksek dozda oluşturdukları yanıtlardaki osilasyonlar sayıldı. Simülasyon sonuçlarındaki osilasyon sayıları deney bulguları ile (her bir grafikteki çubuk desenler) ile karşılaştırıldı. **A.** 10^{-6} M ACh ve düşük doz IP_3 uyarısı (0.5 μM) ile oluşan osilasyonların sayıları. Belirtilen ER ve sitozolik $[Ca^{2+}]$ başlangıç koşuluna sahip modellerin çözümü ile elde edilen osilasyonların PMCA blokajı varlığında ve yokluğundaki sayıları. **Koyu mavi çubuk;** La^{3+} yokken ve **açık mavi çubuk;** La^{3+} varlığında 10^{-6} M ACh uyarısı ile deneysel olarak gözlenmiş osilasyonların sayıları. **B.** 10^{-4} M ACh ve yüksek doz (10 μM) IP_3 uyarısı için osilasyon sayıları. Model çözümlerinde elde edilen osilasyonların PMCA blokajı varlığında ve yokluğundaki sayıları. **Koyu kırmızı çubuk;** La^{3+} yokken ve **pembe çubuk;** La^{3+} varlığında 10^{-4} M ACh uyarısı ile deneysel olarak gözlenmiş osilasyon sayıları. 73

Şekil 4.8. PMCA blokajı varlığında ve yokluğunda düşük ve yüksek dozda oluşturdukları yanıtların süreleri her bir parametre seti için ölçüldü. Simülasyon sonuçlarındaki süreler deney bulgusu ile karşılaştırıldı (her bir grafikteki çubuk desenler). **A.** 10^{-6} M ACh ve düşük doz IP_3 uyarısı (0.5 μM) ile oluşan yanıt süreleri. Belirtilen ER ve sitozolik $[Ca^{2+}]$ başlangıç koşuluna sahip modellerin çözümü ile elde edilen yanıtların PMCA blokajı varlığında ve yokluğundaki süreleri. **Koyu mavi çubuk;** La^{3+} yokken ve **açık mavi çubuk**; La^{3+} varlığında 10^{-6} M ACh uyarısı ile deneysel olarak gözlenmiş yanıt süreleri. **B.** 10^{-4} M ACh ve yüksek doz IP_3 uyarısı (10 μM) için yanıt süreleri. Model çözümlerinde elde edilen cevapların PMCA blokajı varlığında ve yokluğundaki süreleri. **Koyu kırmızı çubuk;** La^{3+} yokken ve **pembe çubuk;** La^{3+} varlığında 10^{-4} M ACh uyarısı ile deneysel olarak gözlenmiş yanıt süreleri. 74

Şekil 4.9. PMCA blokajının kuantal salınıma etkisi. A. Tek bir HEK 293 hücresine 1 mM La^{3+} varlığında önce 10^{-6} M ACh daha sonra da 10^{-4} M ACh uygulaması ile gözlenen yanıt. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda PMCA blokajı ve önce 0,5 μM, sonrasında 10 μM IP_3 uyarısı yapılmış simülasyon sonuçları. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. 75

Şekil 4.10. Tek başına SERCA blokajı. A. Tek bir HEK 293 hücrelerinde 20 μM CPA uygulaması ile gerçekleştirilen SERCA blokajı sonrası gözlenen yanıt. **B.** Aynı hücrelerde 20 μM CPA uygulaması için kalibre $[Ca^{2+}]_i$ ölçüm sonuçları. **C.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **F.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda SERCA blokajı. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. **Kırmızı kesikli çizgiler;** CPA uygulaması ile oluşan 77

konsantrasyon değişikliklerinin tepe değerlerini göstermektedir.

Şekil 4.11. Kararlı durumda yapılan SERCA inhibisyonu ile elde edilen simülasyon sonuçlarının deney bulgusu ile karşılaştırılması. Belirtilen ER ve sitozolik [Ca^{2+}] başlangıç koşuluna sahip modellerde SERCA inhibisyonu sonrası elde edilen tepe değerleri. Deney ölçümü: HEK 293 hücrelerinde CPA uygulaması sonrası ölçülen $[Ca^{2+}]_i$ artışının tepe değeri. 78

Şekil 4.12. SERCA blokajı ve ardından düşük doz agonist uygulaması. A. Tek bir HEK 293 hücresinde 20 μM CPA uygulaması ile gerçekleştirilen SERCA blokajı ve ardından 10^{-6} M ACh uygulaması ile ölçülen yanıtlar. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda önce SERCA blokajı ve hemen ardından 0,5 μM IP_3 uygulaması ile yapılan model çözümleri. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. 79

Şekil 4.13. SERCA blokajı ve ardından yüksek doz agonist uygulaması. A. Tek bir HEK 293 hücresinde 20 μM CPA uygulaması ile SERCA blokajının gerçekleştirilmesi ardından 10^{-4} M ACh uygulanması ile ölçülen yanıt. **B.** 20 μM CPA ve ardından 10^{-4} M ACh uygulaması için kalibre $[Ca^{2+}]_i$ ölçümleri. **C.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **F.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşullarına sahip modellerde önce SERCA blokajı ve hemen ardından 0,5 μM IP_3 uygulaması ile elde edilen çözümler. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. **Kırmızı kesikli çizgiler;** kalibre ölçümümüzde CPA ve ardından 10^{-4} M ACh uygulaması için elde edilen tepe değerlerin ortalamasını göstermektedir. 80

Şekil 4.14. Agonist uyarımının SERCA blokajının yanıt sürelerine etkisi. A. Belirtilen başlangıç değerleri için kararlı durum sırasında SERCA blokajı yapılan model çözümlerindeki yanıt süreleri. (noktalar). Bar CPA uygulaması ardından gözlenen yanıtların ortalama süresini göstermektedir. **B ve C.** SERCA blokajı uygulanmadan veya uygulandıktan sonra ardından 0,5 μM (B) veya 10 μM (C) IP_3 uygulanan model çözümlerindeki yanıt süreleri. **Koyu mavi (kırmızı) noktalar;** yalnız IP_3 uygulaması, **açık mavi (pembe) noktalar;** SERCA blokajı ve ardından IP_3 uygulaması yapılan model çözmlerindeki yanıt sürelerini göstermektedir. **Koyu mavi (kırmızı) çubuklar;** sadece ACh uygulaması, **açık mavi (pembe) çubuklar;** CPA uygulamasından sonra ACh uygulaması yapılan deneylerde ölçülen sürelerin ortalama değerlerini göstermektedir. 82

Şekil 4.15. SERCA ve PMCA'nın birlikte blokajı. A. Tek bir HEK 293 hücresinde 20 μM CPA ve sonrasında 1 mM La^{3+} uygulaması ile SERCA ve PMCA blokajı gerçekleştirilmesi ile ölçülen yanıt. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşullarında SERCA ve PMCA'nın beraber bloke edildiği model çözümleri. 83

Şekil 4.16. SERCA ve PMCA'nın birlikte blokajının ardından yüksek doz agonist uygulaması. A. Tek bir HEK 293 hücresinde 20 μM CPA ile birlikte 1 mM La^{3+} uygulaması ile SERCA ve PMCA blokajı gerçekleştirildikten sonra hücreye 10^{-4} M ACh uygulaması ile ölçülen yanıt **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşullarında SERCA ve PMCA'nın beraber bloke edildiği ve ardından ve 10 μM IP_3 uygulamasının yapıldığı model çözümleri . Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. 84

Şekil 4.17 Yüksek doz agonist uyarısı ile birlikte SERCA blokajının yanıt süresine PMCA blokajının etkisi. Belirtilen başlangıç değereri için SERCA ve PMCA blokajı yapıldıktan sonra 10 μM IP_3 uygulaması (**siyah noktalar**) veya yalnızca SERCA blokajı arkasından 10 μM IP_3 uygulaması yapılan (**mavi noktalar**) model çözümlerinden elde edilen yanıt süreleri. **Siyah çubuk;** CPA ve La^{3+} uygulaması ardından ACh (10^{-4} M) uyarısı 85

ile oluşan yanıtlar için deneysel olarak ölçülen süreler. **Mavi çubuk;** sadece CPA uygulaması ardından ACh (10^{-4} M) uyarısı ile oluşan yanıtlar için ölçülen süreler.

Şekil 4.18. SERCA ve PMCA'nın birlikte blokajı, ardından 10^{-4}M ACh uygulaması ve son olarak ACh'nin banyo solüsyonundan perfüzyonla uzaklaştırılması. A. Bir grup HEK 293 hücresinde 20 μM CPA ile birlikte 1 mM La^{3+} uygulaması ile SERCA ve PMCA blokajı yapıldıktan sonra hücreye 10^{-4} M ACh uygulanarak ölçülen ortalama yanıt. Bir süre sonra ACh ortamdan yıkanarak uzaklaştırılmıştır. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda SERCA ve PMCA blokajı üstüne 10 μM IP_3 uygulanması yapılan ve bir süre sonra IP_3 uygulamasının kesildiği model çözümleri. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. 86

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Parametre Değer Aralıkları (Arama Uzayı).	29
Çizelge 2.2.	Parametre Seçim Kriterleri.	30
Çizelge 2.3.	Modelde kullanılan kararlı durum reseptör parametreleri.	30
Çizelge 2.4.	Parametre kümelerinde P_{SERCA} ve P_{PMCA} için inhibisyon yüzdeleri.	31
Çizelge 3.1.	$[Ca^{2+}]_{ER}$=500 μM, $[Ca^{2+}]_i$= 0,1 μM için parametre kümeleri.	60
Çizelge 3.2.	$[Ca^{2+}]_{ER}$ = 1000 μM $[Ca^{2+}]_i$ = 0,1 μM için parametre kümeleri.	60
Çizelge 3.3.	$[Ca^{2+}]_{ER}$ = 500 μM $[Ca^{2+}]_i$ = 0,1 μM için parametre kümeleri.	61
Çizelge 3.4.	$[Ca^{2+}]_{ER}$ = 1000 μM $[Ca^{2+}]_i$ = 0,03 μM için parametre kümeleri.	61

1. GİRİŞ

1.1. G Protein Kenetli Reseptörler ve Heterotrimerik G Proteinleri

Hücre yüzeyinde bulunan reseptör ailesinin en geniş üyelerini G protein kenetli reseptörler (GPCR) oluşturur. Bu reseptörler tüm ökaryotlarda bulunurlar. Yalnızca memelilerde binlercesi tanımlanmıştır; örneğin farenin yalnızca koku duyusu ile ilgili yaklaşık 1000 tane farklı GPCR bulunmaktadır. G protein kenetli reseptörler, hormon, nörotransmitter ve lokal mediatörleri kapsayan çok çeşitli sinyal molekülünün yanıtlarına aracılık eder. Aynı ligand farklı reseptör ailelerinin üyelerini aktive edebilir; örneğin adrenalin en az 9 ayrı tip GPCR aktive ederken, asetilkolin (ACh) 5, bir diğer nörotransmitter olan serotonin ise en az 15 farklı GPCR aktive edebilir. Kendilerine bağlanan sinyal molekülünün kimyasal ve fonksiyonel farklılıklarına rağmen, tüm G protein kenetli reseptörlerin temel yapıları birbirlerine benzer: Tek bir polipeptit zincirinin, lipit çift tabakayı bir iplik gibi ileri geri yedi defa geçmesinden dolayı yedi transmembran bölgeli (7-TM) reseptörler olarak da adlandırılırlar. GPCR'ların, hormon vd. ligandların bağlandığı, bir hücre dışı bölgesi ve G-proteinleri ile ilişkiyi sağlayan bir intraselüler bölgesi vardır.

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

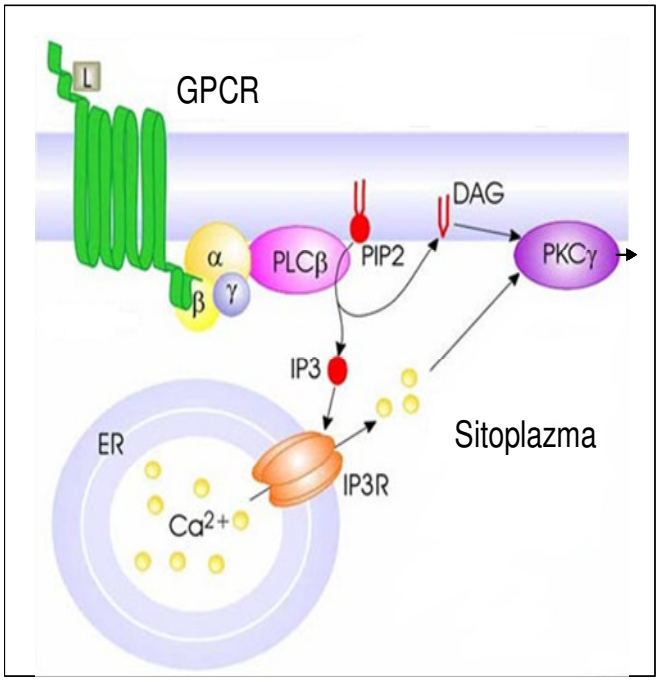
G Proteinleri; α, β ve γ olmak üzere üç protein alt ünitesinden oluşur. Uyarılmamış durumda α alt ünitesine GDP bağlıdır ve G proteini inaktif durumdadır. Reseptör aktivasyonu ile uyarıldığında α alt ünitesi kendisine bağlı halde bulunan GDP'yi salarak, yerine GTP'nin bağlanmasını sağlar. Bu değişim, trimerin aktive olmuş α alt

ünitesi ve βγ kompleksinden oluşan iki parçaya ayrılmasını sağlar. Trimerik G proteininin ayrılan iki parçası farklı farklı hedef proteinleri aktive edebilirler (Alberts ve ark., 2002).

1.2. IP_3 ve Fosfolipaz C

Bazı G proteini kenetli reseptörler, etkilerini plazma membranına bağlı bir enzim olan fosfolipaz C-β'yı (PLC- β) aktive eden G proteinleri aracılığıyla gösterirler. Fosfolipaz C (PLC), fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP_2) olarak adlandırılan ve lipit çift tabakanın hücre içine dönük yarısında az miktarda bulunan bir fosfolipide etki eder. Bu inositol fosfolipit sinyal yolunu kullanan GPCR'ler genel olarak bir G proteini çeşidi olan G_q üzerinden PLC-β'yı aktive ederler. Aktifleşen PLC, PIP_2'yi iki kısma ayırır: Inositol (1,4,5)-trisphosphate (IP_3) ve diaçilgliserol (DAG). Bu noktadan itibaren sinyal yolu da iki kola ayrılır. Küçük ve suda çözünebilen bir molekül olan IP_3, plazma membranından ayrılarak sitozole doğru hızla yayılır. Endoplazmik Retikuluma (ER) ulaştığında IP_3-kapılı Ca^{2+} kanallarına bağlanır (IP_3 reseptörü: IP_3R) ve kanalın açılmasını sağlar. ER'de depolanan Ca^{2+}, kanalların açılmasıyla birlikte sitoplazmaya salınmaya başlar ve sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonu hızla artar. Oluşan Ca^{2+} yanıtının sonlandırılması bazı mekanizmalar yardımı ile olur: (1) Özel fosfatazların yardımı ile IP_3 hızla IP_2'ye defosforile edilir. (2) IP_3 başka bir hücre içi haberci olduğu düşünülen IP_4'e fosforile edilir. (3) Sitozole giren Ca^{2+}, PMCA (Plazma Membran Ca^{2+}ATPaz) tarafından hızla dışarı atılırken, SERCA (Sarkoplazmik-Endoplazmik Retikulum Ca^{2+}ATPaz) tarafından da ER'ye geri alınır.

$PI(4,5)P_2$'nin hidrolizi ile üretilen IP_3 hücre içi Ca^{2+} derişimini arttırırken, eş zamanlı olarak $PI(4,5)P_2$'nin diğer parçası olan DAG bir serine/threonine protein kinaz olan protein kinaz C'yi (PKC) aktive eder (Alberts ve ark., 2002). PKC pek çok hücre içi proteini fosforile ederek bu proteinlerin aktivasyonunu sağlar ve hücrenin fonksiyonu açısından geniş erimli etkilere neden olur. Aktifleşen PKC sitozolden hücre membranına yer değiştirir ve hücre tipine göre değişen çeşitli hedef proteinleri fosforile eder (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 G Proteini Kenetli Reseptörler Aracılığı ile Oluşan Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Ana Hatları.

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

Hücre dışından gelen sinyallerin bir çoğu hücre içinde, sitoplazmik serbest Ca^{2+} derişiminin ($[Ca^{2+}]_i$) artışına neden olur. Ca^{2+}'un sitozoldeki derişiminin oldukça düşük ($\approx 10^{-7}$ M), hücre dışı sıvıdaki ve ER'deki derişiminin ise yüksek olmasından dolayı ($\approx 10^{-3}$ M), bir çok hücrede Ca^{2+} bir hücre içi sinyal molekülü olarak kullanılır. Ca^{2+}'u, plazma ve ER membranlarından sitozole doğru iten büyük bir elektro-kimyasal gradiyent nedeni ile plazma ve ER membranlarında bulunan Ca^{2+} kanallarının geçici olarak açılmasını sağlayacak bir sinyal, Ca^{2+} un hızla sitozole akmasına ve sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunun 10^{-7} M'lardan $5x10^{-6}$ M'lara kadar artmasına neden olur (Alberts ve ark., 2002). Böylece hücre içinde bulunan Ca^{2+}'a duyarlı proteinlerin aktive olması ve hücrenin belirli fonksiyonları yerine getirmesi sağlanır. Örneğin hücre kasılması tetiklenir veya hücrelerin gelişip, farklılaşması kontrol edilir. Hücrelerde, elektriksel olarak uyarılabilirliği, membran trafiği, kasılma gibi olayların düzenlenmesinde bu artış kilit rol oynar (Berridge ve ark, 1998).

Hücre içinde [Ca^{2+}]'nun kontrolünde esas rol oynayan üç oyuncudan bahsetmek mümkündür.

I- Ca^{2+} Kanalları

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

1. Voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları. Plazma membranında bulunurlar. Membranın depolarizasyonu ile açılarak Ca^{2+} girişini sağlarlar. Ca^{2+}'a seçicilik gösteren bu kanallar örneğin sinir son ucundan nörotransmitter salınmasında çok önemli bir rol alırlar (Penner ve Neher, 1988).
2. IP_3 ve Ryanodin Reseptörleri (RYR). Bu reseptörler ER veya sarkoplazmik retikulum (SR) membranında yerleşmiş multimerik proteinlerdir ve yapıca birbirlerine akraba iki protein ailesi oluştururlar. İnositol 1,4,5-trisfosfat (IP_3) ER membranında yerleşmiş olan IP_3R'ne bağlanır ve bu reseptörün bir parçası olan iyon kanalını aktive eder. Bunun sonucunda ER'den sitoplazmaya Ca^{2+} çıkışı gerçekleşir. RYR ise ya plazma membran potansiyelindeki değişimden voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları aracılığı ile etkilenerek (iskelet kasında olduğu gibi), ya da sitoplazmik tarafa bakan bölgelerine bağlanan Ca^{2+}'un aktive etmesi sonucu açılırlar ve SR'den Ca^{2+} salınmasını sağlarlar. Bu kanallar bir alkaloid olan ryanodin tarafından önce aktive daha sonra ise bloke edilebildikleri için bu ismi almışlardır.
3. Katyon kanalları. Bu kanallar kendilerine bağlanan bir ligand ile doğrudan aktive olabildikleri gibi (Nikotinik ACh reseptörleri) transmembran potansiyel değişimleri gibi başka uyarılarla da aktive olabilirler. Bu kanallar Ca^{2+} iyonlarının yanı sıra diğer katyonlara da geçirgendirler.

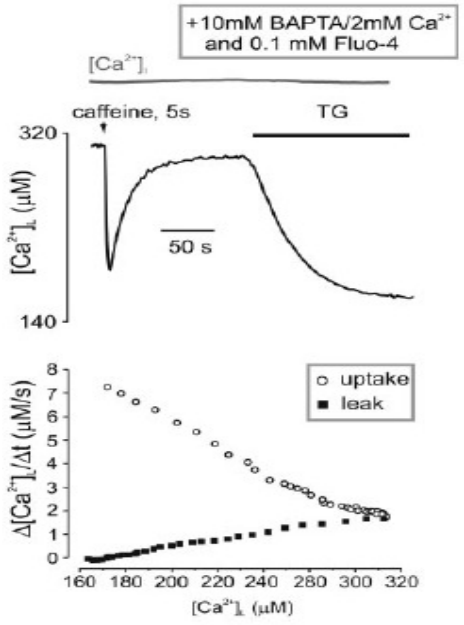
II- Hücre İçi Ca^{2+} Depoları ve Pompalar

Tüm ökaryotik hücrelerdeki ortak hücre içi kompartmanlardan biri olan ER, hücre alanının neredeyse yarısını kaplayarak, hücre içini tübüller ve keseciklerle bir ağ benzeri labirent gibi kaplar (Terasaki, 1994). ER membranı bu tübüller ve kesecikleri çevreleyerek ER lümenini sitozolden ayırır, seçici geçirgenlik gösteren bir bariyer oluşturur. ER Ca^{2+} iyonları için bir depo görevi görür. ER sitozolü bir ağ gibi sarsa da organelin içindeki Ca^{2+} depolarının bağımsız ünitelerden oluştuğunu söyleyen çalışmalarda (Golovina ve Blaustein, 1997) mevcuttur.

Ca^{2+}'un ER/SR'ye geri alımından SERCA sorumludur. Enzimatik döngüsünün sitozolik tarafta 2 Ca^{2+} iyonunun bağlanması ile ATP (Adenozin trifosfat) bağımlı fosforilasyonun gerçekleştiği ve bu şekilde iyonların lumenal tarafa geçtiği düşünülmektedir. ATP, Ca^{2+}'un konsantrasyon gradiyentine karşı taşınması için gerekli enerjiyi sağlar (Falcke, 2004). Ca^{2+}'un depolara geri alınımını durdurmak için iki farklı SERCA blokörü kullanılmaktadır. Bunlar, SERCA'yı geri dönüşümsüz olarak bloke eden Tapsigargin (Bootman ve ark., 1995) ve geri dönüşümlü bloke eden siklopiazonik asittir (CPA). CPA'nın muhtemelen ATPaz'ın nükleotid bağlanma bölgesinde inhibisyon sağladığı düşünülmektedir (Seidler ve ark., 1989). Kararlı durumda lümen içi Ca^{2+} derişimini koruyan bir başka mekanizma da sızıntıdır. SERCA tarafından oluşturulan içeri doğru akıyı dengeler ve ER'nin aşırı dolmasını engeller. Hücrelere SERCA blokörü uygulanmasıyla gerçekleştirilen ölçümler ER'den sitozole doğru oluşan sızıntı akısı hakkında bilgi vermektedir. Sızıntının, rutenyum kırmızısı ile inhibe edilen RYR'den ve heparin ile bloke edilen IP_3R'den etkilenmemesi bunlar dışında bir mekanizmanın varlığını düşündürmektedir (Camello ve ark., 2002).

Canlı hücrede çeşitli tekniklerle (ER hedefli aequorin, Ca^{2+} duyarlı floresans proteinler veya sentetik floresans Ca^{2+} indikatörleri) yapılan ölçümlerde ER serbest Ca^{2+} derişiminin ($[Ca^{2+}]_{ER}$) 100-800 μM olduğu gösterilmiştir. Bu oldukça yüksek derişim ER'den sitozole doğru Ca^{2+} için sürdürücü kuvvet oluşmasına neden olur.

Böylece Ca^{2+} salınımı üzerinde genlik ve hız açısından doğrudan bir kontrol oluşur. Şekil 1.2'de üst panelde Solovyova ve ark.'nın (2002), $[Ca^{2+}]_i$'nun BAPTA tamponu kullanılarak kenetlendiği koşulda hücreye kafein ve TG uygulanmasıyla $[Ca^{2+}]_{ER}$ değişimlerinin ölçüldüğü deney bulguları verilmiştir. Alt panelde ise $[Ca^{2+}]_{ER}$ ile sızıntı ve SERCA akıları arasındaki ilişki gösterilmektedir. Sızıntı ve geri alım hızları $[Ca^{2+}]_{ER}$ ile doğrusal olarak değişmektedir (Solovyova ve ark., 2002 ve Verkhratsky, 2005). Ancak şekilde $[Ca^{2+}]_{ER}$ ile SERCA akısı arasındaki ters orantının eğimi sızıntı akısı için olan eğimden daha büyüktür. Bu da SERCA'nın inhibisyonu sonrasında görünür hale gelen sızıntıdan başka bir de SERCA aktivitesine bağlı ikinci bir sızıntı mekanizmasının olduğunu düşündürmektedir. Bu ikinci tip sızıntı örneğin SERCA'nın sızıntılı çalışmasından kaynaklanabilir. SERCA'nın Ca^{2+}'u ER'ye taşıması için kullanabileceği enerji, hidrolize edebileceği ATP enerjisi ile sınırlıdır, konsantrasyon gradyenti pompanın karşılayabildiği değerin üstündeyken pompalama işleminin durmasının bir mekanistik açıklaması da bu pompa sızıntısı olabilir.

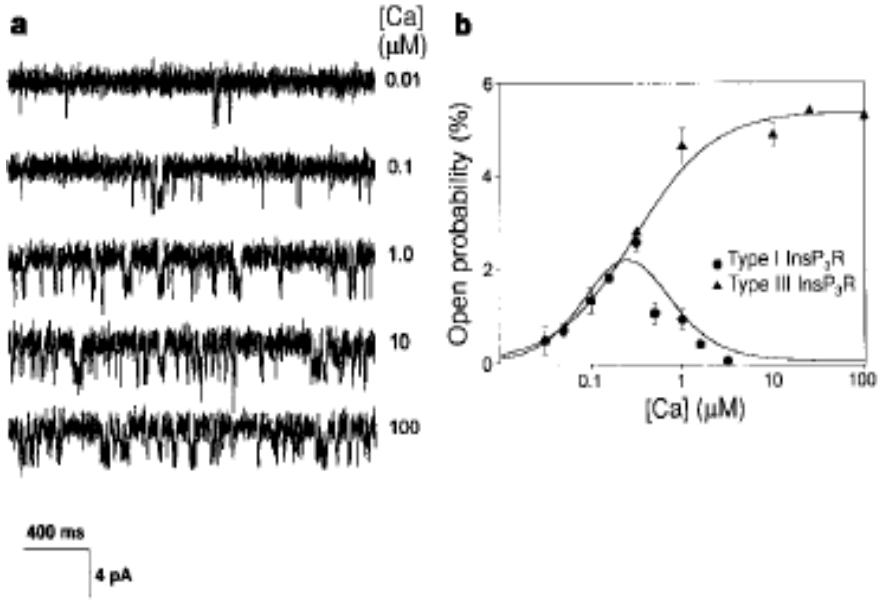


Şekil 1.2 $[Ca^{2+}]_{ER}$, Ca^{2+}'un depoya alınım hızını belirler. Üst panel; $[Ca^{2+}]_i$ BAPTA kullanılarak kenetlenmiş tek bir DRG nöronuna, 20 mM kafein ve 10 μM thapsigargin (TG) uygulanması sonrası elde edilen $[Ca^{2+}]_{ER}$ ölçümleri. **Alt panel;** Ca^{2+} un kafein uygulaması sonrası ER'ye SERCA aracılığı ile geri alınması ve TG uygulaması sonrası ER'den görünen Ca^{2+} sızıntısı sonucu ouşan $[Ca^{2+}]_{ER}$ değişim hızları ile $[Ca^{2+}]_{ER}$ arasındaki ilişki çizdirilmiştir (Solovyova ve ark., 2002, Verkhratsky, 2005).

ER/SR Ca^{2+} derişimini etkileyen diğer oyuncular sitoplazmik Ca^{2+}'u hücre dışına taşıyan PMCA ve ayrıca yine plazma membranında yerleşmiş bulunan Na^{+}-Ca^{2+} değiş-tokuşcusudur. La^{3+}'un 1 mM civarındaki derişimleri PMCA'nın blokajı için kullanılmaktadır (Shimizu ve ark., 1997).

1.4. IP_3 Reseptörü

IP_3R'ü elektriksel olarak uyarılmayan hücrelerdeki temel Ca^{2+} salma kanalıdır. Memelilerde 3 alt tipi bulunur: IP_3R tip 1 (IP_3R1), IP_3R tip 2 (IP_3R2) ve IP_3R tip 3 (IP_3R3) (Tu ve ark., 2005). Bu 3 alt tipin ekspresyonu hücre tipine göre farklılık gösterir. Reseptör kanallar 4 alt üniteden oluşan 4 IP_3 molekülü bağlayabilen 2700 amino asit uzunluğunda proteinlerdir. Sitozolik tarafta 7, lumenal tarafta 1 tane Ca^{2+} bağlanma bölgesi bulunur.



Şekil. 1.3 Tip I ve Tip III IP_3R'ünün [Ca^{2+}] cinsinden tek kanal açılma olasılıkları. a. Tip III IP_3R'ünün kanal aktivitesi. b. Tip I ve Tip III IP_3R'ünün sitozolik Ca^{2+} derişimine karşı tek kanal açılma olasılıkları (Hagar ve ark., 1998).

IP_3R kanalları rastgele açılır ve kapanırlar. Açılma olasılıkları reseptörün bulunduğu duruma (state) bağlıdır. Bu durum ise çoğunlukla Ca^{2+} un ve/veya IP_3 ün bağlı olup olmamasına göre belirlenir. Açılma olasılığının en yüksek olduğu durum IP_3 molekülünün ve Ca^{2+}'un reseptörün sitoplazmik tarafında bulunan aktive edici bölgeye bağlı olduğu durumdur. Sitozolik taraftaki Ca^{2+}'a bu bağımlılık kanallar arasındaki haberleşme olasılığını da doğurur. Bir kanaldan salınan Ca^{2+} diğer kanalların açılma olasılığını da etkiler. Bu durum, Kalsiyum ile İndüklenen Kalsiyum Salınıma (CICR) (bir kanaldan salınan Ca^{2+}'un sitozole difüzyonu ile komşu kanalların açılma olasılığını arttırması) olarak tanımlanmıştır. Ca^{2+} yüksek derişimlere ulaştıkça Ca^{2+}'un açılma olasılığı da düşer (Skupin ve Falcke, 2008).

Reseptör tipleri Ca^{2+}'a yanıtları açısından farklılık gösterir. Hagar ve ark., (1998) yaptıkları çalışmada bu farklılığı göstermişlerdir. Buna göre 2 μM IP_3 varlığında Ca^{2+}, Tip1 IP_3R'nü bifazik bir şekilde kontrol etmektedir. Düşük derişimlerde kanalı aktive etmekte yüksek derişimlerde ise inhibe etmektedir. Tip 3 ise Ca^{2+} bağımlı bir inhibisyon göstermemektedir (Şekil 1.3).

Kompleks uzaysal ve zamansal desenlere sahip Ca^{2+} salınımı endojen IP_3R veya RyR'lerinin fonksiyonel özelliklerine ve ER/SR membranındaki lokalizasyonlarına bağlıdır. On veya biraz fazla IP_3R veya RyR oluşturduğu kümelerdeki aktif reseptörler, sırasıyla Ca^{2+} "puff"ları veya "spark"ları olarak nitelendirilen, özerk, lokal kalan Ca^{2+} salınımları yapabileceği iddia edilmiştir. IP_3'ün daha yüksek derişimlerinde ise komşu Ca^{2+} salınım bölgeleri yeterince hassaslaşarak, sitoplazma uyarılabilir bir ortam haline gelir ve Ca^{2+} dalgaları oluşur (Marchant ve ark., 1999).

Pek çok hücrede IP_3R aktivasyonu hücrede baştan başa yayılan ve tekrarlayan Ca^{2+} dalgaları olarak tanımlanabilen $[Ca^{2+}]_i$'nun periyodik osilasyonlarına sebep olur. Pek çok hücre tipinde uyaranın şiddetine göre frekansı artan Ca^{2+} osilasyonları görülürken (Rooney ve ark., 1989; Berrdige ve ark., 2003; Salazar ve ark., 2008), bazı hücrelerde uyarı şiddetine bağlı olarak Ca^{2+} osilasyonlarının genliğinin değiştiği gözlenmiştir (Salazar ve ark., 2008).

Tek bir transient, tekrarlayan osilasyonlar veya kalıcı platolar şeklinde görülen Ca^{2+} sinyallerindeki bu farklılıkların, Ca^{2+}'un çeşitli agonist uyarılarını hücre içindeki mekanizmalara özgün şekilde iletmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Dolmetsch ve ark., 1997). Hücre içi Ca^{2+} osilasyonlarında ise genlik ve frekans açısından çok çeşitli farklılıklar görülmesinin uyarı şiddeti gibi bilgilerin kodlanmasını sağladığı düşünülmektedir (Falcke, 2004).

Reseptörün hem Ca^{2+} hem de IP_3 tarafından etkilenmesi dalga ve osilasyon gibi doğrusal olmayan yanıtların oluşmasına neden olur. Reseptör dinamiği Ca^{2+} ve IP_3 dışında ATP, pH, fosforilasyon, redoks potansiyeli ve ankirin, kalmodulin gibi aksesuar proteinler tarafından da düzenlenir (Taylor, 1998).

1.5. Kuantal Ca^{2+} Salınımı

Hücre içi Ca^{2+} depolarından agonist uyarımı sonucu gerçekleşen Ca^{2+} salınımı, agonist konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleşen dereceli bir salınımdır. IP_3 veya kafeinin düşük dozları sabit derişimde uygulanmalarına rağmen SR/ER içeriğinin yalnızca bir kısmını boşalttıktan sonra salınım dururken, uyaran dozunun arttırılmasıyla depolardan yeni bir salınım görülür (Bootman ve ark., 1994; Meyer ve Stryer, 1990; Muallem ve ark., 1989). Ca^{2+}'un IP_3R veya RyR kanalları aracılığı ile bu şekilde dereceli salınması "kuantal" Ca^{2+} salınımı olarak adlandırılmıştır (Muallem ve ark., 1989). Bu olay membran bütünlüğü bozulmamış hücrelerde farklı agonist derişimleri uygulanarak gözlendiği gibi membranları geçirgen hale getirilmiş hücrelere dışarıdan IP_3 uygulayarak (Muallem ve ark., 1989; Tanimura ve Turner, 1996) ve yalnızca IP_3R'lerinin olduğu veziküllerde yapılan deneylerde de (Ferris ve ark., 1992) görülmüştür. Ca^{2+} depolarının sonlu kapasiteleri ve IP_3R üzerinde CICR gibi pozitif geri besleme mekanizmaların varlığı ilk bakışta bu fenomenin varlığı ile uyuşmamaktadır. Literatürde kuantal Ca^{2+} salınımını açıklamak için öne sürülmüş pek çok hipotez mevcuttur:

1. Ca^{2+} depoları birbirinden bağımsız ünitelerden oluşmuştur. Her bir ünitenin IP_3'e farklı duyarlılığı vardır ve bunlar "hep ya da hiç" davranışı sergilerler. Her IP_3 dozu için farklı eşik değeri nedeniyle artan hormon konsantrasyonu için artan sayıda depodan Ca^{2+} salınımı gerçekleştirir (Muallem ve ark., 1989; Oldershaw ve ark., 1991; Bootman ve ark., 1992; Combettes ve ark,. 1992; Cheek ve ark.. 1993; Bootman ve ark., 1994).

2. Düşük doz IP_3 uyarısı nedeni ile depoda kalan Ca^{2+} kanalın afinitesini IP_3' e allosterik olarak azaltır ve bu şekilde depolardan kısmi salınım gerçekleşir (Irvine 1990; Koizumi ve ark., 1999).

3. Depodan Ca^{2+} çıkışı uyarı devam ettiği sürece devam eder ancak SERCA (ya da daha genel olarak sitoplazmadan Ca^{2+} uzaklaştıran tüm mekanizmalar) zamanla aktivite artışı göstererek bu çıkışı kompanse eder duruma gelir ve yeni bir kararlı duruma ulaşılır (Steenbergen ve Fay, 1996).

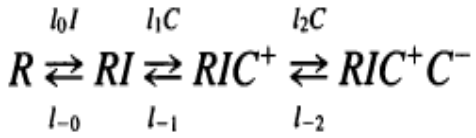
4. Agonist uyarımı ardından IP_3R'leri zamana bağlı olarak IP_3 uyarısına karşı adaptasyona uğrar, böylece depolardan Ca^{2+} çıkışı durur (Dawson ve ark., 2003).

Yukarıda özetlenmeye çalışılan hipotezlerin sorgulandığı çeşitli deneysel çalışmaların varlığına rağmen kuantal salınım mekanizması hala açıklanamamıştır. Bunun en önemli nedeni intakt hücrede $[Ca^{2+}]_{ER}$'yi ve reseptörün kinetik davranışını tam olarak ölçememizdir. Ayrıca, pek çok sistem parametresine sahip bu lineerlikten uzak sistemin dinamiğinin (osilasyon, *spark*, *puff*, frekans kodlama, vb.) daha iyi kavranabilmesi için deneysel çalışmalara eşlik eden teorik çalışmalara da gereksinim duyulmaktadır.

1.6. Matematik Modelleme

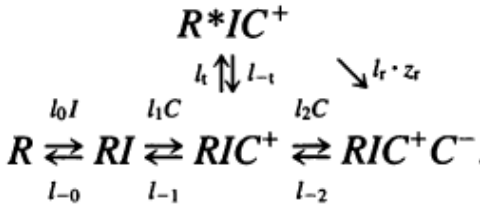
Tüm hücre matematiksel modellemelerinde IP_3R dinamiği ve kompartmanlar arasındaki Ca^{2+} değişimleri adi (ordinary) diferansiyel denklemler halinde yazılarak, tüm sistemin davranışı bir bütün olarak anlaşılmaya çalışılır. Derişimler tüm kompartmanlar içinde homojen sayılmıştır. Literatürdeki bazı modellerde IP_3R kinetiği şu şekilde gösterilmiştir:

Othmer-Tang modeli: Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) IP_3R'ü için 4 durumlu bir model önermiştir. Bağlanma Şekil 1.4'teki sırayı takip eder.



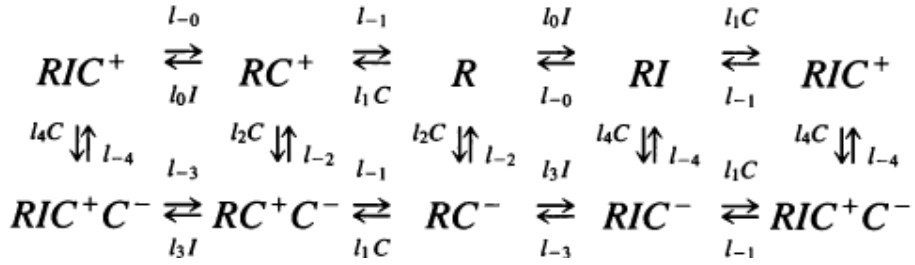
Şekil 1.4. Othmer-Tang Modeli. R: Çıplak reseptörü, I: IP_3'ü, RI: IP_3 bağlamış reseptörü, RIC^+: Aktivasyon bölgesine Ca^{2+} bağlı RI'yı, RIC^+C^-: İnhibitör bölgesine ek bir Ca^{2+} bağlı reseptörü temsil etmektedir. Ca^{2+} geçişi reseptör RIC^+ durumundayken gerçekleşir (Tang ve ark., 1996).

Bezprozvanny-Ehrlich modeli: Bezprozvanny ve Ehrlich (1994) Othmer-Tang modelinin (Tang ve ark., 1996) bir varyasyonunu önermiştir. Modele göre kanal ek bir durumda daha bulunur. Kanal kinetiği aşağıdaki Şekil 1.5'de şematize edilmiştir:



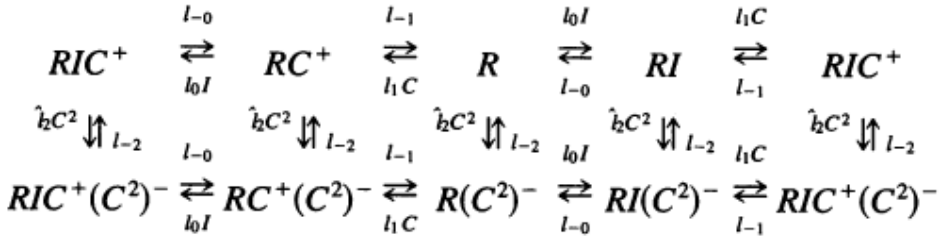
Şekil 1.5. Bezprozvanny-Ehrlich Modeli. Modele göre RIC^+ iletken durum (state) değildir. Sadece R^*IC^+ iletkendir. Ayrıca modelde tanımlanan açık durumdan inhibisyon durumuna olan doğrudan geçiş ER Ca^{2+}'unun kanal üzerindeki inhibitör etkisini temsil etmektedir (Tang ve ark., 1996).

De Young-Keizer modeli: De Young ve Keizer (1992) IP_3R için ilk kinetik modeli oluşturmuşlardır. Modele göre, IP_3 ve Ca^{2+} kanal kompleksine durum (state) bağımlı şekilde bağlanabilmektedir. Kanal kinetiği Şekil 1.6'da şematize edilmiştir:



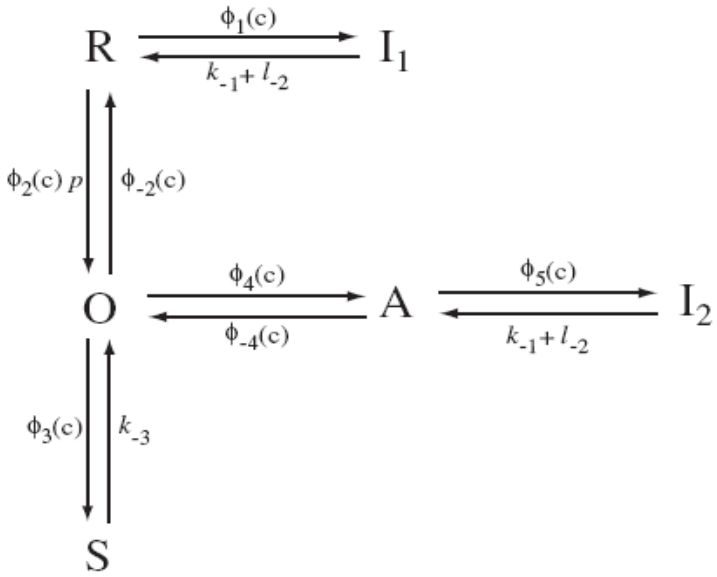
Şekil 1.6. De Young-Keizer Modeli: Reseptörün 1 IP_3, 2 adet de Ca^{2+} bağlanma bölgesi vardır. Reseptörün bulunabileceği 8 ayrı durumdan yalnızca IP_3 ve Ca^{2+}'un pozitif bağlanma bölgesine bağlı durumunda iletkenlik olabilir (Tang ve ark., 1996).

Atri-Amundson-Clapham-Sneyd modeli: Yukarıda bahsedilen 3 modele göre IP_3R'nün 3 regülatör bağlanma bölgesi bulunur: IP_3 bağlanma bölgesi, Ca^{2+}'un pozitif ve yine Ca^{2+}'un negatif bağlanma bölgeleri. Bu modelde ise kanalın kapanması için negatif bağlanma bölgesine iki adet Ca^{2+}'un bağlanması gereklidir. Kanal kinetiği Şekil 1.7'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.7. Atri-Amundson-Clapham-Sneyd Modeli. Bu modelde diğer 3 modelden farklı olarak, kanalın kapanabilmesi için negatif bölgeye 2 Ca^{2+}'un kooperatif bağlanması gerekmektedir (Tang ve ark., 1996).

Sneyd-Dufour Modeli: Reseptöre sırasıyla IP_3 ve Ca^{2+}'un bağlanması ve IP_3 bağlanmasının Ca^{2+} tarafından modülasyonu için yukarda bahsedilen modellerde reseptör için kararlı durum değerleri kullanılmıştır. Sneyd - Dufour (Sneyd ve Dufour, 2002) modelinde ise ilk defa IP_3 bağlanması ile birlikte reseptörün zamana bağlı uyumu (adaptasyonu) ve farklı iletim seviyeleri içeren dinamik veri modele fit edilmiştir. Kanal kinetiği Şekil 1.8'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.8. Sneyd-Dufour Modeli (Sneyd ve Dufour, 2002). Reseptörün sadeleştirilmiş alt ünitesinin şeması.

R reseptörün serbest durumunu göstermektedir. Alt ünite, açık durumuna (O State) IP_3 bağlayarak gelir. Bağlanma hızı Ca^{2+}'a bağlıdır; reseptör alt tipine bağlı olarak IP_3 bağlanmasını kolaylaştırır veya inhibe eder. Aktivasyon bağlanma bölgesine Ca^{2+} bağlanması reseptörün A durumuna geçmesine neden olur. A durumuna yalnızca O durumundan geçilebilir ve dolayısıyla Ca^{2+}'un sıralı bağlanması gerekmektedir. Alternatif olarak, alt ünite spontane biçimde Ca^{2+} bağlayarak inaktive olabilir. Kapalı (S) durumu reseptörün IP_3 bağlanması ile zamana bağlı inaktivasyona geçmesidir. İki inhibe durumundan I_1 Ca^{2+}'un serbest reseptöre bağlanması ile gerçekleşirken, I_2 ise yine Ca^{2+}'un ek olarak aktivasyon bölgesine bağlanmasıyla gerçekleşir. Reseptörün inhibisyon durumları arasında herhangi bir geçiş yoktur.

1.7. Çalışmanın Amacı

Literatürde mevcut olan pek çok hipotez agonist uyarısı ile ER'den sitozole Ca^{2+} salınımının karmaşık zaman ve uzay desenlerini gösteren deneysel veriyi açıklamaya çalışmıştır. Bu hipotezlerin doğrudan sınanmasının deneysel imkansızlığı IP_3R'nün aktivitesini ve bunun sonucunda oluşan Ca^{2+} yanıtını simüle edebilen matematik modeller ile çalışmayı gerektirmektedir. Pek çok modelde ise bu karmaşık salınım olaylarını açıklayabilmek için IP_3R reseptörüne deneysel olarak doğrulanamayan veya gözlenmeyen durumlar (state) ve alt üniteler eklenmiştir. Biz bu çalışmamızda, en az duruma sahip basit bir tam hücre matematik modeli olan Othmer-Tang modelini (Tang ve ark., 1996) kullanarak deney bulgularımızı ve bu karmaşık salınım sürecini açıklamanın mümkün olup olmadığını araştırdık. Özelliklede IP_3 uyarısının devam etmesine rağmen depolardan Ca^{2+} salınımının daha yüksek şiddette ikinci bir uyarıya kadar durması fenomeni (kuantal salınım) bazı negatif geri-besleme özellikleri olmadan açıklanması zor bir fenomendir. Literatürdeki bazı kuramsal modeller bu geri-besleme özelliğini IP_3R proteininde adaptif durumlar (state) varsayarak oluşturmaktadır. Bu tip modellerin açıklamaya çalıştıkları ve intakt hücrelerde elde edilen ölçümlerin yanı sıra diğer önemli bir grup veri de permeabilize edilmiş hücrelerde dışarıdan uygulanan sabit IP_3 ile gözlenen kuantal ^{45}Ca salınımını açıklamaktır. Bu deneylerde Ca^{2+}-pompaları, sitoplazmik Ca^{2+} derişimi gibi değişkenlerin kontrol altında tutulduğu var sayıldığından bu kuantal salınım özelliğinin IP_3R'nün bir çeşit zamana bağımlı inaktivasyonu-uyumu nedeni ile olduğu düşünülmüştür (Sneyd ve Dufour, 2002). Ancak IP_3R'nün böyle bir inaktivasyon gösterdiğine dair yeterli ikna ediciliğe sahip doğrudan deneysel bir veri elde edilememiştir. Ayrıca bir reseptörün geniş bir ligand derişim aralığında böyle adaptif bir özellik göstermesi konusunda bazı teorik sorunlar da dile getirilmiştir (Stern, 1996). Rastgele bazı geri-besleme elemanlarının modellere dahil edilmesi karmaşık kinetik davranışların taklit edilmesini sağlasa da bunların deneysel olarak gösterilmemeleri halinde Ca^{2+} homeostazisini kavramamıza yapacakları katkının değeri belirsizdir. Bu noktada esas soru, sadece deneysel gözlemlerle gösterilmiş veya desteklenmiş özelliklere sahip bir model hücre sisteminin deneysel olarak gözlenen hücresel Ca^{2+} dinamiğini hangi noktaya kadar açıklayabildiğinin

belirlenmesidir. Ancak bunun tespitinden sonra yeni mekanizmaların "icat edilmesinin" bilimsel bir anlamı olacaktır. Bu çalışmada kullanılan Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) modeli Ca^{2+} homeostazisi ile ilgili ve deneysel olarak varlığı gösterilmemiş hiçbir protein ya da mekanizma içermemektedir. Bu proteinlerin davranışları da mümkün olabilecek en basit şekilde tanımlanmış olup, deneysel gözlemlerle uyumludurlar ve bilinmeyen parametre sayısı olabilecek en aza indirilmiştir. Bu model esas olarak tersinir tepkimeler ya da Hill denklemi gibi geçerliliği genel kabul gören emprik denklemler üzerine kurulmuştur ve dolayısı ile temel fiziko-kimya yasalarına göre çalışmaktadır. Bu özellikleri nedeni ile bu biyolojik fenomeni açıklamaya çalışan matematiksel modeller içinde en az spekülasyona yer veren modellerden biridir. Bu tip bir "minimal" modelin gözlenen karmaşık hücre içi Ca^{2+} dinamiğini nereye kadar açıklayabildiğinin anlaşılması ve açıklayamadığı noktaların iyi ortaya konması aslında bu önemli hücresel fonsiyona katılan ancak henüz daha tanımlananmamış ne tip süreçlerin var olabileceğinin ön görülebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kültür Hücre Serilerinin Büyütülmesi

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Geliştirme Biriminden sağlanan Human Embriyonik Kidney 293 (HEK 293) ve LTK-8 kültür hücre serileri kullanıldı. Hücreler içinde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (GIBCO BRL Life Tech. NY, ABD) çözeltisi ve % 10 fetal buzağı serumu (FBS) bulunan 75 cm^2'lik kültür flasklarına ekildiler. Hücrelerin büyümesi ve çoğalması; 37 ºC sabit sıcaklık ve pH dengesinin korunması için gerekli olan % 5 CO_2 sağlayan etüvde gerçekleştirildi. Flasktaki hücreler yaklaşık % 90 konfluense geldiklerinde Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline-EDTA, PBS_EDTA) çözeltisi eklenerek yavaş mekanik etki ile hücreler süspansiyon hale getirildiler. Süspansiyon haldeki hücreler, tabanlarına 20 mm çapında cam lameller yerleştirilen altı kuyulu platelere ekildi. Ekim işleminin ardından hücreler plate tabanındaki lamelin yüzeyine yapışmaları için bir gece etüvde bekletildikten sonra ertesi gün deneye alındılar.

2.2. Hücrelerin Fluo-3 veya Fura-2 ile Yüklenmesi

Cam lamellerin üzerine yapışmış olan hücreler içeriği 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Hepes, 1 mM $6H_2OMgCl_2$ ve 1,5 mM Ca^{2+} olan solüsyonla (Banyo solüsyonu) bir kez yıkandılar. Daha sonra hücreler 4 µM Fura-2 veya 2 µM Fluo-3 asetoksimetil ester (Fura-2 AM / Fluo-3 AM) içeren aynı solüsyonunda ve oda sıcaklığında 50 dakika bekletilmek suretiyle yüklendiler. İnkübasyonun ardından geri plan (background) floresansını en aza indirebilmek için hücreler yine aynı solüsyon ile iki defa yıkanıp, ester formundaki boyanın tam metabolize olmasını sağlamak amacı ile 10 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildiler.

2.3. Hücre içi Ca^{2+} Derişiminin Ölçümü ve Analizi

Hücre içi Ca^{2+} derişiminin dinamik olarak ölçümü için Fluo-3 AM (Invitrogene, ABD) ile yüklenen HEK 293 hücreleri, konfokal mikroskop (Leica TCS SP5, Almanya) ile xyt-modunda ve 400 Hz tarama hızında, 63 X su-imersiyon objektifi kullanılarak görüntülendi. 500 nm den kısa dalgaboylu uyaran fotonlarının ölçümü etkilememesi için 500 nm "cutoff" lu dikroik filtre kullanıldı. Uyarılma dalgaboyu 508 nm, salınım dalgaboyu 530 nm olan ve Ca^{2+}'a bağlandığında floresan hale gelen Fluo-3 AM, 488 nm dalgaboyundaki Argon laser ile uyarıldı.

Konfokal mikroskop, mikroskobun odak düzleminde olmayan örneklerden gelen ışığını büyük oranda dışarlayarak görüntüyü odak dışı bulanıklıktan kurtaran optik kesit tekniğidir. Bu odak dışı bulanıklıktan büyük oranda *pinhole* sayesinde kurtulunur. *Pinhole* yalnızca seçtiğimiz kesitten salınan fotonların PMT'ye (Photon Multiplier Tube) geçmesini sağlar. Salınan fotonlar PMT'de ölçülebilir elektrik akımına dönüştürülür. PMT'nin oluşturduğu sinyaller bir bilgisayar programı aracılığı ile floresan şiddet bilgisine dönüştürülür. Deneyler sırasında 5,38 *airy* birim (600 μm) genişliğine ayarlanan pinholden geçen fotonlar 510-590 nm band genişliğine sahip bir monokromatörden geçerek PMT'ye yönlendirildiler. Bu şekilde geniş bir pinhole kullanılarak z-eksenindeki çözünürlüğün azalması pahasına toplanan ışığın miktarı arttırıldı. Hücrelerdeki floresan şiddet değişikliği deney süresince bilgisayar ekranından takip edildi.

Yüklenmesi tamamlanan hücrelerin deney platformuna yerleştirilmesi ardından üzerlerine nominal Ca^{2+}'suz banyo solüsyonu eklendi. Deneyler sırasında hücrelere çeşitli kimyasal maddelerin uygulamaları (ACh, CPA, La^{3+}), bu maddelerin banyo ortamına mikropipet kullanılarak doğrudan eklenmesi ile yapıldı. Bu yolla yapılan uygulama ile 2 solüsyonun birbirine karışma süreleri floresan boyalar kullanılarak ölçüldü ve 1-2 saniye olduğu gözlendi.

Veri analizinde LEICA konfokal mikroskop görüntüleme sisteminin kendi yazılımı kullanıldı. Tek bir hücredeki floresan şiddetindeki değişimi ölçmek için hücrenin sınırları belirlendi (Region of Interest, ROI). Deney boyunca sistem tarafından kaydedilen görüntülerde belirlenen ROI'ler içindeki piksellerin ortalama floresan şiddet değerleri ve bu değerlerin zamanla nasıl değiştiği gözlendi.
Geri plandan gelen floresan şiddetinin ölçüme katkısını minimize etmek için hücreler arasındaki boş bölgelerden de ROI'ler alındı. Hücrelerden alınan floresan şiddetlerinden bu değerler çıkartıldı. Daha sonra hücrelerdeki boya yüklenme farklılıklarını ortadan kaldırmak için zaman boyunca alınan floresan şiddetleri aynı ROI'den deney başında ölçülen değerlere bölündü (F/F_0).

2.4. Kalıcı Transfeksiyonlar

LTK 8 hücrelerine transfeksiyon lipofektamin kullanılarak yapıldı. Serum içermeyen iki ayrı DMEM solüsyonlarından birine 0.8 mg Higromisin direnç geni içeren mACh veya *Green Flourescent Protein – Pleckstrin Homology* (GFP-$PH_{PLC\delta1C}$) cDNA'sı, diğerine lipofektamin eklendi. Daha sonra bu solüsyonlar karıştırıldı ve 20 dakika inkübe edildi. Hazırlanan karışım 6'lık plakanın tek bir kuyusuna ekilen, % 70 konfluensteki hücrelere eklendi. 24 saat sonra hücreler PBS-EDTA ile kaldırıldı ve 96 kuyulu plakaya ekildi. mACh transfeksiyonu için hücrelerin üzerlerine 600 μg/ml Higromisin ilave edildi. Yaklaşık bir hafta süreyle bu ortamda tutulan hücrelerden sadece direnç geni taşıyan hücrelerin yaşamaya devam ettiği kuyular seçilerek deneyde kullanıldı.

2.5. IP_3 Derişim Değişimlerinin Ölçümü ve Analizi

GPCR'ın uyarılması ile sitoplazmada artan IP_3 derişimini ($[IP_3]$) gözlemlemek için kalıcı mACh reseptörü transfekte edilen LTK 8 hücreleri kullanıldı. Bu hücrelere GFP-$PH_{PLC\delta1C}$ cDNA'sı yukarda anlatılan şekilde transfekte edildi. $PLC\delta_1$ de bulunan ve IP_3'e bağlanan PH bölgesi IP_3'e PIP_2'ye olduğundan daha yüksek afinite

ile bağlanır. Bu nedenle reseptör uyarımı öncesinde, yani sitoplazmik [IP_3] düşükken GFP-$PH_{PLC\delta1C}$ proteini plazma membranında bulunan PIP_2'ye bağlıdır ve GFP floresansı hücre zarında gözlenir. Reseptör uyarısı ile artan IP_3 ile birlikte bu kimerik protein sitoplazmaya doğru yer değiştirir. Bu şekilde sitoplazmada artan floresan şiddeti ölçülerek sitoplazmik [IP_3] hakkında bilgi edinilebilir (Stauffer ve ark., 1998).

Transfeksiyonun ardından 2. günde deneye alınan hücrelerdeki IP_3 miktarındaki artış konfokal mikroskop ile saptandı. Hücreler z-ekseninde en az 3 kesit olacak şekilde 400 Hz'te 458 nm dalgaboyunda argon laser ile tarandı. Z-eksen çözünürlüğünün yüksek olması için *pinhole* genişliği 1 *airy* birime (150 μm) ayarlandı.

Sitoplazmada artan IP_3 miktarını tespit etmek için, kesitlerin sitoplazmik bölümlerine ROI'ler çizildi. Bu ROI'lerdeki ortalama şiddet artışı, her hücre için en geniş alana sahip ROI'den alındı. ROI'lerin analizi yapılırken, her zaman noktasındaki şiddetin uyarı öncesi şiddetinden farkı, maksimum şiddetin uyarı öncesi şiddetinden farkına bölündü ($(F-F_0)/(F_{max}-F_0)$). Bu şekilde, farklı hücrelerde, farklı zamanlarda ve farklı uyarılarla yapılan deneylerdeki IP_3 oluşumu, oran artış olarak karşılaştırılabilir hale geldi.

2.6. Ca^{2+} Derişiminin Kalibrasyonu

Tek dalgaboylu Ca^{2+} boyası olan Fluo 3'ün analizinde deney süresince hücreden gelen tüm sinyaller başlangıçtaki dinlenim değerlerine bölünerek hücreler arasında boya yüklemesi nedeniyle oluşan farklar düzeltilebilir. Ancak bu düzeltme deney boyunca boyanın derişiminde veya parlaklığında oluşacak değişimleri (kompartmentalizasyon, sızıntı, ağarma) düzeltmeye uygun değildir. Dolayısı ile hücre içi Ca^{2+} derişimini güvenilir bir şekilde kalibre ederek ölçmek amacı ile HEK 293 hücreleri *ratiometric* bir boya olan Fura-2 AM ile yüklendi ve hücrelere Br A23187 Ca^{2+} iyonoforu uygulandı. Deneyler PMT'ye bağlı bir

mikrospektroflorimetre kullanılarak yapıldı ve ölçümler aşağıdaki denkleme göre kalibre edildi.

$[Ca^{2+}] = K_d * ((R - R_{min}) / (R_{max} - R)) * (F_{s,\ 380} / F_{b,\ 380})$ (Grinkiewicz ve ark., 1985)

K_d: Ayrışma Sabiti. 224 nM olarak daha önceden yayınlanmış ölçümlerden alındı (Tepikin, 2001).

R_{min} : $F_{s,\ 340}/F_{s,\ 380}$. EGTA ve iyonofor varlığında 340 ve 380 nm'de serbest boyadan gelen floresan şiddetlerinin oranı. Hücrelere 2 mM EGTA ve ardından 10 μM Br-A23187 eklendi.

Ölçümün kararlı hale geldiği andaki oran hesaplamada kullanıldı.

R_{max} : $F_{b,\ 340}/F_{b,\ 380}$. 10 uM iyonofor ve 5 mM Ca^{2+} varlığında boyanın Ca^{2+}-bağlı formundan gelen floresan şiddetlerinin oranı. Ölçümün kararlı hale geldiği andaki oran hesaplamada kullanıldı.

$F_{380\ b}$: 5 mM Ca^{2+} ve Br-A23187 varlığında bağlı boyadan gelen 380 nm'deki floresan şiddeti.

$F_{380\ s}$: 2 mM EGTA ve Br-A23187 varlığında serbest boyadan gelen 380 nm'deki floresan şiddeti.

2.7. Matematik Modelleme

2.7.1. Othmer-Tang Modelinin Genel Özellikleri

Çalışmamızda elde ettiğimiz verileri açıklamak için IP_3 duyarlı Ca^{2+} kanalının (IP_3R) bulunabileceği durumları (state) ve kinetik parametreleri en az olan basit bir tüm hücre modeli olan Othmer-Tang'ı referans aldık (Tang ve ark, 1996). Bu modelde Ca^{2+} hücre içinde ER'de depolanır ve agonist uyarısı ile IP_3 derişiminin artması ve ligand kapılı bir iyon kanalı olan IP_3R'nün açılması sonucu ve onun aracılığı ile sitoplazmaya difüzyonla geçer. Bu model uyarınca IP_3R'nü regüle eden 3 bağlanma

bölgesi bulunur. Bunlardan biri IP_3 içindir. Diğer ikisi ise Ca^{2+} içindir. Ca^{2+}'un bağlanma bölgelerinden biri reseptörün pozitif regülatör bölgesidir; buraya bağlanan Ca^{2+} kanalı aktive eder, diğeri negatif regülatör bölgesidir ve buraya bağlanma kanalı inhibe eder. Ca^{2+} aktivatör bölgesine daha yüksek afinite ile bağlanırken, inhibitör bölgesine daha düşük afinite ile bağlanır. Bu modelde ayrıca hücre sitoplazmasından serbest Ca^{2+}'u uzaklaştıracak iki aktif taşıma sistemi de mevcuttur. Bunlar tek yönlü çalışırlar ve serbest sitoplazmik Ca^{2+} derişimi ile taşıma hızları değişir.

2.7.2. Hücre Modelinde Kullanılan IP_3 Reseptör Modeli

Othmer-Tang modeline (Tang ve ark., 1996) göre IP_3R'ne ligandların bağlanmasının bir sırası vardır (Şekil 2.1). Kanala önce IP_3 bağlanmalıdır. Daha sonra Ca^{2+} aktivatör bölgeye bağlanır ve kanal açılır. Ardından Ca^{2+} inhibitör bölgeye bağlanır ve kanal kapanır. Modele göre kararlı durumda açık olan kanalların oranı $[Ca^{2+}]$'nun bir fonksiyonudur ve çan eğrisi şeklindedir. Ca^{2+}'un uygun fizyolojik derişimlerinde önce artan açık kanal oranı, daha yüksek derişimlere çıkıldıkça azalır. Modeldeki IP_3R'nün Ca^{2+} ile aktivasyonu ve inhibisyonu için ve ayrıca IP_3 için gerekli tüm parametreler izole IP_3R'nde yapılan kararlı durum ölçümlerini açıklayacak şekilde seçilmiştir (Bezprozvanny ve ark., 1991).

$$R \underset{k2}{\overset{k1}{\rightleftharpoons}} RI \underset{k4}{\overset{k3}{\rightleftharpoons}} RIC^{+} \underset{k6}{\overset{k5}{\rightleftharpoons}} RIC^{+}C^{-}$$

Şekil 2.1. Othmer-Tang (Tang ve ark, 1996) modeline göre reseptöre, IP_3' ün ve Ca^{2+}'un sıralı bağlanma şeması.

R : IP_3 Reseptörü.

I : IP_3.

RI : IP_3 bağlı reseptör.

RIC^{+} : IP_3 ile birlikte aktivatör bölgesine Ca^{2+} bağlı reseptör.

RIC^+C^- : RIC^+ ile birlikte reseptörün inhibitör bölgesine de Ca^{2+} bağlanmış durumu.

k_1: Reseptöre IP_3 bağlanma hız sabiti

k_2: Reseptörden IP_3 ayrılma hız sabiti

k_3: Reseptöre aktivatör Ca^{2+} bağlanma hız sabiti

k_4: Reseptörden aktivatör Ca^{2+} ayrılma hız sabiti

k_5: Reseptöre inhibitör Ca^{2+} bağlanma hız sabiti

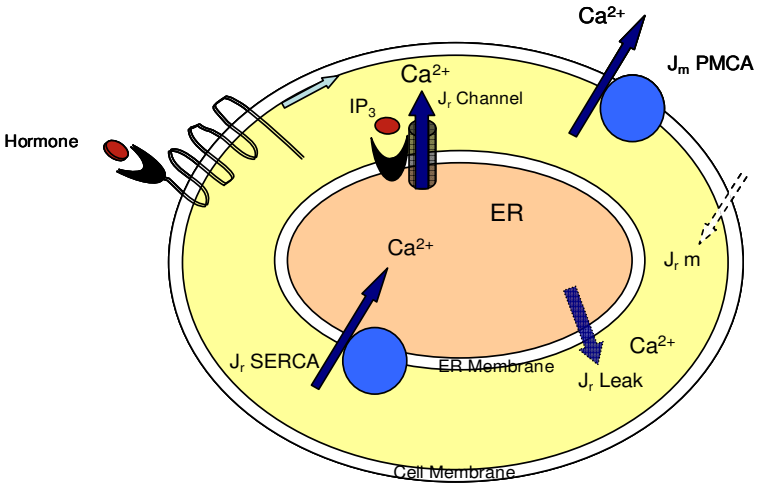
k_6: Reseptörden inhibitör Ca^{2+} ayrılma hız sabiti

IP_3 ve Ca^{2+}'un reseptöre bağlanma kinetiği ise aşağıdaki diferansiyel denklemlerle ifade edilebilir. Bu modele ait kinetik parametrelerin hesaplanabileceği herhangi deneysel bir gözlem literatürde bulunmamaktadır.

1. $d[R]/dt = (k_2*RI) - (k_1*IP_3*R);$
2. $d[RI]/dt = (k_1*IP_3*R) + (k_4*RIC^+) - (k_2*RI) - (k_3*Ca*RI);$
3. $d[RIC^+]/dt = (k_3*Ca*RI) + (k_6*RIC^+C^-) - (k_4*RIC^+) - (k_5*Ca*RIC^+);$
4. $d[RIC^+C^-]/dt=(k_5*Ca*RIC^+) - (k_6*RIC^+C^-);$

2.7.3 Modelde Kullanılan Akılar ve Akı Denklemleri

Othmer-Tang modelinde (Tang ve ark., 1996) hücre sitoplazma ve ER'den oluşan 2 kompartman olarak düşünülür: Plazma ve ER membranında bulunan kanal ve taşıyıcı proteinlerin aktivasyonları sitoplazmadaki Ca^{2+} dinamiğini yaratan akıları oluşturur (Şekil 2.2). IP_3R (J_{ip3}) ER ile sitoplazma arasında, SERCA (J_{serca}) sitoplazmadan ER'ye doğru, mekanizması tam olarak bilinmeyen sızıntı ise (J_{leak}) ER ile sitoplazma arasında bir Ca^{2+} akısı oluştururlar. PMCA ise (J_{pmca}) sitoplazmadan hücre dışına doğru bir Ca^{2+} akısı oluşturur. Bu modelde IP_3R ve sızıntı kanalları aracılığı ile oluşan akılar difüzyon ile oluştukları için iki yönlü, PMCA ve SERCA akıları ise pompalar aracılığı ile oluştukları için tek yönlü düşünülmüşlerdir.



Şekil 2.2. IP_3 aracılı Ca^{2+} dinamiğini yaratan akıları gösteren diagram. Hücre içi Ca^{2+} dinamiğinde rol oynayan başlıca akılar: IP_3R'nden Ca^{2+} salınımı (Jr channel) , Ca^{2+}'un tekrar sitoplazmaya alınması (Jr SERCA), PMCA tarafından sitoplazmadan uzaklaştırılması (Jm PMCA), ayrıca ER'den Ca^{2+}'un sızıntı şekilde çıkışı (Jr Leak).

$[Ca^{2+}]_i$'nun birim zamandaki değişimini, IP_3R ve sızıntı kanalları aracılığı ile ER'den sitoplazmaya çıkan akı arttırıcı yönde, SERCA ve PMCA'dan geçen akılar ise azaltıcı yönde etkiler. İki kompartman arasındaki hacimsel farklılığın derişim değişmeleri üzerinde yaratacağı etki ise ER/Sitoplazma hacim oranının (Vr) akı miktarı ile çarpılmasıyla düzeltilir.

$$d[Ca]_i/dt = (V_r * (J_{IP3} + J_{leak} - (J_{SERCA}+J_{PMCA})))$$

ER'deki $[Ca^{2+}]$'nun birim zamandaki değişimini SERCA'nın oluşturduğu akı arttırıcı yönde, IP_3 kanallarından ve sızıntı kanallarından sitoplazmaya doğru geçen akı ise azaltıcı yönde etkiler.

$$d[Ca]_{ER}/dt = (J_{SERCA} - (J_{IP3} + J_{leak}))$$

ER'den sitoplazmaya doğru olan IP_3R aracılı Ca^{2+} akısı (J_{IP3}), açık durumdaki kanalların derişimi ile iki kompartman arasındaki derişim farkının oranına bağlıdır. P_{IP3} ise kanalın maksimum geçirgenliğidir.

$$J_{IP3}= P_{IP3} * [RICp] * ([Ca]_{ER} - [Ca]_i)$$

Sızıntı akısı (J_{leak}), iki kompartman arasındaki derişim farkı ile sızıntı katsayısının çarpımı ile orantılıdır. P_{leak} deney süresi boyunca değişmeyen, sabit bir değer olarak düşünülmüştür.

$$J_{leak} = P_{leak} *([Ca]_{ER} - [Ca]_i)$$
$$P_{leak} = (J_{SERCA}+J_{PMCA}) / ([Ca]_{ER} - [Ca]_i)$$

PMCA'dan dolayı oluşan akı miktarı (J_{PMCA}) membrandaki PMCA nın miktarına (P_{PMCA}) ve pompanın Ca^{2+}'a afinitesi (K_{PMCA}) ile Hill sabitine (n) bağlıdır. Bu bağıntı her iki pompa için de bir Hill denklemi olarak düşünülmüştür.

$$J_{PMCA} = P_{PMCA} * ([Ca^n]_i)/([Ca^n]_i + K_{PMCA}^n)$$

SERCA'nın yarattığı akı miktarı (J_{SERCA}) ER membranındaki SERCA miktarına (P_{SERCA}), pompanın Ca^{2+} afinitesi (K_{SERCA}) ve Hill sabitine (n) bağlıdır.

$Jserca = Pserca * ([Ca^n]_i)/([Ca^n]_i+Kserca^n)$

Deneysel gözlemlerimiz nominal olarak Ca^{2+}'suz çözeltilerde yapıldığı için modelde de hücre dışından içeriye Ca^{2+} girişi olmadığı düşünülmüştür.

Modeldeki adi diferansiyal denklem (ODE) ifadeleri MATLAB (MathWorks Inc, USA) yazılımı kullanılarak çözülmüştür. PMCA, SERCA, sızıntı ve IP_3 kanalından geçen akıların yarattığı bu doğrusal olmayan dinamik mekanizmayı tam olarak anlayabilmek için deney verilerimizle uyumlu sonuçlar veren parametre kümeleri aradık. Bu arama için öncelikli olarak Matlab'da bir Monte Carlo (MC) yazılımı hazırlandı. Bu kod girilen başlangıç koşullarında ve belirtilen değer aralıklarında rastgele parametre değerleri seçerek konulan başarı kriterlerini sağlayan parametre kümelerini otomatik olarak ayıkladı.

Algoritmadaki başlangıç koşulları gerek deneylerimizden elde ettiğimiz bulgulardan gerekse literatürde verilen değerlerden baz alınarak seçildi. Buna göre başlangıç koşulları aşağıdaki şartlara göre oluşturuldu:

a) İki ayrı $[Ca]_i$; 0,03 μM ve 0,1 μM ve iki ayrı $[Ca]_{ER}$; 500 μM ve 1000 μM için dört kombinasyon tanımlandı:

1. $[Ca]_i = 0,1$: $[Ca]_{ER} = 500$ (μM)
2. $[Ca]_i = 0,1$: $[Ca]_{ER} = 1000$ (μM)
3. $[Ca]_i = 0,03$: $[Ca]_{ER} = 500$ (μM)
4. $[Ca]_i = 0,03$: $[Ca]_{ER} = 1000$ (μM)

Bu dört farklı kombinasyonun her biri için MC simülasyonları tekrarlandı. Arama kriterlerinin farklı kombinasyonlar için yapılmasının nedeni her iki kompartman için literatürde yapılmış birbirlerinden farklı ölçümlerin bulunmasıdır.

Dinlenim durumunda $[Ca^{2+}]_i$ için, 0,01 ile 0,1 μM arasında (Mak ve ark., 1998), 0,03 μM (Bezprozvanny ve Ehrlich, 1995), 0,1 μM (Golovina ve ark., 1997), 0,06 μM (Shmigol ve ark, 1996), 0,06-0,08 μM (Bootman ve ark., 1992) gibi ölçümler bildirilmektedir. Serbest $[Ca^{2+}]_{ER}$ için ise, 500-600 μM (Barrero ve ark., 1997), 100-800 μM (Burdakov ve ark., 2005), 500 μM (Yu ve Hinkle, 2000) gibi değerler ölçülmüştür. Bu farklı ölçümler arasında herhangi bir olası sonucun atlanmaması için dört ayrı kombinasyon içim parametre uzayı ayrı ayrı taranmıştır.

b) Dinlenim durumunda hücrenin kaybedebileceği maksimum ve minimum Ca^{2+} miktarı yüzde olarak belirtildi. Bu kritere uymayan sonuçlar otomatik olarak elimine edildi.

c) Reseptör uyarısı ile oluşacak IP_3 derişimi 0,5 μM olarak seçildi. Bu değer modelde kullanılan IP_3'ün IP_3R'ne bağlanma Kd değerine yakın bir değerdir.

d) IP_3 uyarısı ile birlikte $[Ca]_i$ artışının pik olarak sayılabilmesi için bir minimum değer ve bu pikin alabileceği maksimum değer belirlendi. Bu kritere uymayan sonuçlar otomatik olarak elimine edildi. Bu parametre değerleri ve başarı kriterleri yapılan gözlemlerle uyumlu olacak ancak sonuçları kısıtlamayacak şekilde geniş seçildiler.

Son olarak MC simülasyonları sırasında rasgele parametre değerlerinin seçileceği aralıkları da deneylerimizden gelen bulgular ve literatürdeki değerler göz önünde tutularak belirledik. Parametre uzayında herhangi bir bölgeyi atlamamak için bu kriterler başlangıçta geniş seçildi. Daha sonra elde edilen ve deneysel gözlemlerle en benzer sonuçların veren parametre değerlerine göre bu aralıklar yeniden belirlenerek yeni MC simülasyonları yapıldı.

Deney bulgularımızda düşük agonist dozlarında yanıtlardaki osilasyon sayısının yüksek dozlara göre daha fazla olduğunu gözledik. Bu nedenle, MC simülasyonunda submaksimal doz olarak 0,5 μM IP_3 değeri kullanıldı. Bu simülasyonda seçim

kriterlerini sağlayan parametre kümeleri bir de yüksek doz olarak kabul edilen 10 μM IP_3 değeri ile tekrar simüle edildi. MC simülasyonlarından başarı kriterlerini geçen bu iki gruptaki parametre kümelerinin her birinde kaç adet Ca^{2+} osilasyonu olduğunu sayan bir kod yazıldı. Ardından her iki grup için ayrı ayrı filtre programları kullanıldı: Submaksimal doz IP_3 için 3'ten fazla tepe ve maksimal IP_3 için ise 2 ile 3 arasında tepe yapan parametre kümeleri deneysel gözlemlerimize yakın bulunarak seçildi. Bu seçilen parametre kümelerinin SERCA inhibisyon deneylerine uyumlu sonuç veren inhibisyon yüzdelerinin bulunması için ayrı bir filtre programı daha yazıldı. Simülasyonlarda IP_3 uyarısı yokken ve hücre bazal kararlı durumda iken, deneylerde CPA verilerek gerçekleştirilen SERCA blokajını taklit etmek amacı ile belirlenen inhibisyon yüzdesinde SERCA aktivitesi düşürüldü. Bunun sonucunda simülasyonlarda deneysel gözlemlere benzer bir $[Ca^{2+}]_i$ artışı olup olmadığına bakılarak simülasyonlardaki bu artışın deneysel gözlemlere dayanılarak seçilen minimum ve maksimum değerler arasında kalıp kalmadığı incelendi. Ca^{2+} yanıtının maksimum değere çıkış süresi için de yine limit değerler belirlendi. Hangi SERCA inhibisyon yüzdesinde bu limitlerin içinde bir Ca^{2+} artışı elde edilebildiğini anlamak için ise SERCA aktivitesinin 0 ile % 100 inhibisyon aralığında % 5'lik adımlarla taraması yapıldı. Yukarıda sayılan limitler arasında kalmayı sağlayan inhibisyon yüzdeleri eğer bulunabildiyse o parametre kümesii için CPA inhibisyon yüzdesi olarak belirlendi.

Bu 3 ayrı filtreden de geçebilen parametre kümeleri kullanılarak elde edilen diferansiyel denklem çözümleri otomatik bir eliminasyon algoritması kullanılmadan gözle aşağıdaki kriterlere göre incelendi ve deneysel bulgulara uygunlukları değerlendirildi.

1. Düşük ve yüksek IP_3 dozunda yaptığı pik sayısı.
2. Kuantal salınım yapıp yapmadığı. (Ardışık olarak artan ve kalıcı iki IP_3 derişimi 0,1-0,5 ve 5-10 μM uygulamalarının her ikisine de geçici yanıtlar vermesi).
3. Tek başına PMCA blokajının $[Ca^{2+}]_i$ üzerine olan etkisi.

4. $[Ca^{2+}]_i$'na PMCA blokajı sürerken düşük veya yüksek doz IP_3 uygulamasının etkisi.
5. $[Ca^{2+}]_i$'na tek başına SERCA blokajının etkisi.
6. $[Ca^{2+}]_i$'na SERCA blokajı sürerken düşük veya yüksek doz IP_3 uygulamasının etkisi.
7. $[Ca^{2+}]_i$'na SERCA ve PMCA'nın birlikte blokajının etkisi.
8. $[Ca^{2+}]_i$'na SERCA ve PMCA blokajı sürerken yüksek doz IP_3 uygulamasının etkisi.
9. PMCA blokajının kuantal salınıma etkisi.
10. $[Ca^{2+}]_i$'na SERCA ve PMCA blokajı sürerken yüksek doz IP_3 uygulamasının bir müddet sonra kesilmesinin etkisi.
11. Simülasyonlarda elde edilen ve çeşitli müdahaleler sonucunda sitoplazmada oluştuğu hesaplanan Ca^{2+} derişim değerlerinin gerçek hücrelerde yapılan kalibre ölçüm değerlerine yakınlığı.

Yukarıda belirtilen etkilerin deney sonuçlarımızla uyumlululuğu öncelikle de ilk 5 madde için kontrol edildi. MC simülasyonları sırasında rastgele parametre değerlerinin seçildiği aralıkları Çizelge 2.1'de ve seçim kriterleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Parametre Değer Aralıkları (Arama Uzayı).

		MC için Kullanılan Aralık	Literatürdeki Yaklaşık Değerler
K_{SERCA}	**min**	**: 0,01 μM**	
	max	**: 0,2 μM**	
			0,26 μM (Means ve ark, 2006)
			(Hove-Madsen ve Bers, 1993)
			SERCA1: 0,44 μM,
			SERCA2a: 0,38 μM
			SERCA2b: 0,27 μM
			SERCA3: 1,1 μM
			(Lytton ve ark. 1992)
K_{PMCA}	**min**	**: 0,01 μM**	
	max	**: 1 μM**	
			0,2 μM (Camello ve ark. 1996)
n	**min**	**: 2**	
	max	**: 4**	
			SERCA: 2 (Hove-Madsen ve Bers, 1993)
			SERCA1: 2,1
			SERCA2a: 2,2
			SERCA2b: 1,7
			SERCA3: 1,8
			(Lytton ve ark. 1992)
			PMCA: 3 **(Camello ve ark. 1996)**
k_6	**min**	**: 0,001**	**-**
	max	**: 2**	
P_{IP3}	**min**	**: 0**	**-**
	max	**: 0,5**	
V_r	**min**	**: 0,05**	**-**
	max	**: 0,5**	
P_{SERCA}	**min**	**: 0**	**-**
	max	**: 200**	

Çizelge 2.2. Parametre Seçim Kriterleri.

$[Ca]_i$ = 0,03: $[Ca]_{ER}$ = 500 ve 1000 (μM) için Seçim Kriterleri	
Dinlenim durumunda Ca^{2+} kaybının minimum yüzdesi	**0,005**
Dinlenim durumunda Ca^{2+} kaybının maksimum yüzdesi	**0,20**
Agonist uyarısı sonrası $[Ca^{2+}]_i$ altına düşmesi gereken değer	**0,035 μM**
$[Ca^{2+}]_i$ artışının yanıt sayılması için minimum değer	**0,035 μM**
Yanıtın alabileceği maksimum değer	**5 μM**

$[Ca]_i$ = 0,1: $[Ca]_{ER}$ = 500 ve 1000 (μM) için Seçim Kriterleri	
Dinlenim durumunda Ca^{2+} kaybının minimum yüzdesi	**0,005**
Dinlenim durumunda Ca^{2+} kaybının maksimum yüzdesi	**0,20**
Agonist uyarısı sonrası $[Ca^{2+}]_i$ altına düşmesi gereken değer	**0,11 μM**
$[Ca^{2+}]_i$ artışının yanıt sayılması için minimum değer	**011 μM**
Yanıtın alabileceği maksimum değer	**5 μM**

Modelde k_6 dışında Othmer–Tang modelinde (Tang ve ark, 1996) kullanılan kararlı durum reseptör parametrelerini kullandık (Çizelge 2.3). k_6 için elimizde kinetik parametre olmadığından k_6/k_5 oranını sabit tutup k_6'yı değişken bıraktık.

Çizelge 2.3. Modelde kullanılan kararlı durum reseptör parametreleri.

k_1: $(12\ \mu M.s)^{-1}$ **k_2: $8\ s^{-1}$**

k_3: $(15\ \mu M.s)^{-1}$ **k_4: $1,65\ s^{-1}$**

k_5: $(1,8\ \mu M.s)^{-1}$

Modelde her bir parametre kümesi için farklı SERCA ve PMCA inhibisyon yüzdeleri yukarıda detayları açıklanan yollar kullanılarak bulundu. Bu inhibisyon yüzdeleri her bir kombinasyonda bulunan 3 ayrı küme için Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Parametre kümelerinde P_{SERCA} ve P_{PMCA} için inhibisyon yüzdeleri.

	I. Parametre Kümesi	**II. Parametre Kümesi**	**III. Parametre Kümesi**
1. $[Ca]_i$ = 0,1: $[Ca]_{ER}$ = 500 (μM) için SERCA ve PMCA inhibisyon yüzdeleri			
SERCA	**% 35**	**% 33**	**% 32**
PMCA	**% 50**	**% 47**	**% 30**
2. $[Ca]_i$ = 0,1: $[Ca]_{ER}$ = 1000 (μM) için SERCA ve PMCA inhibisyon yüzdeleri			
SERCA	**% 23**	**% 75**	**% 27**
PMCA	**% 33**	**% 30**	**% 60**
3. $[Ca]_i$ = 0,03: $[Ca]_{ER}$ = 500 (μM) için SERCA ve PMCA inhibisyon yüzdeleri			
SERCA	**% 37**	**% 90**	**% 60**
PMCA	**% 77**	**% 40**	**% 75**
4. $[Ca]_i$ = 0,03: $[Ca]_{ER}$] = 1000 (μM) için SERCA ve PMCA inhibisyon yüzdeleri			
SERCA	**% 40**	**% 60**	**% 50**
PMCA	**% 62**	**% 33**	**% 42**

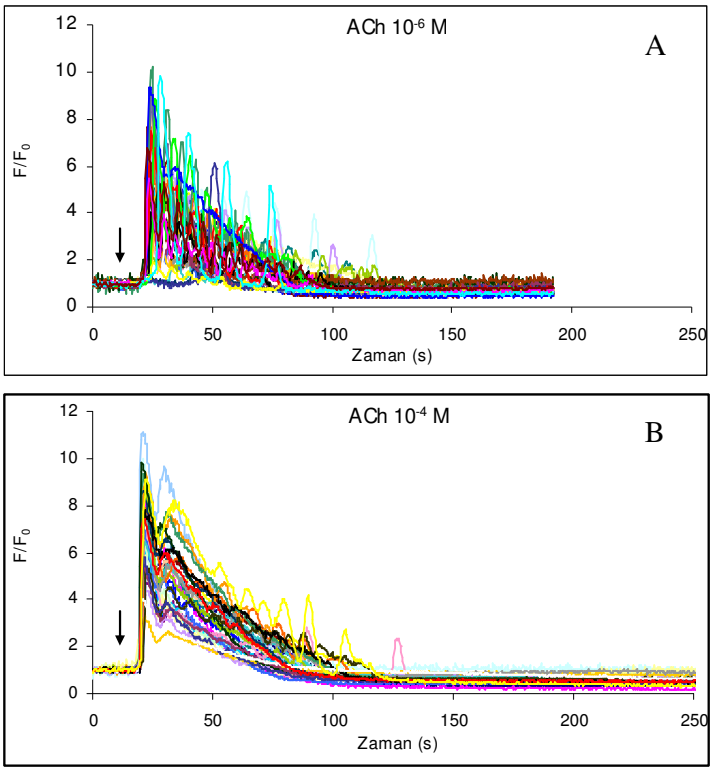
2.8. İstatiksel Yöntem

Tüm deney sonuçlarında ortalamalar SEM (Standart Error of Mean) ile verilmiştir. Ortalamalar arasındaki farkın istatiksel olarak anlamlılık seviyeleri ise student t-testi kullanılarak belirlenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Agonist Uyarısı ile Oluşan Farklı Uzay-Zaman Desenli Yanıtlar

HEK 293 hücrelerinde IP_3 aracılı $[Ca^{2+}]_i$ artışını görebilmek için bir GPCR olan mACh reseptörü kendi agonisti olan ACh ile uyarıldı. Konfokal mikroskopta aynı gün yapılan iki ayrı deneyde hücrelerin 10^{-4} M veya 10^{-6} M ACh'e verdikleri Ca^{2+} yanıtları Şekil 3.1'de görülmektedir. Grafiklerin tümünde deney boyunca yapılan çeşitli maddelerin uygulanma zamanları oklarla gösterilmiştir. Deneylerde aksi belirtilmediği takdirde uygulanan maddeler deney solüsyonundan uzaklaştırılmamıştır.

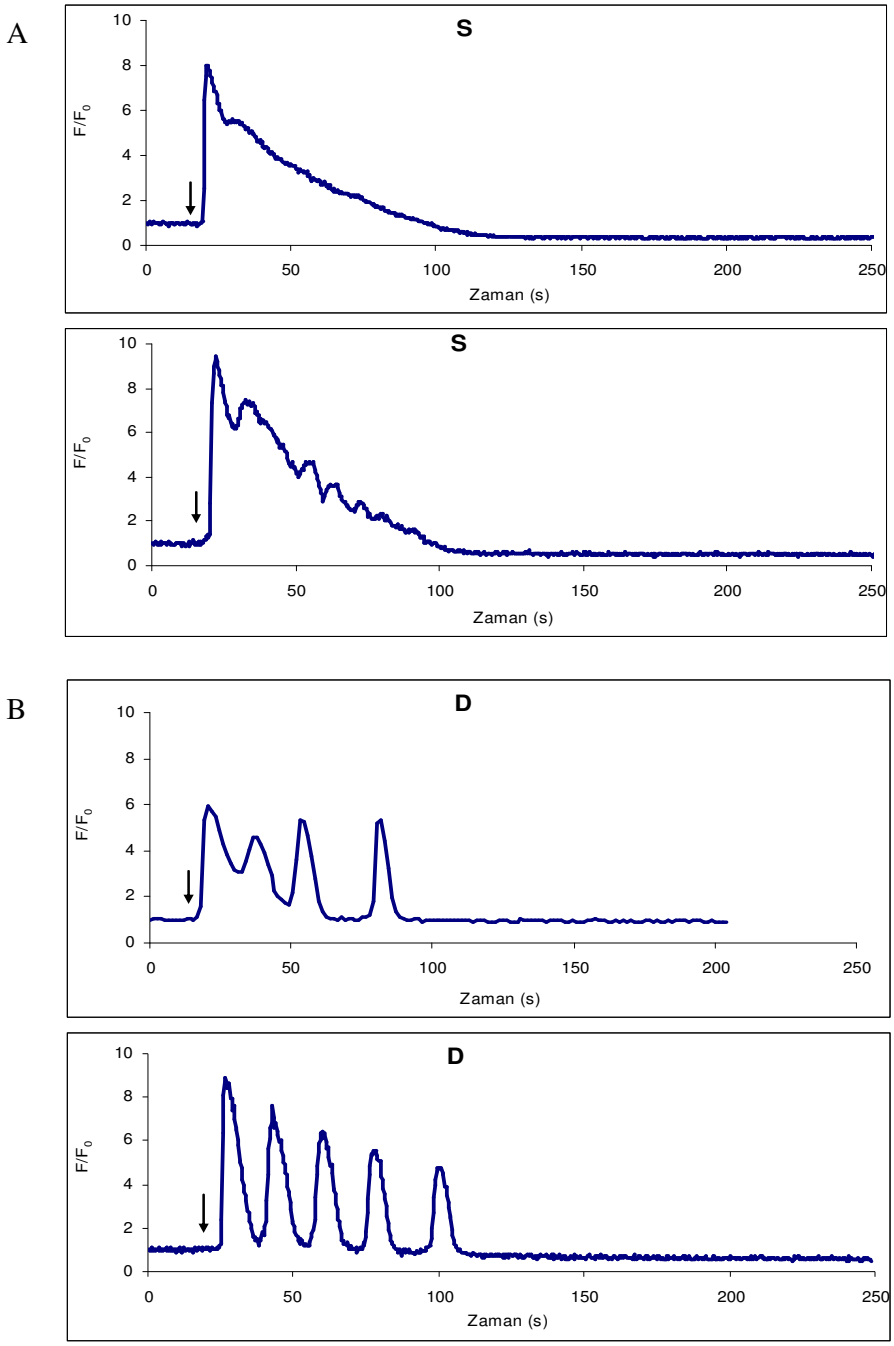


Şekil 3.1. HEK 293 hücrelerinin farklı derişimlerde uygulanan ACh'e verdikleri Ca^{2+} yanıtları. **A.** 10^{-6} M ACh uygulaması (n= 46 hücre). **B.** 10^{-4} M ACh uygulaması (n= 40 hücre).

Kullanılan banyo solüsyonunun nominal Ca^{2+}'suz olması nedeni ile, ölçülen $[Ca^{2+}]_i$ artışının büyük çoğunluğunun IP_3 aracılı olarak hücre içi depolardan salınım kaynaklı olduğu söylenebilir. Dolayısıyla, bu bölümde sunulan deneysel sonuçların açıklanması amacı ile kullanılan matematik modelde de hücre dışından Ca^{2+} girişini temsil eden bir akı kullanılmamıştır.

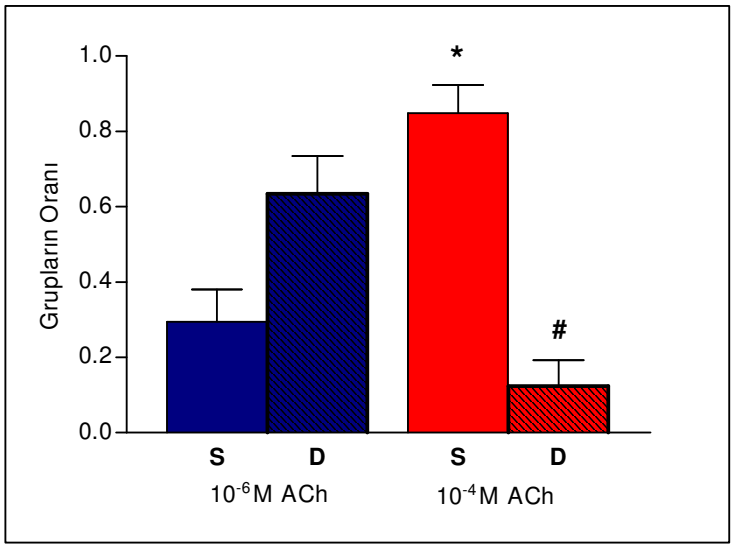
ACh uyarısı ile oluşan $[Ca^{2+}]_i$ artışları her hücre için ayrı ayrı incelendiğinde zamansal yanıt desenlerinin çoğunlukla her hücrede farklı olduğu gözlendi. Hücreye yapılan farklı derişimlerde agonist uygulaması, farklı tip Ca^{2+} pompalarının inhibe edilmesi gibi çeşitli müdahalelerin $[Ca^{2+}]_i$'nun dinamiğine etkisini belirli bir ölçüde nicel olarak tanımlayabilmek amacı ile deneylerde ölçülen her hücrenin gösterdiği osilasyon sayısı ve yanıtın süresi ölçüldü. Ayrıca $[Ca^{2+}]_i$ yanıtlarının zamansal biçimleri de gruplanarak bu gruplara düşen hücrelerin sayısı tespit edildi.

Yaptığımız matematik modellemede ne kadar yaklaşabildiğimizi anlamanın yarı nicel bir yolu olarak hücrelerin yanıtlarını şekillerine göre sınıflandırdık. Elde ettiğimiz simülasyonlarda bu sınıflara uygun yanıtlar gösteren hücrelerin oranlarını ölçmeye çalıştık. Sınıflandırmada iki temel kriter belirlendi. Buna göre; ACh uyarısı ile birlikte $[Ca^{2+}]_i$ yüksek durumdayken ya hiç osilasyon göstermeyen ya da sığ ve $[Ca^{2+}]_i$'nun monotonik olarak azalma eğilimini belirgin şekilde etkilemeyen osilasyonların görüldüğü yanıtlar S (Sığ) olarak isimlendirildi. Yanıt süresince derin ve $[Ca^{2+}]_i$'nu bir müddet yanıtın başlarındaki yüksek değerlere çeken ve $[Ca^{2+}]_i$'un monotonik azalma eğilimini belirgin olarak bozan osilasyonlara sahip yanıtlar ise D (Derin) olarak gruplandırıldı. Şekil 3.2'de bu sınıflandırmaya örnek olarak 10^{-4} M ACh uygulaması ile tek hücrelerde görülen bazı yanıtlar verilmiştir.



Şekil 3.2. 10^{-4} M ACh 20. s'de uygulanması ile birlikte oluşan farklı zamansal desenlere sahip ve tek hücrede ölçülmüş Ca^{2+} yanıtları. A. S (Sığ) olarak sınıflandırılan Ca^{2+} yanıtlarını temsil eden iki örnek. **B.** D (Derin) olarak sınıflandırılan Ca^{2+} yanıtlarına iki örnek.

Hücrelerin 10^{-4} M ACh'e verdikleri yanıtlarla, 10^{-6} M ACh'e verdikleri yanıtlar tiplerine göre karşılaştırıldığında, yüksek uyarı şiddeti ile sığ osilasyon yapan grup çoğunluktayken, düşük dozda yanıtların çoğunun derin osilasyon yaptığı görüldü (Şekil 3.3).

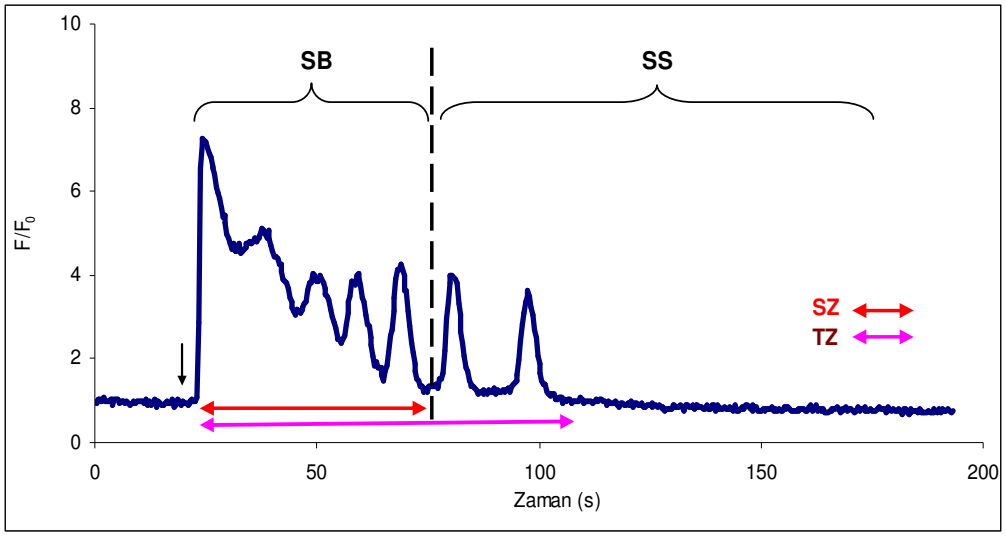


Şekil 3.3. Hücrelerin 10^{-6} M ACh ve 10^{-4} M ACh'e verdikleri yanıtların tiplerine göre karşılaştırılması. Lacivert çubuklar; 10^{-6} M ACh, **kırmızı çubuklar;** 10^{-4} M ACh. *p<0,05 vs 10^{-6} M ACh S tipi yanıtlar, **#**p<0,05 vs 10^{-4} M ACh D tipindeki yanıtlar.

Bu karmaşık yanıt desenlerinde görülen osilasyonlar da sayıldı. Bunların ne kadarının $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç seviyesine dönmeden oluştuğuna ve ne kadarının döndükten sonra oluştuğuna bakmak için tüm yanıtı 2 ayrı dönem gibi inceledik. Böylece yanıt dinlenim durumundaki değerine geldikten sonra $[Ca^{2+}]_i$'ndaki ani artışların tüm osilasyonlara oranını, ne sıklıkla görüldüklerini ve ne kadar devam ettiğini inceleyebildik.

$[Ca^{2+}]_i$'nin uyarı öncesi değerine dönmesine kadar geçen döneme Salınım Boyunca (SB), bu dönemin ardından osilasyonların görüldüğü döneme ise Salınım Sonrası (SS) denildi.

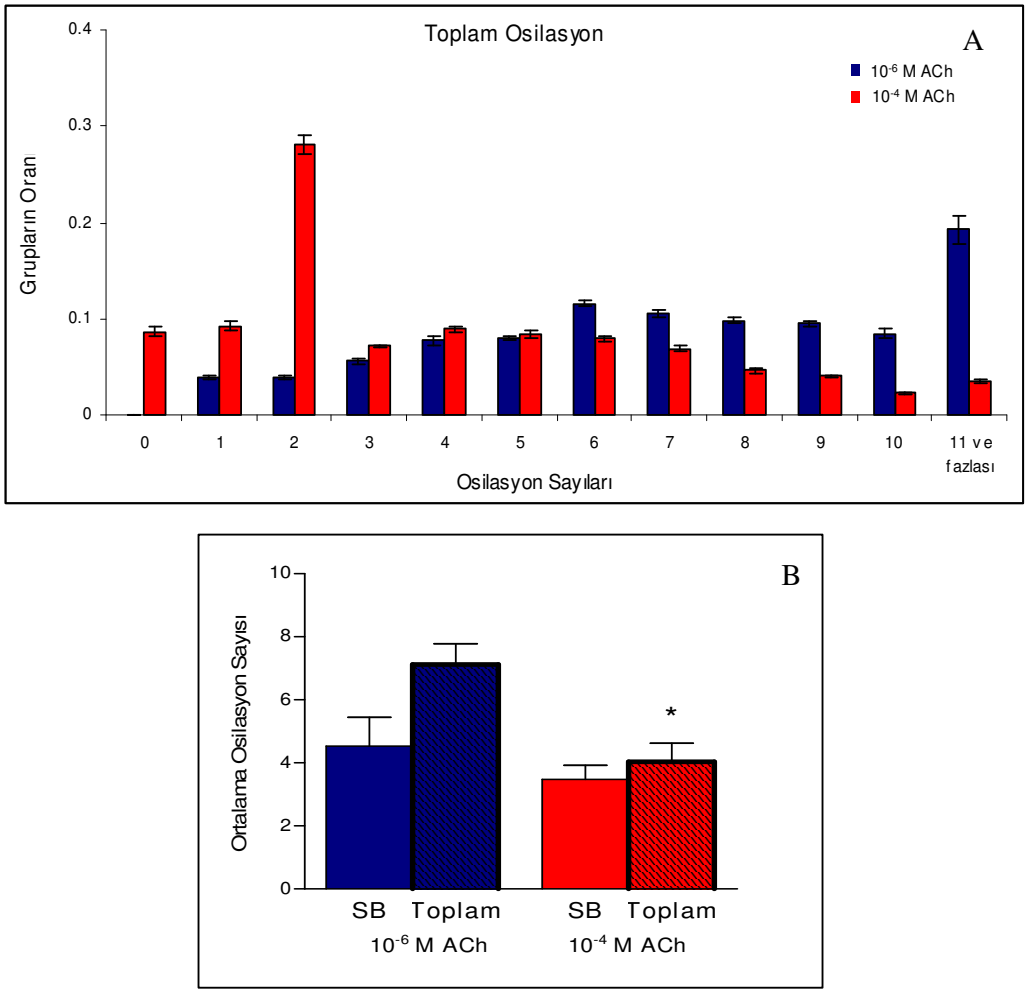
Salınım Boyunca geçen zamana Salınım Zamanı (SZ), agonist uyarısı ile birlikte başlayan yanıtın tamamen sönümlenmesine kadar geçen zamana ise Toplam Zaman (TZ) denildi. Bu isimlendirme örnek bir yanıt trasesi üzerinde Şekil 3.4'de açıklanmıştır.



Şekil 3.4. Ca^{2+} salınımın iki dönem olarak değerlendirilmesi. Salınım Boyunca (SB) ve Salınım Sonrası (SS). SB: $[Ca^{2+}]_i$'nun uyarı öncesi değerine dönene kadar olan dönem. SS: SB dönemi sonrası dönem. SZ: SB dönemi boyunca geçen zaman. TZ: SB ve SS dönemleri için toplam zaman. Örnekteki tek bir hücrenin yanıtı bu sınıflandırmaya göre değerlendirildiğinde SB için 5 osilasyon, SS için 2 osilasyon sayılmıştır. SZ 50 s iken, TZ 88 s'dir.

10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh uyarısı sonrasında SB ve SS dönemlerinde yaptıkları osilasyon sayılarına göre ayrılan yanıtlar yüzde olarak karşılaştırıldı (Şekil 3.5.A). 0 osilasyon; SB dönemde uzun süre yüksek kalan ancak hiç osilasyon yapmamış bir yanıtı veya kısa süreli tek başına bir osilasyon gibi görünen ilk yanıtı göstermektedir.

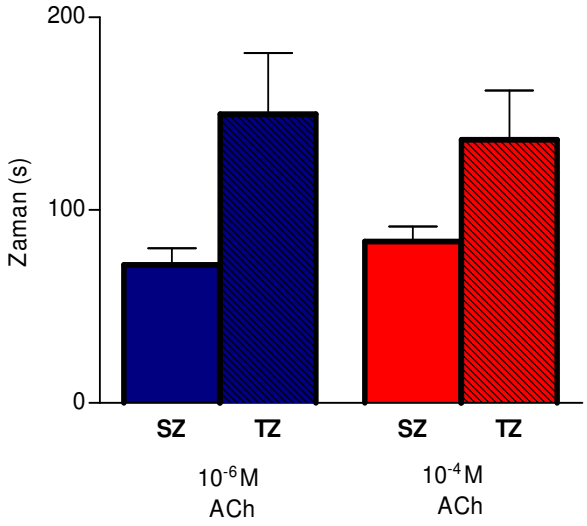
Düşük doz ACh uygulaması sonrasında hücreler yaptıkları toplam osilasyon sayıları açısından incelendiğinde dağılımın geniş olmasıyla birlikte çoklu sayıda osilasyon eğiliminin fazla ve yığılmanın 11 ve üzeri osilasyon gurubuna olduğu görülmüştür. Yüksek doz ACh uygulanmış hücrelerin yanıtlarında ise dağılımın daha düşük osilasyon sayıları çevresinde olduğu 2 osilasyonlu grupta bir miktar yığılma olduğunu görüyoruz (%30).



Şekil 3.5. Yanıtların 10^{-6} M ACh ve 10^{-4} M ACh uyarısı sonrasında yaptıkları osilasyon sayılarına göre karşılaştırılması. A. Hücrelerin gösterdikleri toplam osilasyon sayılarının dağılımının iki farklı ACh dozu için karşılaştırılması. **B.** SB ve tüm yanıt boyunca ortalama osilasyonların iki farklı doz için karşılaştırılması. * $p<0,05$ 10^{-4} M vs 10^{-6} M ACh.

Yanıtlardaki ortalama osilasyon sayıları iki doz için karşılaştırıldığında, SB dönemde büyük bir farklılık görülmezken, 10^{-6} M ACh uygulamasında tüm yanıtta osilasyonların (ortalama yaklaşık 7 osilasyon) 10^{-4} M ACh'e göre (yaklaşık 4 osilasyon) belirgin olarak fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.5.B). Tüm yanıtta ortaya çıkan bu farkın SS dönemden kaynaklandığı açıktır.

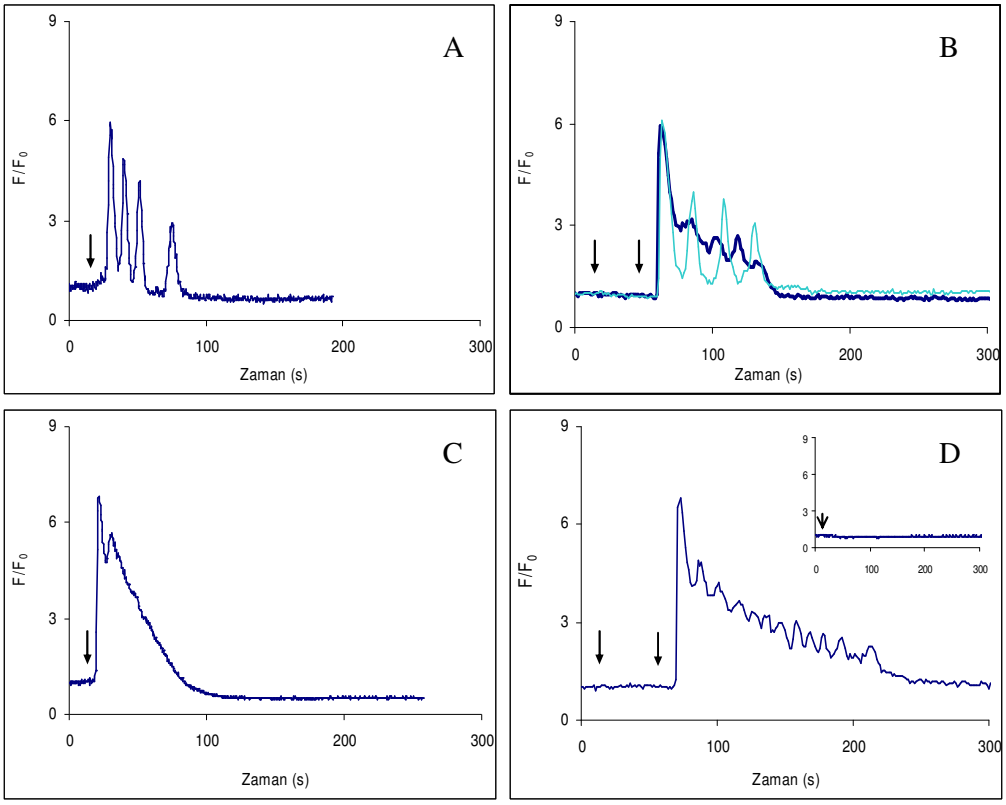
10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh uygulamalarına hücrelerin verdikleri yanıtlar süreleri bakımından incelendiğinde SZ ve TZ'nın her iki doz için farklı olmadığı görüldü (Şekil 3.6). ACh 10^{-4} M için SZ:80 s (± 7,8 s), TZ:140 s (± 25,6 s), ACh 10^{-6} M için SZ:70 s (± 8,7 s), TZ:150 s'dir (± 31,8 s).



Şekil 3.6. Yanıt sürelerinin 10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh için karşılaştırılması. Kırmızı çubuklar; 10^{-4} M ACh, **lacivert çubuklar;** 10^{-6} M.ACh.

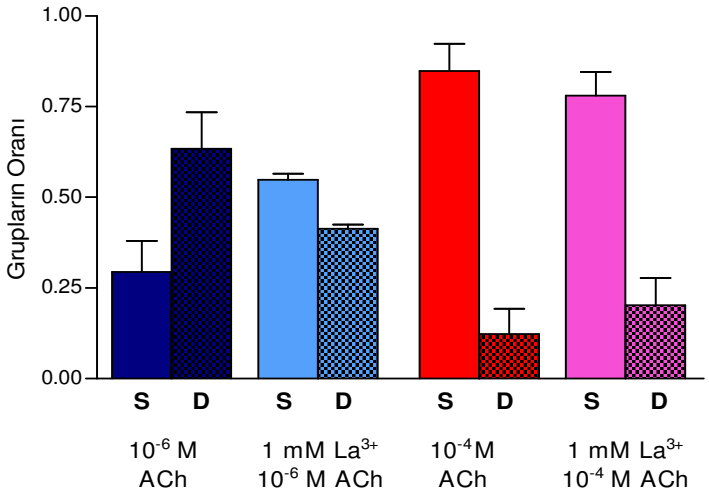
3.2. PMCA İnhibisyonunun $[Ca^{2+}]_i$ Etkisi

PMCA'nın bloke olduğu durumda $[Ca^{2+}]_i$'nun değişim kinetiğini incelemek amacı ile bir PMCA ve katyon kanal blokörü olan Lantan (La^{3+}) kullanıldı. La^{3+}'ın (1 mM) tek başına uygulanması $[Ca^{2+}]_i$'da belirgin bir etki oluşturmadı (Şekil 3.7.D küçük şekil). 10^{-4} M veya 10^{-6} M ACh uyarımından önce verilen La^{3+}'ın (1 mM) yanıtlara etkisini (Şekil 3.7.B ve D), La^{3+} uygulaması yapılmadan yalnızca 10^{-4} M veya 10^{-6} M ACh uygulanmış hücrelerin yanıtları (Şekil 3.7.A ve C) ile karşılaştırarak inceledik. Bu incelemede de yine yanıt tipleri, osilasyon sayıları ve yanıt süreleri karşılaştırıldı.



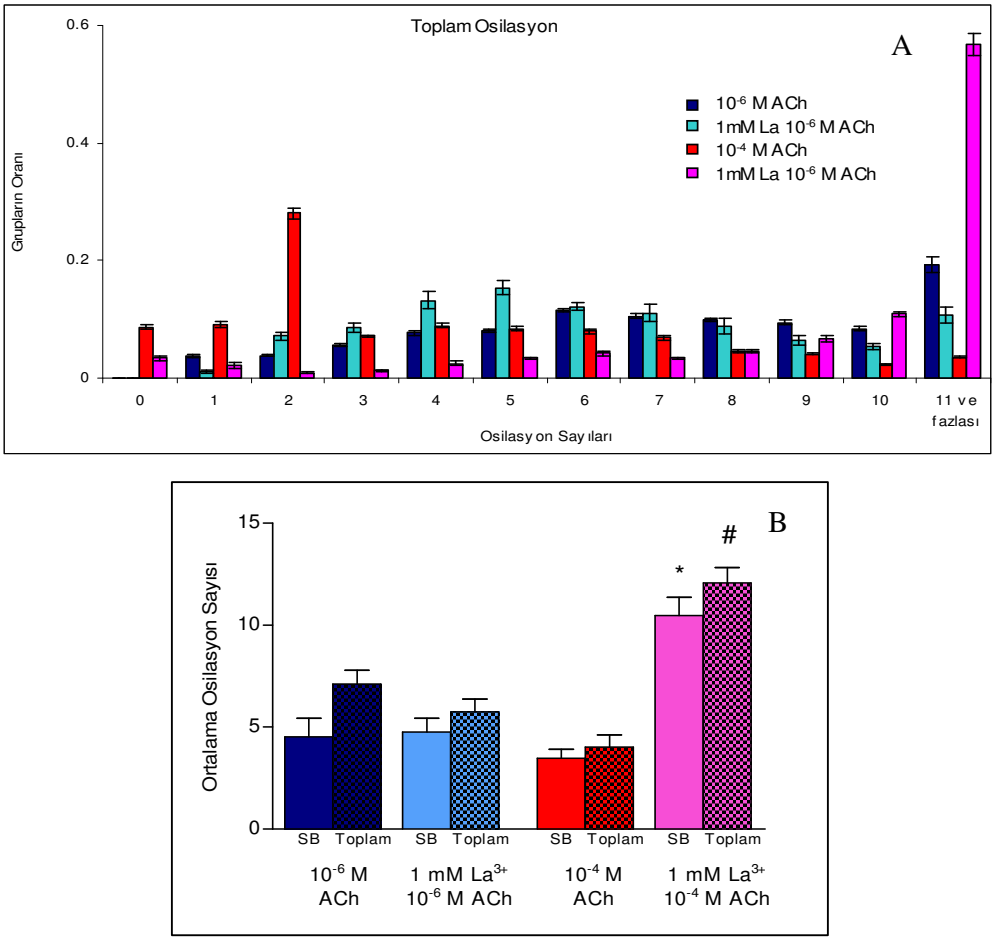
Şekil. 3.7. Yalnızca ACh (10^{-6} ve 10^{-4} M) uygulaması ve ACh uygulaması öncesi La^{3+} (1 mM) uygulaması ile elde edilen tipik yanıtların karşılaştırılması. A ve C, sırasıyla 10^{-6} M ve 10^{-4} M ACh uygulaması ile, **B ve D**, 1 mm La^{3+} ve sırasıyla 10^{-6} M ve 10^{-4} M ACh uygulaması ile görülen tipik yanıt örnekleri (B'de Derin ve Sığ osilasyon gösteren iki ayrı hücreninin yanıtı aynı şekil üzerinde lacivert ve mavi olarak gösterilmiştir.). **D küçük şekil:** 1 mM La^{3+} uygulamasının tek başına etkisi.

Hücrelerin 1 mM La^{3+} varlığında 10^{-4} M ACh'e verdikleri yanıtlarla, blokör uygulanmamış yanıtlar tiplere (S veya D tipi yanıt) göre dağılımı karşılaştırıldığında, La^{3+} varlığının 10^{-4} M ve 10^{-6} M ACh yanıtlarının dağılımını belirgin olarak etkilemediği görüldü (Şekil 3.8). Ancak 10^{-6} M ACh yanıtlarında bir miktar D'den S'ye kayma eğilimi görülmektedir (aynı zamanda bakınız Şekil 3.7).



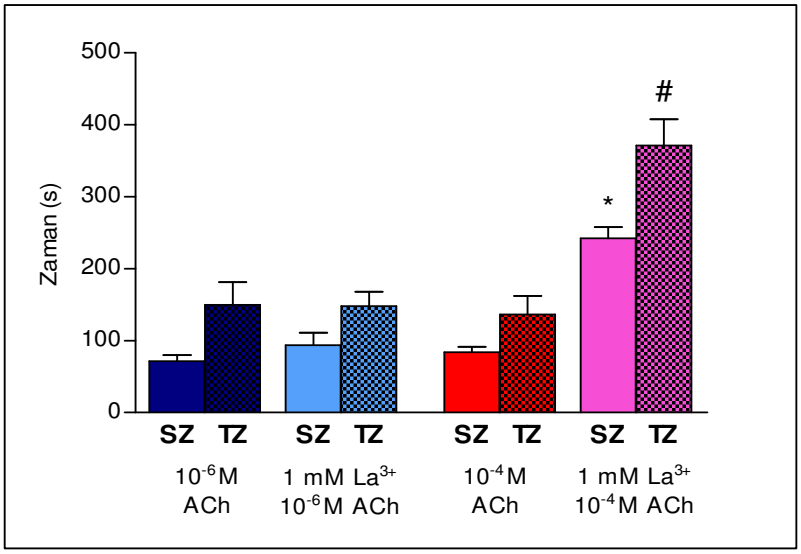
Şekil 3.8. La^{3+}'ın 10^{-6} M ve 10^{-4} M ACh ile oluşan yanıt tiplerinin dağılımına etkisi. Lacivert çubuklar; 10^{-6} M ACh, **mavi çubuklar;** 1 mM La^{3+} ve 10^{-6} M ACh. **Kırmızı çubuklar;** 10^{-4} M ACh, **pembe çubuklar;** 1 mM La^{3+} ve 10^{-4} M ACh.

1 mM La^{3+} varlığında 10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh uyarısı ile birlikte SB ve SS dönemlerinde yaptıkları osilasyon sayılarına göre ayrılan yanıtlar yüzde olarak karşılaştırıldı (Şekil 3.9.A). La^{3+} varlığı düşük doz ACh yanıtlarında bariz bir etki yaratmazken, yüksek doz ACh yanıtlarındaki osilasyon sayılarını belirgin olarak arttırmıştır (yaklaşık 2,5 kat). Yanıtlardaki ortalama osilasyon sayıları incelendiğinde La^{3+} varlığında 10^{-4} M ACh yanıtlarındaki osilasyon artışının SB dönemde olduğunu görmekteyiz (Şekil 3.9.B).



Şekil 3.9. Hücrelerin 1 mM La^{3+} varlığında 10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh uyarısı sonrasında yaptıkları osilasyonların sayıları, blokör uygulanmadığı durumdaki sayılarına göre karşılaştırılması. **A.** Hücrelerin yaptıkları osilasyonların yüzdelerinin 1 mM La^{3+} varlığında ve yokluğunda iki farklı doz için karşılaştırılması. **B.** SB dönemdeki ve toplamdaki osilasyon sayılarının iki farklı ACh dozu için La^{3+} varlığındaki ve yokluğunda karşılaştırılması. *$p<0,05$ vs 10^{-4} M ACh SB dönem için ortalama osilasyon sayısı, #$p<0,05$ vs 10^{-4} M ACh SB dönemi ve toplam için ortalama osilasyon sayısı.

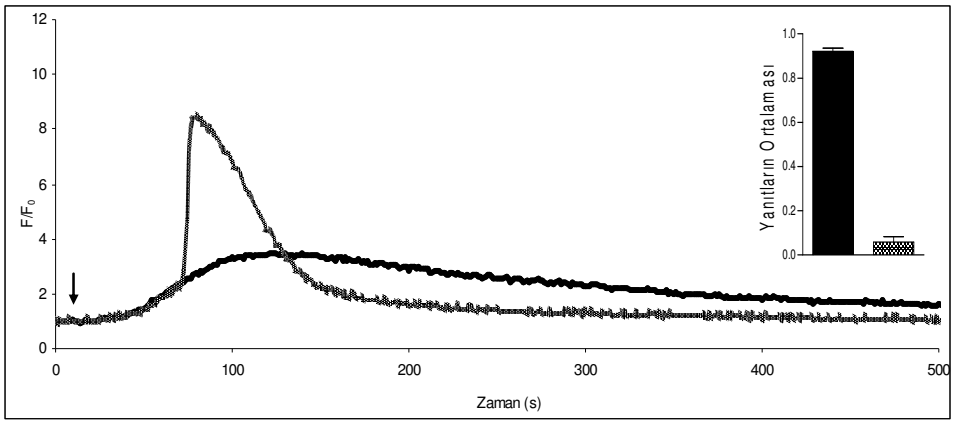
1 mM La^{3+} varlığında 10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh uygulamalarındaki yanıtların süreleri blokör uygulanmadığı durumdaki yanıtları ile karşılaştırıldı. La^{3+} uygulaması 10^{-4} M ACh yanıtlarının hem SZ hem de TZ için belirgin olarak uzamasına neden olmuştur. Ancak 10^{-6} M ACh yanıtları için bir fark yaratmamıştır (Şekil 3.10). 10^{-6} M ACh için SZ:70 s, TZ:150 s iken La^{3+} varlığında bu süreler SZ:80 s, TZ:145 s olmuştur.



Şekil 3.10. Hücrelere 1 mM La^{3+} uygulamasının 10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh ile oluşan Ca^{2+} yanıtlarına süre bakımından etkisi. Lacivert çubuklar; 10^{-6} M ACh, **mavi çubuklar;** 1 mM La^{3+} ve 10^{-6} M ACh**. Kırmızı çubuklar;** 10^{-4} M ACh, **pembe çubuklar;** 1 mM La^{3+} ve 10^{-4} M ACh. *p<0,05 vs 10^{-4} M ACh SZ, **#**p<0,05 vs 10^{-4} M ACh TZ.

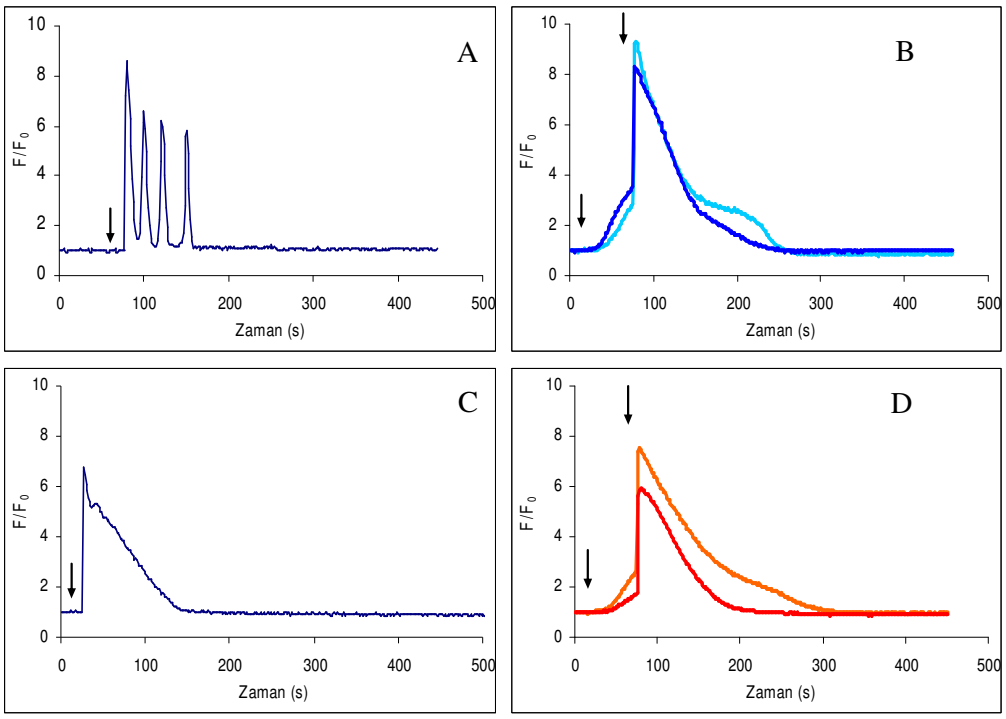
3.3. SERCA İnhibisyonunun Etkisi

Öncelikle SERCA'nın tek başına inhibisyonunun $[Ca^{2+}]_i$'nu ne şekilde etkilediğine bakıldı. SERCA inhibisyonu 20 μM CPA kullanılarak gerçekleştirildi. 20. s'de blokörün deney solüsyonuna eklenmesi ile genelde $[Ca^{2+}]_i$ yavaşça artarak bir süre yüksek kaldıktan sonra oldukça yavaş bir şekilde temel seviyeye dönmüştür (Şekil 3.11 siyah eğri). Ancak sayıca az olmakla birlikte (Şekil 3.11 küçük grafik) SERCA blokajı bazı hücrelerde $[Ca^{2+}]_i$' nun hızla artmasına ve yine hızla azalmasına neden olmuştur (Şekil 3.11 noktalı eğri).



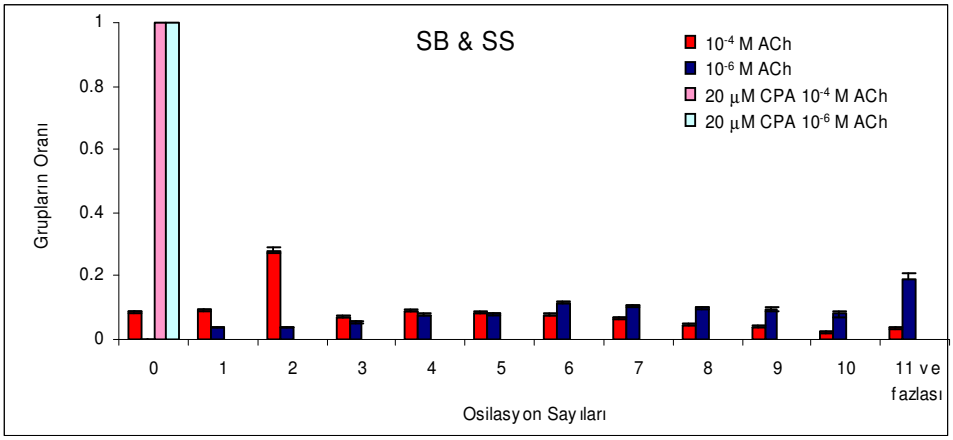
Şekil. 3.11. SERCA blokajı. SERCA inhibisyonunun tek başına $[Ca^{2+}]_i$ nasıl değiştirdiği 20 μM CPA uygulanarak incelendi. **Siyah eğri**, sitoplazmada yavaş artan ve yine yavaş azalan yanıtları, **noktalı eğri** sitoplazmada bir anda artan Ca^{2+} yanıtlarını temsil etmektedir. **Küçük grafik:** Her iki yanıt tipinin görülme oranları. **Siyah çubuk**, yavaş, **noktalı çubuk**, hızlı yanıtları temsil etmektedir.

SERCA blokajının 10^{-4} M ve 10^{-6} M ACh yanıtlarına etkisini görebilmek için agonist uygulamasından önce ortama 20 µM CPA eklendi. Blokör varlığında yanıtların bir kısmında azalma fazlarının çeşitli dönemlerinde platolar görülürken, diğer bir kısımda yanıtlar belirgin platolar yapmadan başlangıç değerine dönmüştür (Şekil 3.12.B ve D).



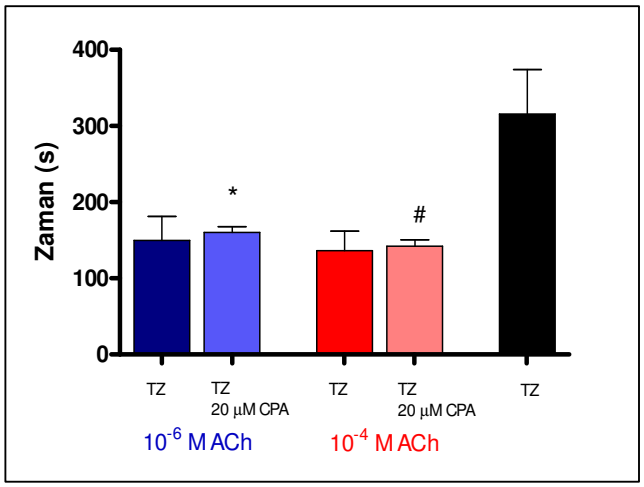
Şekil 3.12. Tek başına ACh yanıtları ile CPA varlığında ACh yanıtları. A. 10^{-4} M ACh uygulaması. **B.** Deney solüsyonuna 20. s'de 20 µM CPA eklenmesi ardından 10^{-4} M ACh uygulaması. **C.** 10^{-6} M ACh uygulaması. **D.** Deney solüsyonuna 20. s'de 20 µM CPA eklenmesi ardından 10^{-4} M ACh uygulaması ile elde edilen eğriler.

SERCA blokajı her iki doz ACh için de yanıtlardaki osilasyonların tümüyle ortadan kalkmasına neden oldu (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. CPA'in Ca^{2+} osilasyonlarına etkisi. Hücrelerin CPA varlığında 10^{-4} M ACh ve 10^{-6} M ACh uyarısı sonrasında yaptıkları toplam osilasyon sayılarının dağılımının blokör uygulanmadığı durumdaki sayılarla karşılaştırılması. **Kırmızı ve mavi çubuklar** CPA uygulanmamış, **pembe ve buz mavisi çubuk** ise 20 µM CPA uygulanmış hücrelerde sırasıyla 10^{-4} ve 10^{-6} M ACh uyarısı ile oluşan yanıtlardaki osilasyon sayılarının dağılımını göstermektedir.

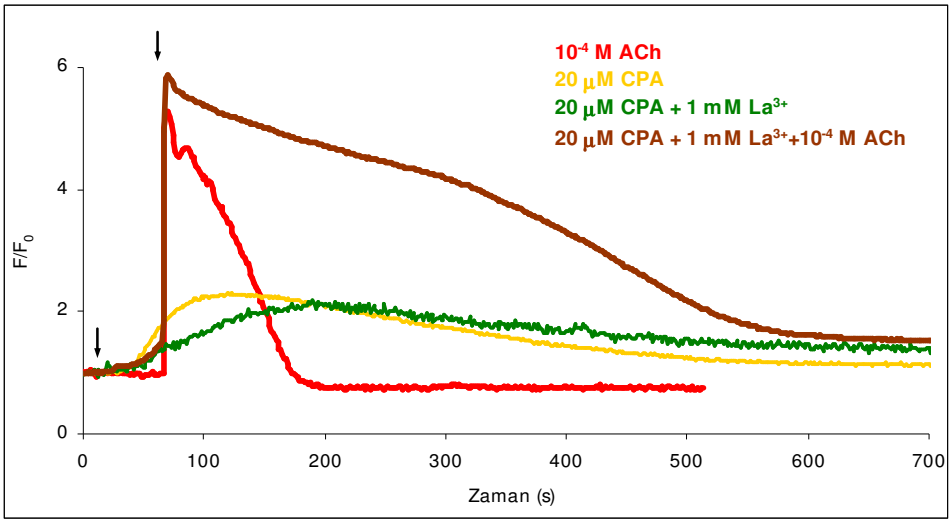
CPA varlığında agonist uyarılarının oluşturduğu Ca^{2+} yanıtları süreleri bakımından da incelendi (Şekil 3.14). Yanıtlar TZ için incelendiğinde SERCA blokajının yanıt sürelerini etkilemediği görüldü. Ancak CPA'in tek başına uygulanması ile artan $[Ca^{2+}]_i$'nun, CPA'in agonistle birlikte uygulanmasına göre daha uzun süre sitoplazmada kaldığı görüldü.



Şekil 3.14. CPA'in tek başına ve agonist uyarılarıyla oluşan Ca^{2+} yanıt sürelerine etkisi. Kırmızı Çubuklar: 10^{-4} M ACh uygulaması. **Mavi Çubuklar:** 10^{-6} M ACh uygulanması ile elede edilen yanıt sürelerinin ortalaması. **Açık mavi ve pembe renkteki çubuklar:** Agonist öncesinde 20 µM CPA'in uygulandığı durumlardaki ortalamaları göstermektedir. **Siyah Çubuk:** Tek başına 20 µM CPA uygulaması ile elde edilen yanıt sürelerinin ortalamasını göstermektedir. *$p<0,05$ vs tek başına 20 µM CPA yanıt süresi, **#**$p<0,05$ vs tek başına 20 µM CPA yanıt süresi.

3.4. SERCA ve PMCA'nın Birlikte İnhibisyonunun ACh Yanıtlarına Etkisi

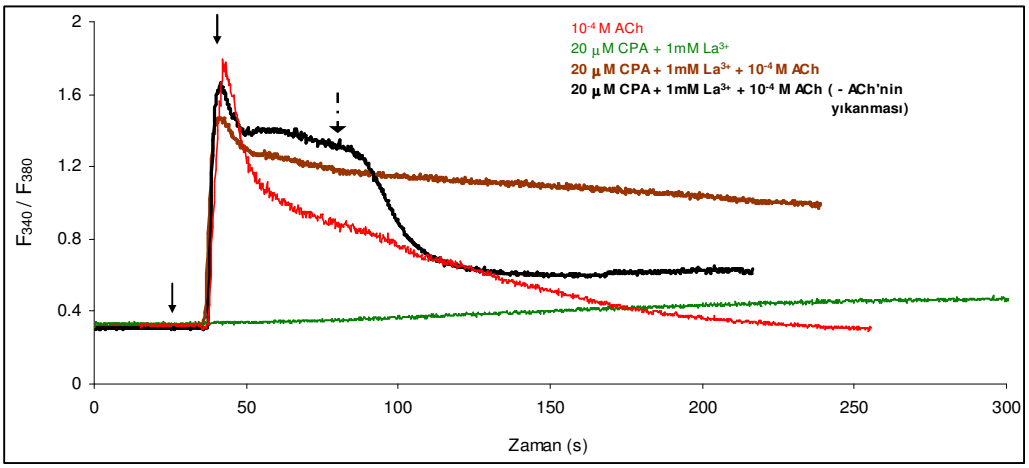
SERCA ve PMCA'nın birlikte inhibe edilmesinin ACh uygulaması olmadan $[Ca^{2+}]_i$'nun dinlenim seviyesini nasıl değiştirdiğini görebilmek için 1 mM La^{3+} ve 20 µM CPA hücrelere aynı anda uygulandı. Bunun sonucunda genel olarak hücrelerde $[Ca^{2+}]_i$ nispeten hızlı bir şekilde arttıktan bir süre sonra oldukça yavaş bir şekilde azalma eğilimine geçtiği görüldü (Şekil 3.15 yeşil eğri). Başka bir grup hücreye 20. s'de 1 mM La^{3+} ve 20 µM CPA uygulanması ardından 65. s'de 10^{-4} M ACh verildi. Her iki ATPaz inhibe edilmişken ACh, $[Ca^{2+}]_i$'nun hızla artışına neden oldu. Ardından $[Ca^{2+}]_i$ oldukça yavaş bir şekilde azalmaya başladı.



Şekil 3.15. Her iki ATPaz blokajının $[Ca^{2+}]_i$'nun değişimine etkisi. Eğriler farklı hücrelerden ölçülmüştür. Farklı kimyasalların uygulandığı kayıtlar değişik renk kodları ile aynı grafikte gösterilmiştir. **Sarı eğri;** yalnızca 20. s'deki SERCA blokajını, **yeşil eğri**; 20. s'de SERCA ve PMCA'nın birlikte blokajını göstermektedir. **Kırmızı eğri:** 65. s'de sadece 10^{-4} M ACh uygulamasını, **kahverengi eğri**; 20. s'de SERCA ve PMCA inhibe edildikten sonra 65. s'de 10^{-4} M ACh uygulamasını göstermektedir.

3.5 Pompaların İnhibisyon Miktarı

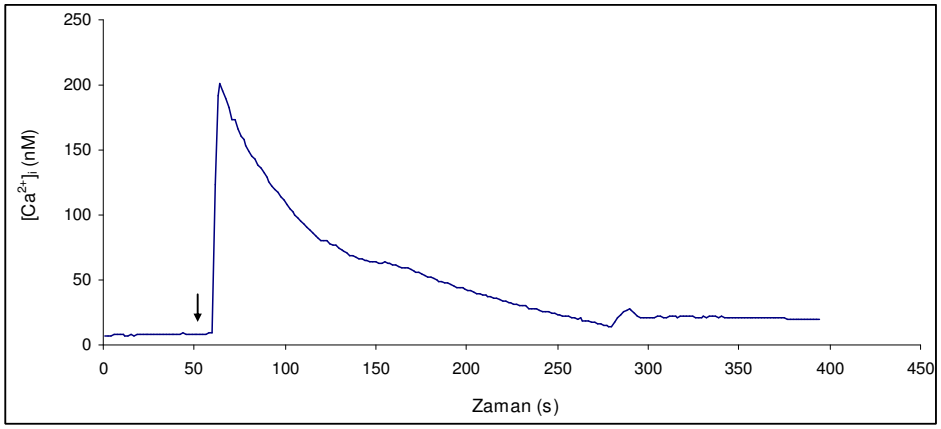
SERCA ve PMCA'nın birlikte inhibe edilmesinden sonra uygulanan ACh bir müddet sonra ortamdan uzaklaştırıldı. Bu deneyler Fura-2 AM ile yüklenmiş yaklaşık 50 hücreden gelen ortalama floresans sinyalinin toplandığı mikrospektroflorimetrede gerçekleştirildi. Deney solüsyonuna 25. s' de 20 μM CPA ve 1mM La^{3+}'un birlikte uygulanmasının ardından 40. s'de 10^{-4} M ACh eklendi. Ölçümün $[Ca^{2+}]_i$ artışının durduğu ve nispeten durağan kaldığı bir anında ACh banyo solüsyonundan perfüzyon pompası ile uzaklaştırıldı. (Şekil 3.16 siyah eğri). ACh'nin uzaklaştırılmadığı grup da perfüzyonun ölçüme etkisini kontrol etmek amacıyla kimyasalların derişimleri değiştirilmeden perfüze edilmiştir (Şekil 3.16 kahverengi eğri). Perfüzyona başlanma zamanı kesikli okla gösterilmiştir. Şekilden açıkça görüldüğü üzere hem SERCA hem de PMCA inhibe edildiği halde ACh uygulamasının kesilmesi sonrasında ve büyük ihtimalle IP_3 derişiminin azalması sonucunda $[Ca^{2+}]_i$ hızla azalmaktadır. Bu durum inhibitörlerin pompalar üzerindeki blokaj etkisinin tam olmadığını ve agonist uyarısının devam ettiği sürece IP_3R kanallarının tam kapanmayarak belli bir oranda da olsa açık kalmaya devam ettiğini düşündürmektedir.



Şekil 3.16. Ca^{2+} pompa inhibitörlerinin varlığında ACh uygulamasının kesilmesinin Ca^{2+} yanıtlarına etkisi. Farklı kimyasalların uygulandığı kayıtlar değişik renk kodları ile aynı grafikte gösterilmiştir. **Yeşil eğri:** 20 µM CPA ve 1 mM La^{3+} 35. s'de birlikte uygulanması. **Kırmızı eğri:** 45. s'de tek başına 10^{-4} M ACh uygulaması. **Kahverengi eğri:** 35. s'de 20 µM CPA ve 1 mM La^{3+} ardından 45. s'de 10^{-4} M ACh uygulanmıştır. 80. s'de deney solüsyonu içindeki kimyasalların derişimi değiştirilmeden perfüzyon yapılmıştır**. Siyah eğri:** 35. s'de 20 µM CPA ve 1 mM La^{3+} ardından 45. s'de 10^{-4} M ACh uygulanmıştır. 80. s'de deney solüsyonu içinden 10^{-4} M ACh uzaklaştırılıp (diğer kimyasalların derişimi değişmeden) perfüzyon gerçekleştirilmiştir. Tek bir kayıt sırasında Fura-2 AM ile yüklenmiş yaklaşık 50 hücrenin ortalama floresan şiddeti kaydedilmiştir.

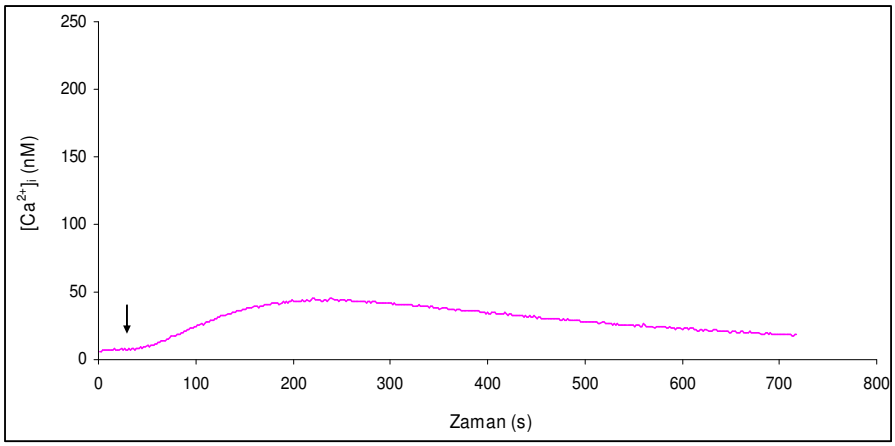
3.6 Kalibre $[Ca^{2+}]_i$ Ölçümü

Hücrede, dinlenim durumunda ve uyarı sonrasında Ca^{2+}'un miktarını nM cinsinden ölçebilmek için HEK 293 hücreleri Fura-2 AM ile yüklendi. Ardından mikrospektroflorimetrede gerçekleştirilen ölçümler kalibre edildi. Bu ölçümlerde tek tek hücreler yerine bir grup hücreden ortalama ölçüm yapıldı. Kalibrasyon sonuçlarına göre kararlı durumda $[Ca^{2+}]_i$ yaklaşık olarak 10 nM (SEM ± 1.5) civarında hesaplandı. Tek başına 10^{-4} M ACh uyarımı ile oluşan Ca^{2+} yanıtı kalibre edildikten sonra incelenerek $[Ca^{2+}]_i$'nun HEK-293 hücrelerinde ne kadar arttığı anlaşılmaya çalışıldı (Şekil 3.17). Farklı kayıtlardaki maksimum $[Ca^{2+}]_i$ ortalamasının yaklaşık 185 nM (SEM ± 16) olduğu görüldü.

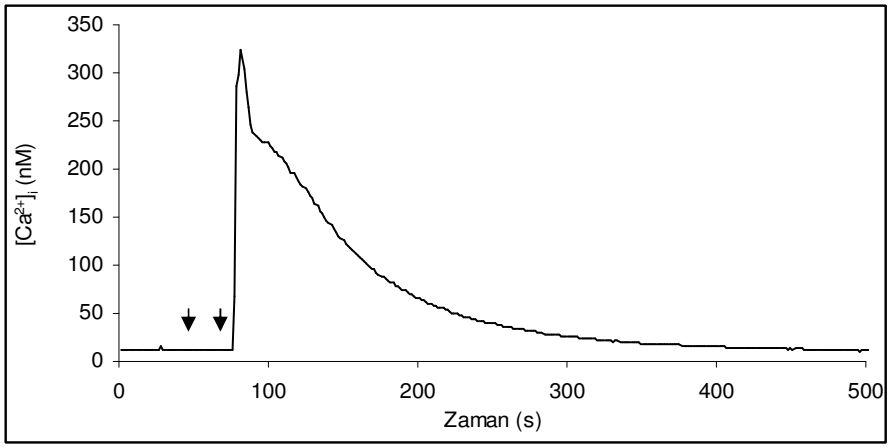


Şekil 3.17. Maksimum doz agonist uygulamasıyla sitoplazmadaki $[Ca^{2+}]$ değişiminin nM olarak gösterimi. Hücrelere 10^{-4} M ACh 50. s'de uygulanmıştır. Kayıt sırasında yaklaşık 50 hücrenin ortalama floresan şiddeti kaydedilmiştir.

SERCA inhibisyonu sonucunda $[Ca^{2+}]_i$ ne kadar arttığını öğrenebilmek için 20 µM CPA uygulaması yapılan hücrelerdeki floresan şiddet değişimleri de kalibre edildi (Şekil 3.18). İnhibisyonla birlikte Ca^{2+} dinamiği kalibre edilip incelendiğinde maksimum $[Ca^{2+}]_i$ ortalamasının yaklaşık 60 nM (SEM ± 12) olduğu görüldü. SERCA inhibisyonu ve maksimum doz agonist uyarısının birlikte yapıldığı ölçümler kalibre edildiğinde (Şekil 3.19) $[Ca^{2+}]_i$'nun maksimum ortalamasının yaklaşık 315 (SEM ± 6) olduğu görüldü.



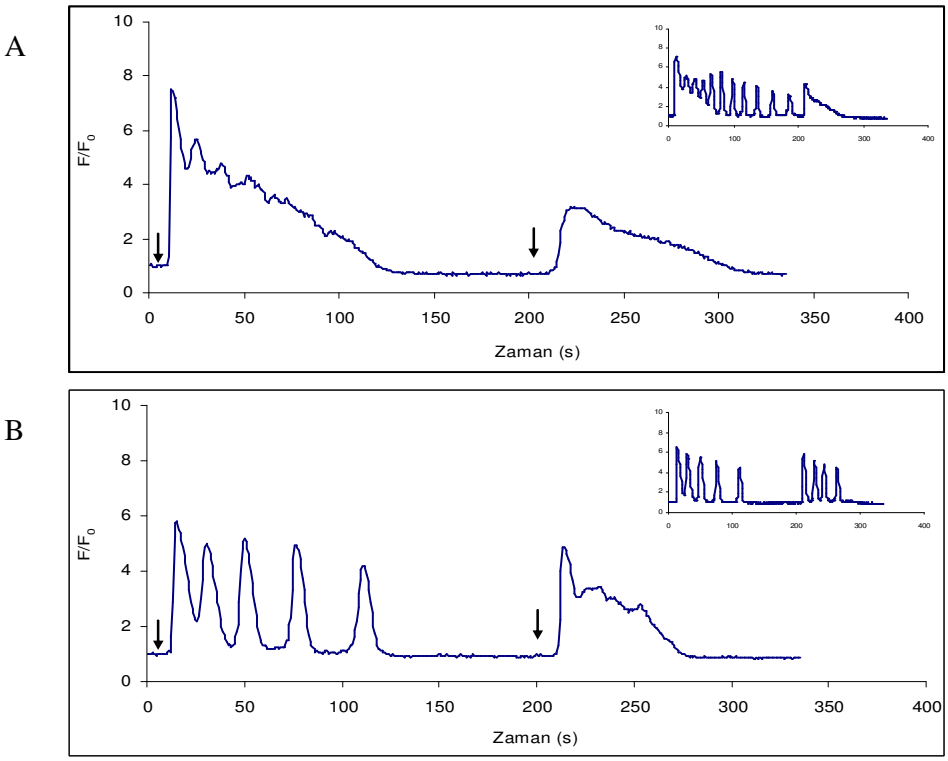
Şekil 3.18. SERCA inhibitörü uygulamasıyla sitoplazmadaki $[Ca^{2+}]$ değişiminin nM olarak gösterimi. Hücrelere 20 µM CPA 30. s'de uygulanmıştır. Kayıt sırasında yaklaşık 50 hücrenin ortalama floresan şiddeti kaydedilmiştir.



Şekil 3.19. SERCA inhibitörü ve ardından maksimum doz agonist uygulamasıyla sitoplazmadaki $[Ca^{2+}]$ değişiminin nM olarak gösterimi. Hücrelere 20 µM CPA 40. s'de, ardından 10^{-4} M ACh 65. s'de uygulanmıştır. Kayıt sırasında yaklaşık 50 hücrenin ortalama floresan şiddeti kaydedilmiştir.

3.7. Kuantal Salınım

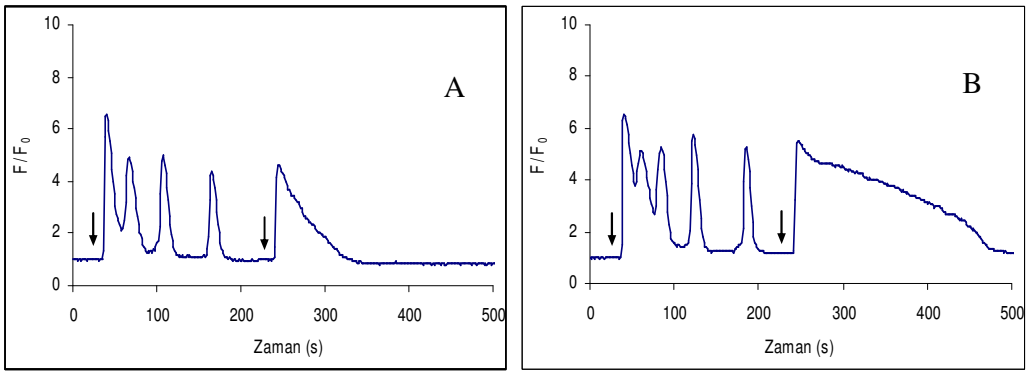
HEK 293 hücrelerinde kuantal yanıtları görebilmek için reseptör önce düşük doz ACh (10^{-6} M) ile uyarıldı. Uyarı devam ederken yanıtın uyarı öncesi değerlerine gelmesi ardından yüksek doz ACh (10^{-4} M) uygulandı. Uyarının dereceli artışına yanıtların da her hücre için aynı olmadığı görüldü. Şekil 3.20.A ve B'de sıklıkla karşılaşılmış yanıtlar ve sağ üst köşede daha az rastlanan yanıt desenleri verilmiştir.



Şekil 3.20. Kuantal Salınım. Hücreler önce 10^{-6} M ACh ile ardından 10^{-4} M ACh ile uyarıldı. **A ve B**'de bu şekilde uyarılmış hücrelerde en sık görülen iki farklı yanıt desenine örnek verilmiştir. Bununla birlikte daha az rastlanan yanıt desenleri de sağ üstte küçük şekillerde gösterilmiştir.

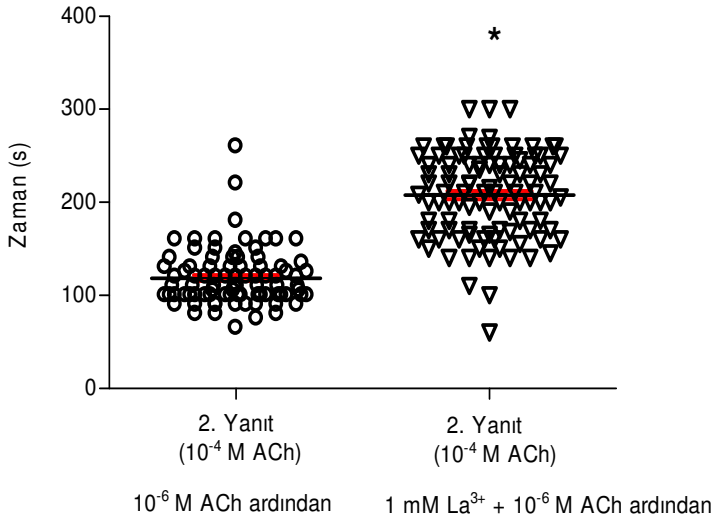
3.8. La^{3+} Varlığında Kuantal Salınım

PMCA blokajının kuantal salınıma etkilerini inceleyebilmek için ölçüm öncesinde deney solüsyonuna 1 mM La^{3+} uygulandı. Ardından deneye alınan hücrelere önce 10^{-6} M ACh uyarı devam ederken yanıtın uyarı öncesi değerlerine gelmesi ile birlikte 10^{-4} M ACh uygulandı (Şekil 3.21.B). Blokajın etkisi La^{3+} uygulanmamış yanıtlarla karşılaştırıldı (Şekil 3.21.A).



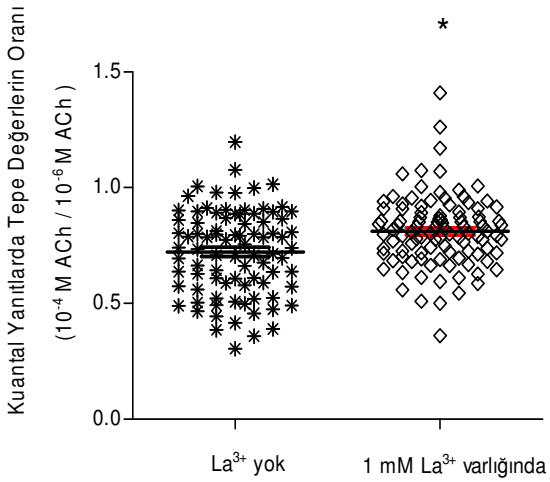
Şekil 3.21. PMCA blokajının kuantal salınıma etkisi. A. Blokör uygulanmadığı durumda kuantal salınım. Deney sırasında önce 10^{-6} M ardından 10^{-4} M ACh uygulaması yapıldı. **B.** Deney solüsyonunda 1 mM La^{3+} varlığında 10^{-6} M ve ardından 10^{-4} M ACh uygulaması yapıldı.

La^{3+} varlığında ve yokluğunda ikinci yanıtların süreleri karşılaştırıldığında 10^{-4} M ACh'e yanıtın süresi blokör uygulanmadığı durumda yaklaşık 120 s iken blokör varlığında bu süre belirgin bir şekilde artmış ve yaklaşık 210 s olmuştur (Şekil 3.22).



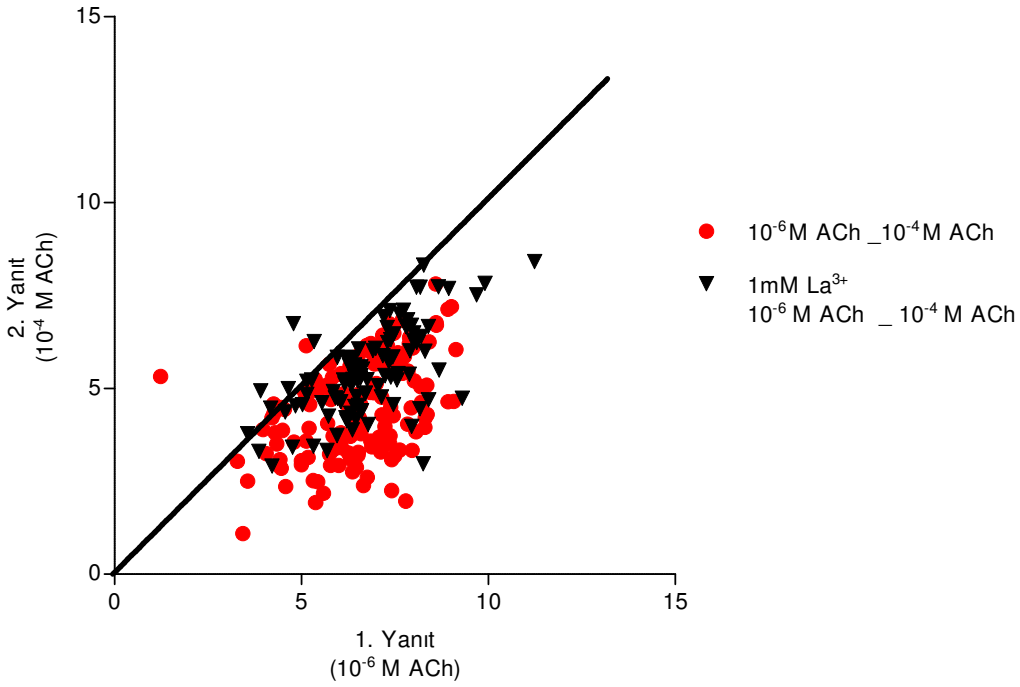
Şekil 3.22 Kuantal salınımda PMCA blokajının ikinci yanıtların sürelerine etkisi. Daireler: 10^{-6} M ACh ardından uygulanan 10^{-4} M ACh yanıt süreleri. **Üçgenler:** 1 mM La^{3+} varlığında 10^{-6} M ACh ardından uygulanan 10^{-4} M ACh için yanıt süreleri. *$p<0,05$ La^{3+} yokluğunda vs varlığında ikinci ACh uygulaması ile oluşan yanıtın süresi (10^{-4} M ACh). Yatay siyah çizgiler ortalama, kırmızı çizgiler ise SEM değerlerini göstermektedir. Her iki grup için n=100.

Yine La^{3+} varlığında ve yokluğundaki her iki durum için yanıtların tepe değerlerinin oranı (10^{-4} M ACh / 10^{-6} M ACh) karşılaştırıldı (Şekil 3.23). PMCA blokajı ikinci yanıtların büyüklüklerini arttırmıştır. Ancak bu etki ikinci yanıtın süresine olan etki kadar belirgin değildir.



Şekil 3.23. Kuantal yanıtlarda tepe değerlerin oranı. Yıldızlar; La^{3+} yokken, **dörtgenler;** La^{3+} varken yapılan deneylerde ikinci yanıtların tepe değerlerinin birinci yanıtların tepe değerlerine oranını göstermektedir. Her iki grup için n=100, *p<0,05 La^{3+} yokluğunda vs varlığında ikinci yanıt süreleri (10^{-4} M ACh/10^{-6} M ACh).

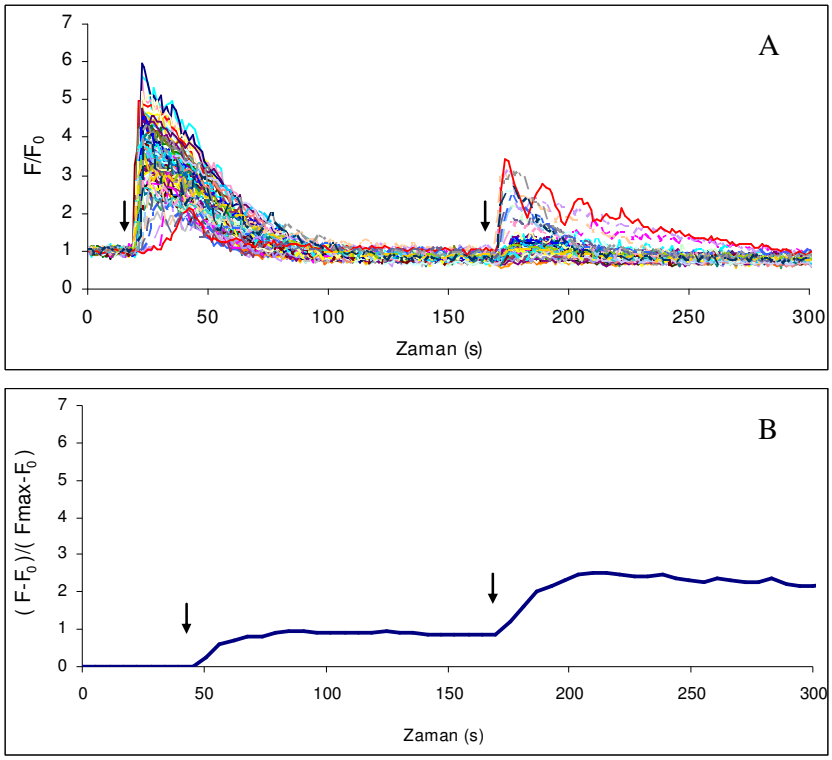
Hücrelerin ilk düşük doz ACh uyarısından sonra yüksek doz ACh'e verdikleri ikinci Ca^{2+} yanıtlarının birincisine göre daha küçük olduğu korelasyon eğrilerinde de görülmektedir (Şekil 3.24). Kırmızı noktalar PMCA blokajının yapılmadığı ACh uygulamalarını, siyah üçgenler ise blokaj varlığında yapılan ACh uygulamalarını temsil etmektedir. Her iki gruptan alınan ölçümlerde dağılımın eş-yanıt çizgisinin altında kalan bölümde kaldığı görülmektedir.



Şekil 3.24. Kuantal salınımda ilk yanıt ile ikinci yanıt arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon verisi. Kırmızı noktalar; 10^{-6} M ACh F/F_0 tepe değeri ile 10^{-4} M ACh F/F_0 tepe değerleri, (n=154 r: 0.44, p<0,0001), **siyah üçgenler;** La^{3+} varlığında 10^{-6} M ACh F/F_0 tepe değeri ile 10^{-4} M ACh F/F_0 tepe değerleri (n=103, r:0.63, p<0,0001) göstermektedir.

3.9. Agonist Uyarısı Sonucunda Değişen [IP_3] Kinetiği

Muskarinik reseptörün uyarılması ile üretilen [IP_3] kinetiğini incelemek için eGFP–$PH_{PLC\gamma}$ kullandık. Uyarı öncesinde plazma membranında bulunan bu biyosensor agonist uygulaması ile artan IP_3 ile birlikte sitoplazmaya doğru yer değiştirir. Bu yer değiştirme ise [IP_3] kinetiği hakkında bilgi verir. Plazmidin transfekte edildiği HEK 293 hücrelerinde yaptığımız deneylerde sitoplazmada IP_3 artışını ölçemedik. Bu nedenle mACh reseptörünü kalıcı olarak transfekte ettiğimiz LTK 8 hücrelerinde deneyi tekrarladık. ACh $10^{-6.5}$ ve ardından 10^{-4} M uyguladığımız hücrelerde agonist uygulaması sonrası sitoplazmik Ca^{2+} derişimi zamanla bazal seviyelerine dönse bile (Şekil 3.25.A), IP_3'ün basamaklı bir dinamiği olduğu, agonist uygulaması boyunca IP_3 derişiminin yüksek kaldığı ve daha yüksek derişimde agonist uygulaması ile daha yüksek bir seviyeye çıkarak göreceli olarak sabit kaldığı görülmektedir (3.25.B). Bu bulgu modelde kullandığımız [IP_3]'nin basamaklı olarak arttığı basitleştirici varsayımını doğrulamaktadır.



Şekil 3.25. IP_3'ün basamaklı artış kinetiği. Aynı gün yapılan iki ayrı deneyde, **A.** Tek hücre $[Ca^{2+}]_i$ yanıtları $10^{-6.5}$ M ACh ve ardından 10^{-4} M ACh uygulanarak elde edildi. **B.** eGFP–PH_{PLC} proteini eksprese eden diğer bir grup hücrede aynı agonist uygulamalarının yapılması ile elde edilen tek hücrede IP_3 kinetiği.

3.10. Matematik Modelleme Bulguları

Matematik modelimiz için arama uzayımızda Tablo 2.1'de verilen değer aralıklarında, rastgele parametrelerle simülasyonlar yapılmış, bu simülasyonların sonuçları filtrelendikten sonra deney bulgularının kinetik davranışı ile benzerlik gösteren parametre kümeleri seçilmiştir. Çizelge 3.1'de seçtiğimiz ilk kombinasyon olan $[Ca^{2+}]_{ER}$=500 μM, $[Ca^{2+}]_i$=0,1 μM için bulunan parametre kümelerini görmekteyiz.

Çizelge 3.1. $[Ca^{2+}]_{ER}$=500 μM, $[Ca^{2+}]_i$=0,1 μM için parametre kümeleri.

	1. Parametre Kümesi	2. Parametre Kümesi	3. Parametre Kümesi
K_{d_SERCA} (μM)	0,047	0,051	0,05
K_{d_PMCA} (μM)	0,39	0,28	0,328
P_{ip3}	0,059	0,036	0,144
Vr	0,0744	0,177	0,166
n	2,58	3,23	2,71
k_6: (s^{-1})	0,032	0,041	0,068
P_{SERCA}:	23	20	33,7
P_{PMCA}:	3,98	1,49	4,26

Çizelge 3.2. $[Ca^{2+}]_{ER}$=1000 μM, $[Ca^{2+}]_i$=0,1 μM için parametre kümeleri.

	1. Parametre Kümesi	2. Parametre Kümesi	3. Parametre Kümesi
K_{d_SERCA} (μM)	0,035	0,052	0,55
K_{d_PMCA} (μM)	0,55	0,3	0,35
P_{ip3}	0,1	0,1	0,12
Vr	0,188	0,07	0,12
n	2,31	2,62	2,6
k_6 (s^{-1})	0,16	0,076	0,1
P_{SERCA}	122	74	68
P_{PMCA}	15	6,3	9,5

Çizelge 3.2'de $[Ca^{2+}]_{ER}$=1000 μM, $[Ca^{2+}]_i$=0,1 μM için, Çizelge 3.3'de $[Ca^{2+}]_{ER}$ =500 μM, $[Ca^{2+}]_i$ =0,03 μM ve Çizelge 3.4'de $[Ca^{2+}]_{ER}$ =1000 μM, $[Ca^{2+}]_i$ =0,03 μM için bulunan parametre kümelerini görmekteyiz.

Çizelge 3.3. $[Ca^{2+}]_{ER}$=500 μM, $[Ca^{2+}]_i$=0,03 μM için parametre kümeleri.

	1. Parametre Kümesi	2. Parametre Kümesi	3. Parametre Kümesi
K_{d_SERCA} (μM)	0,026	0,033	0,031
K_{d_PMCA} (μM)	0,16	0,32	0,157
P_{ip3}	0,16	0,23	0,16
Vr	0,1	0,11	0,093
n	2,55	2	2,66
k_6 (s^{-1})	0,16	0,056	0.05
P_{SERCA}	20	18,8	9,23
P_{PMCA}	7,31	17	8,37

Çizelge 3.4. $[Ca^{2+}]_{ER}$=1000 μM, $[Ca^{2+}]_i$= 0,03 μM için parametre kümeleri.

	1. Parametre Kümesi	2. Parametre Kümesi	3. Parametre Kümesi
K_{d_SERCA} (μM)	0,073	0,03	0,03
K_{d_PMCA} (μM)	0,19	0,25	0,19
P_{ip3}	0,24	0,11	0,18
Vr	0,053	0,033	0,015
n	2,23	2,04	2,42
k_6 (s^{-1})	0,047	0,038	0,029
P_{SERCA}	21	18	17,5
P_{PMCA}	18	17,9	19

4. TARTIŞMA

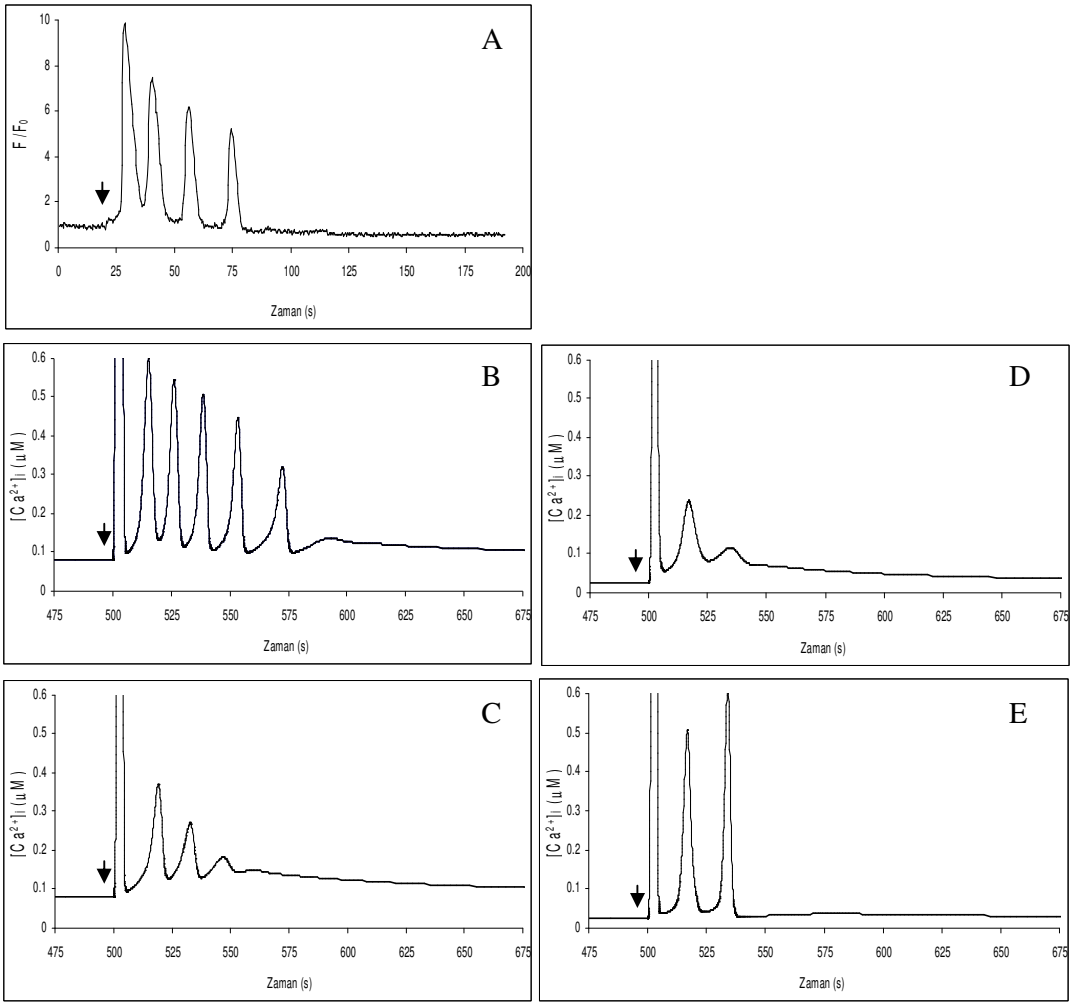
Reseptör uyarısı ile ve IP_3 aracılı olarak hücre içi Ca^{2+} derişiminin artması ile ilgili yapılan bir çok çalışmaya rağmen halen cevaplanamamış pek çok soru bulunmaktadır. Örneğin, sabit agonist uygulamasına rağmen (geçici) sönümlü osilasyon gösteren kompleks Ca^{2+} dinamiklerinin gözlendiği literatürde çok iyi bilinen bir olgudur. Bu yanıtların geçici olmasına rağmen agonist uyarısının şiddeti arttırılınca hücreler ikinci bir yanıt daha verebilmektedirler (Bootman ve ark., 1994). Bu olgu (tam doğru bir isimlendirme olmamakla beraber) kuantal Ca^{2+} salınımı olarak adlandırılmıştır (Muallem ve ark., 1989). İlginç nokta bu kuantal salınım olgusunun varlığı çok iyi bilinen CICR gibi bir pozitif geribesleme mekanizmasına rağmen oluşabilmesidir. Bu gözlemi açıklayabilmek için IP_3R'nün sabit derişimdeki ligand uyarısına zamana bağlı uyum (adaptasyon) gösterdiğini iddia eden bazı modeller öne sürülmüştür. Bu modellerin bir kısmı oldukça kompleks bir yapıya sahiptir (Sneyd ve Dufour, 2002). Ancak deneysel olarak böyle bir uyum doğrudan gösterilememiştir. Bu çalışmada basit bir tüm hücre Ca^{2+} salınım modeli olan Othmer-Tang'ı (Tang ve ark., 1996) kullanarak deneylerimizde gözlemlediğimiz agonist uyarısı ile oluşan kompleks hücre içi Ca^{2+} dinamiğinin pek çok özelliğini birlikte açıklamaya çalıştık. Othmer-Tang modeli (Tang ve ark., 1996) içinde yer alan elemanların varlıkları deneysel olarak gösterilmiş pompalar ve iyon kanallarından oluşmaktadır. Bu elemanların fonksiyonel davranışları ise esas olarak fiziko-kimyasal yasalar tarafından belirlenmiştir ve gözlemlerle elde edilen davranışlarla sınırlanmıştır. Çalışmamızda bu tip elemanları deneysel veriler ile şekillenmiş basit bir modeli seçme amacımız hücrede gözlenen Ca^{2+} salınım davranışlarını modele bilinen elemanların bilinen davranışları dışında bir mekanizma katmaksızın tüm elemanların birlikte etkileşmesinin bir sonucu olarak açıklanıp açıklanamayacağını anlamaktır. Bildiğimiz kadarı ile Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) gibi basit bir model hücrelerde gözlenmiş pek çok Ca^{2+} salınım davranışının birlikte açıklanması amacı ile henüz hiç kullanılmamıştır.

Yaptığımız IP_3 ölçümlerinde agonist uygulaması ile hücre içinde sabit bir IP_3 artışı elde edilirken artan agonist derişimleri ile de IP_3 seviyesinin basamaklı bir şekilde arttığı gözlendi. Bu bulgular bize sabit bir IP_3 düzeyinde bile Ca^{2+} osilasyonlarının ve geçici yanıtların gözlenebileceğini göstermiştir. Bu nedenle bir basitleştirme olarak modelimizde ACh uyarısının sabit bir IP_3 artışı yaptığını kabul ettik. Ca^{2+} salınımının özelliklerini daha iyi anlamak için deneylerimizde önce hücrelerin düşük doz ve yüksek doz ACh uyarısı ile yaptıkları osilasyonları inceledik. Aynı anda farklı hücrelerden gözlenen osilasyonlar sığ ve derin olarak gruplandırıldı. Her bir doz için hücrelerin yaptıkları osilasyonlar sayıldı ve yanıt süreleri ölçüldü. Doz artışı ile hücrelerin yaptıkları ortalama osilasyon sayılarındaki ve yanıt sürelerindeki değişim bulundu. Bu şekilde hücrelerin agonist uyarısı ile oluşturdukları ortalama bir yanıt profili çıkartılmış oldu. Buna göre hücreler düşük doz ACh uygulamasında $[Ca^{2+}]_i$ çoğunlukla tek atımlık derin pikler yaparken, yüksek doz uygulaması ile $[Ca^{2+}]_i$ hızla artan ve göreceli olarak daha yavaş bir şekide azalan bir dinamik göstermektedir.

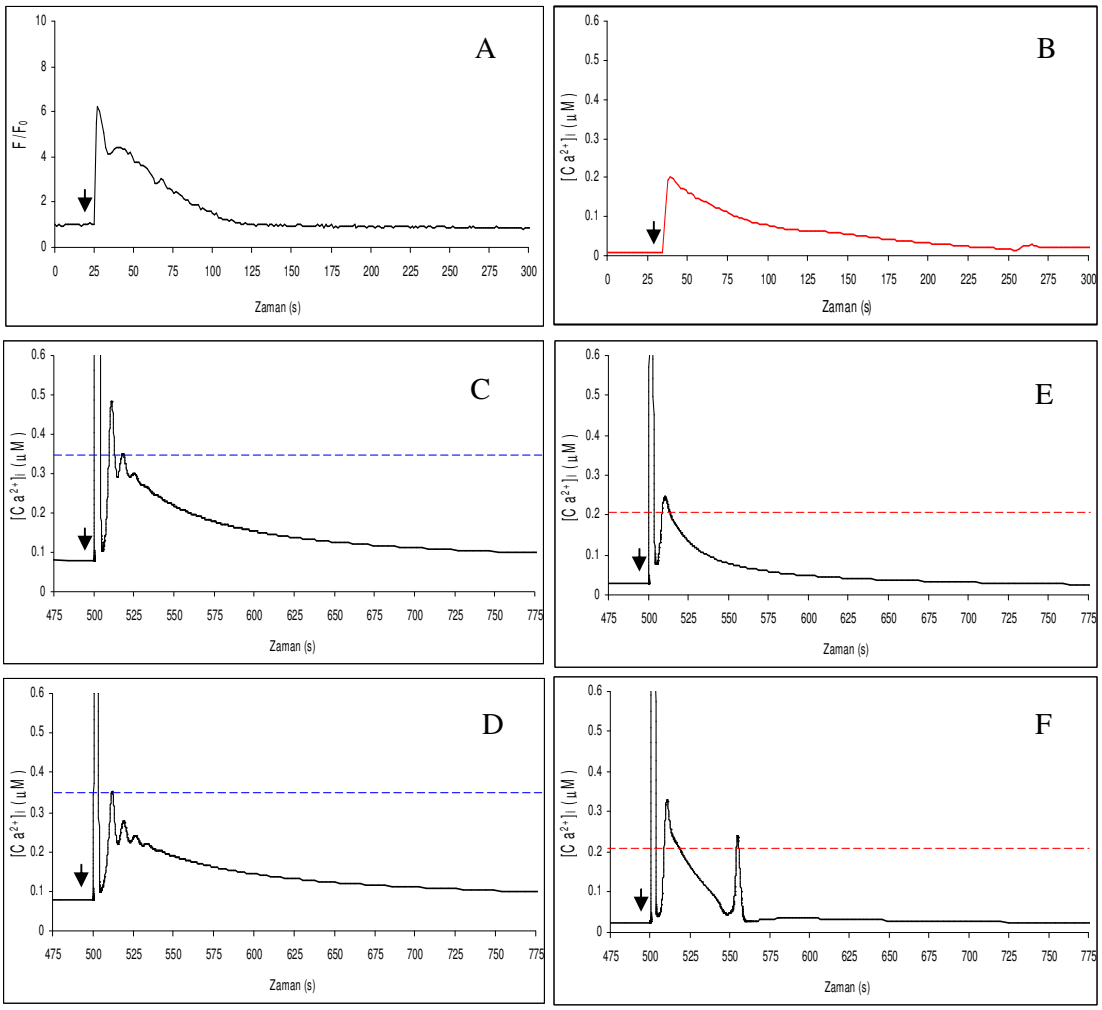
Literatürde $[Ca^{2+}]_{ER}$ için 500 ile 1000 μM (Barrero ve ark., 1997; Burdakov ve ark., 2005; Yu ve Hinkle, 2000) aralığında, $[Ca^{2+}]_i$ için ise 0,01 ile 0,1 μM arasında ölçümler bulunduğu için (Mak ve ark., 1998; Bezprozvanny ve Ehrlich, 1995; Golovina ve Blaustein, 1997; Shmigol ve ark., 1996; Bootman ve ark., 1992), çalışmamızda bu iki kompartmanın derişimi için dört ayrı değer kombinasyonu kullanılarak simülasyonlar yapıldı. Bu değer kombinasyonları (sırası ile ER ve sitozolik $[Ca^{2+}]$ için) 500 ve 0,1 μM; 1000 ve 0,1 μM; 500 ve 0,03 μM ve 1000 ve 0,03 μM olarak belirlenmiştir ve her biri için model parametresi arama işlemi ayrıca yapılmıştır. Deneysel gözlemlerin olduğu değişkenler için bu gözlenen değerler referans alınarak, diğer değişkenler için ise deneme yoluyla belirlenen değer aralıkları içerisinde kalacak şekilde rastgele parametre grupları belirlenerek model denklemleri sayısal olarak çözüldü ve deney sonuçları ile karşılaştırılarak deney sonuçları ile en uyumlu sonuç veren parametre grupları arandı. Denenen 3 milyon parametre kümesinden durağan ve istenen düzeyde bir kararlı durum ER ve sitoplazmik $[Ca^{2+}]$ oluşturabilenleri ayıklandıktan sonra, ilk olarak bunlar içinde yüksek ve düşük doz agonist uyarısı ile hücrelerde oluşan yanıtlarının yukarıda belirtilen ve ölçülmüş özelliklerini taklit edebilen parametre kümeleri belirlendi.

Bunlardan kuantal salınım yapabilenleri bir sonraki aşamada ayıklandı. Daha sonra CPA uygulamasının oluşturduğu $[Ca^{2+}]_i$ yanıtını bir ölçüde taklit edebilenleri seçildi. Bu eleme işlemlerinin sonucunda her bir ER ve sitozolik $[Ca^{2+}]$ değer kombinasyonu için az sayıda parametre kombinasyonu kalmış oldu.

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de düşük (10^{-6} M) ve yüksek (10^{-4} M) doz agonist uyarısının karşılığı olarak düşünülen düşük ve yüksek IP_3 derişimleri için elde edilen simülasyon sonuçları ile deney sonuçları ile birlikte görülmektedir. Şekilde her bir ER ve sitozolik $[Ca^{2+}]$ değer kombinasyonu için birer simülasyon sonucu gösterilmiştir ancak her bir parametre kombinasyonu için üçer parametre kümesi ile simülasyon yapılmıştır.

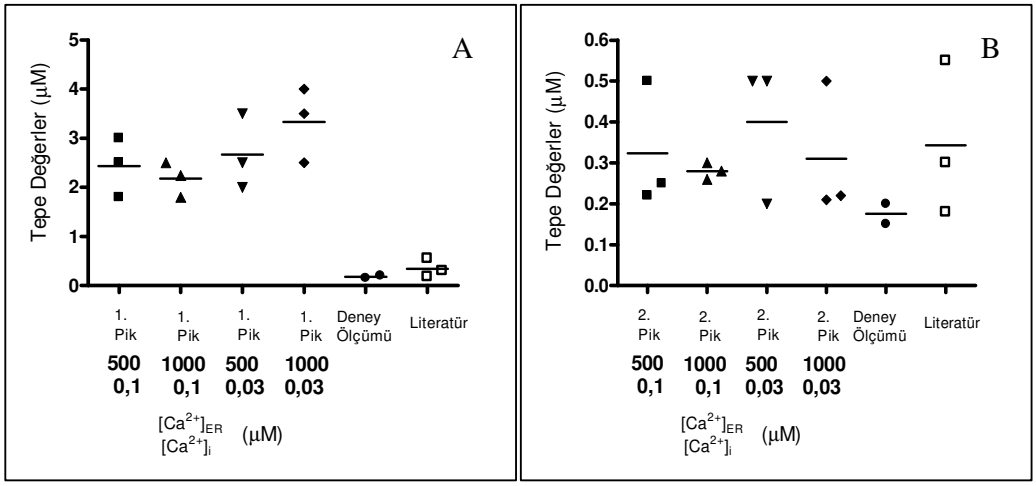


Şekil 4.1. Düşük doz olarak belirlenen IP_3 derişiminde her bir kombinasyon için simülasyon sonuçları ile deney bulgusu. **A.** Tek bir HEK 293 hücresinde 10^{-6} M (düşük doz) ACh uygulaması sonucu gözlenen tipik bir yanıt. **B.** 500_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda 0,5 µM IP_3 uyarısı ile yapılmış simülasyon sonuçları. ACh ve IP_3 uyarı zamanları okla belirtilmiştir.



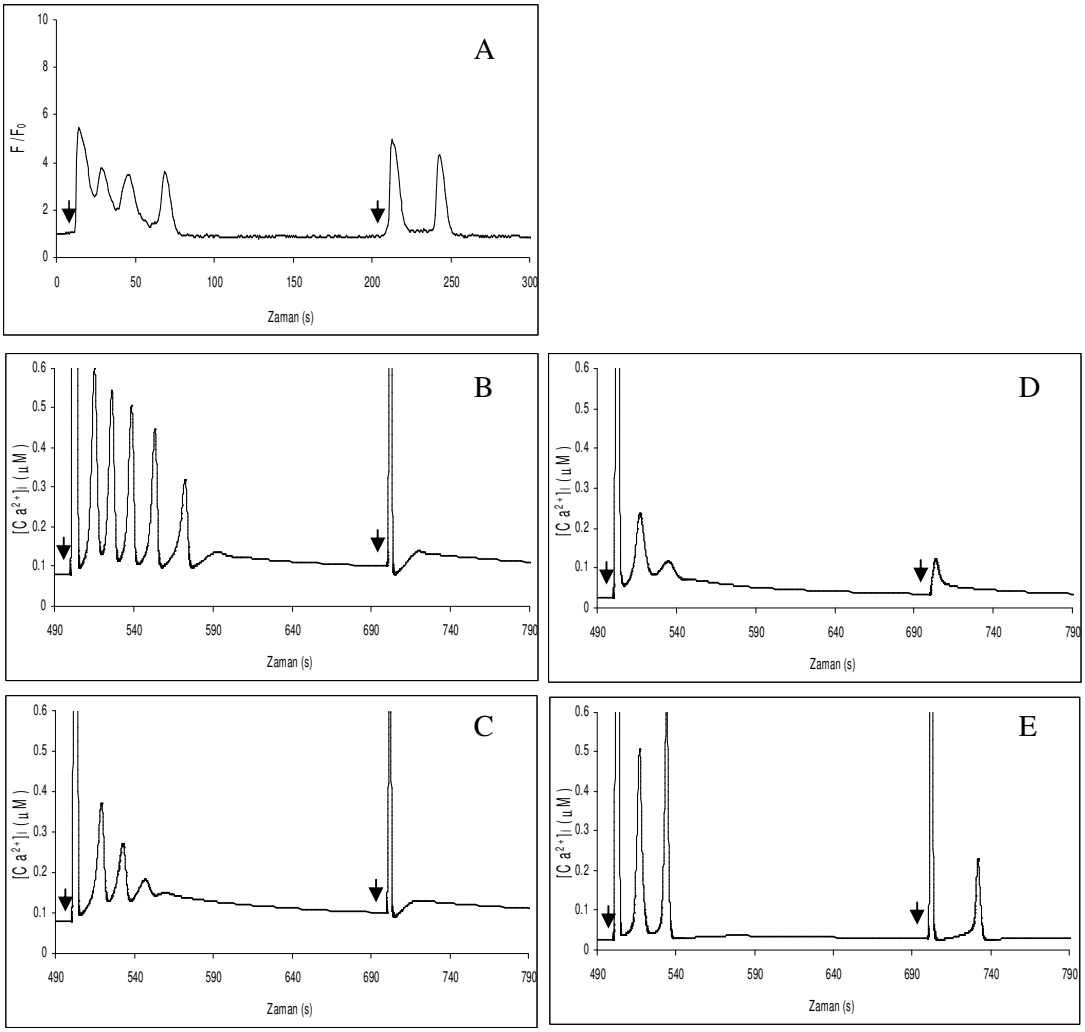
Şekil 4.2. Yüksek doz olarak belirlenen IP_3 derişiminde her bir kombinasyon için simülasyon sonuçları ile deney bulgusu. **A.** Tek bir HEK 293 hücresine 10^{-4} M (yüksek doz) ACh uygulaması sonrasında ölçülen tipik bir yanıt. **B.** 10^{-4} M ACh uygulaması için Kalibre $[Ca^{2+}]_i$ ölçümleri. **C.** 500_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 1000_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 500_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **F.** 1000_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda 10 µM IP_3 uyarısı yapılmış simülasyon sonuçları. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. **Kırmızı kesikli çizgiler;** 10^{-4} M ACh için kalibre edilmiş $[Ca^{2+}]_i$ öçümümüzün ortalama tepe değerlerini, **mavi kesikli çizgiler;** literatürde bildirilen ortalama tepe değerlerini göstermektedir.

Matematik model çözümlerinin tümünde hem yüksek hem de düşük doz IP_3 uyarısının ardından Ca^{2+} derişiminin ilk önce ani bir şekilde yüksek değerlere çıktığı ve ardından yine aynı hızla düşerek $[Ca^{2+}]_i$ için gözlenen derişim aralıklarına yakın değerlerde yanıtın devam ettiği görüldü. Bu simülasyonlarda elde edilen ilk pik değerleri Şekil 4.3.A'da, ikinci pik değerleri ise Şekil 4.3.B'de bizim deneysel olarak ölçtüğümüz ayrıca literatürde yüksek doz agonist varlığında ölçülmüş $[Ca^{2+}]_i$ pik değerleri karşılaştırılmıştır. İlk pikler bizim ölçtüğümüz ve literatürde verilen değerlerden oldukça büyüktür. Ancak ikinci piklerin değerlerinin hem ölçtüğümüz hem de literatürdeki sonuçlara yakın bir aralıkta oldukları görülmektedir. Deney sonuçlarımızda görülmeyen ancak modelde karşılaştığımız bu ani ve yüksek tepe değerine sahip pikler, modelde mitokondri gibi yüksek kapasiteli, düşük afiniteli tamponlara yer verilmemesi ile açıklanabilir. Ancak yine de bu nokta en az sistem parametresine sahip bir modelle Ca^{2+} sinyalinin ana hatlarının açıklanmasını amaçlayan bu çalışmanın deneysel sonuçlar ile çelişkiye düştüğü önemli bir nokta olarak değerlendirilmelidir. Yine de bu nokta dışında yanıtların genel özellikleri (tepe değerleri, osilasyon sayıları (Şekil 4.7) ve yanıt süresi (Şekil 4.8)) kullandığımız basit Othmer-Tang modeli (Tang ve ark., 1996) ile oldukça iyi açıklanabilmektedir.



Şekil 4.3. Yüksek doz uyaran için simülasyon sonuçlarındaki birinci ve ikinci piklerin tepe değerlerinin karşılaştırılması. **A.** Belirtilen ER ve sitozolik [Ca^{2+}] başlangıç değerlerindeki çözümlerinin yüksek doz uyarana verdiklerin yanıtın birinci piklerinin tepe değerlerinin, ölçtüğümüz 10^{-4} M ACh ile oluşan ve literatürde verilen agonist uyarısı ile oluşan tepe değerleri ile karşılaştırılması. **B.** Belirtilen ER ve sitozolik [Ca^{2+}] başlangıç değerlerindeki model çözümlerinin yüksek doz uyarana verdiklerin yanıtın birinci piklerinin tepe değerlerinin, ölçtüğümüz 10^{-4} M ACh ile oluşan ve literatürde verilen agonist uyarısı ile oluşan tepe değerleri ile karşılaştırılması.

Düşük ve yüksek doz IP_3 uyarısı ile yüksek ve düşük doz agonist uyarısı ile oluşan gözlem sonuçlarını açıklayabilen bu parametre setleri aynı zamanda kuantal yanıt verme özelliğine sahip oldukları görülmektedir (Şekil 4.4). Model sonuçları kuantal yanıt vermekle birlikte özellikle ikinci agonist yanıtının kinetiği deneysel gözlemler ve model sonuçları arasında belirgin farklılık göstermektedir. İncelediğimiz dörtlü kombinasyonlardan sadece 500-0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ de ikinci yanıtın kinetiği deney bulgusuyla bir ölçüde benzeşmektedir.



Şekil 4.4. Önce düşük doz ve ardından yüksek doz olarak uygulanan uyarılar için her bir kombinasyon için simülasyon sonuçları ile deney bulgusu. A. Tek bir HEK 293 hücresine önce 10^{-6} M ve sonra 10^{-4} M ACh uygulaması ile oluşan kuantal yanıtlar. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda önce 0,5 μM ve sonra 10 μM IP_3 uyarısı yapılmış simülasyon sonuçları. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir.

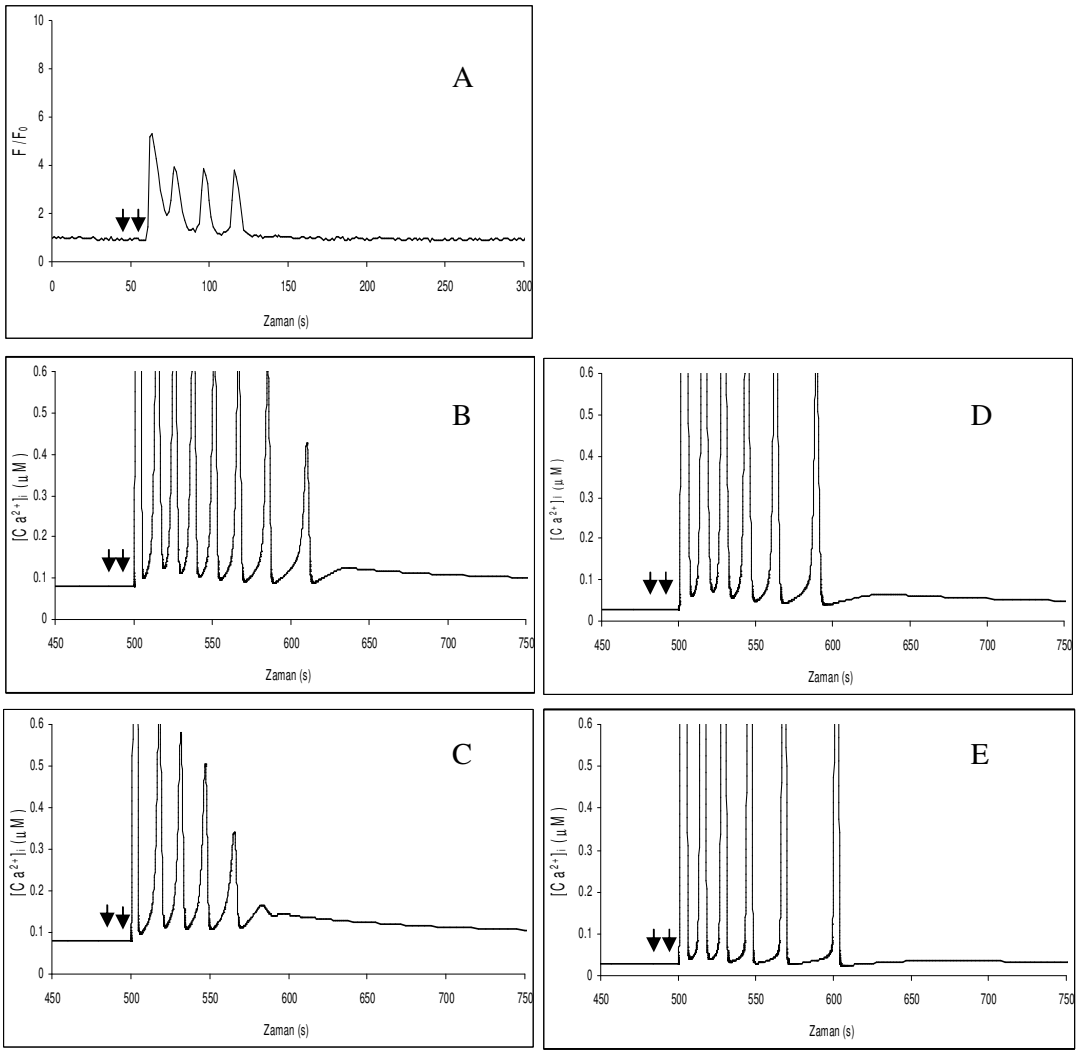
Burada tartışılması gereken önemli bir nokta kuantal Ca^{2+} salınımı için reseptörün sitoplazmaya Ca^{2+} salınımını sınırlayan bir adaptif davranış gösterip göstermediği konusudur. Reseptörün adaptif davranış gösterdiğine dair bulgular (Györke ve Fill, 1993) kuantal salınım fenomenini reseptörün zamana bağlı uyumu (adaptasyonu) ile açıklamaya çalışan diğer çalışmalara zemin oluşturmuştur (Dawson ve ark., 2003). Györke ve Fill (1993) lipit çift tabakaya yerleştirilmiş izole RyR kanalında yaptıkları deneylerde kanalın sitozolik tarafındaki Ca^{2+} konsantrasyonundaki artış ile kanalın açılma olasılığının hızla arttığını ancak birkaç saniye içinde de azaldığını

gözlemişlerdir. Banyo solüsyonundaki Ca^{2+}'un yeniden arttırılmasıyla yüksek açılma olasılıklı ikinci bir transient oluşmuştur. Bu gözlemleri için önerdikleri mekanizmaya göre Ca^{2+} bir aktivatör bölgeye bağlandığında kanalda oluşan konformasyonal değişiklikle gelişen uyum ile Ca^{2+} bağlama bölgesinin afinitesi azalır ve Ca^{2+} kanaldan ayrılır.

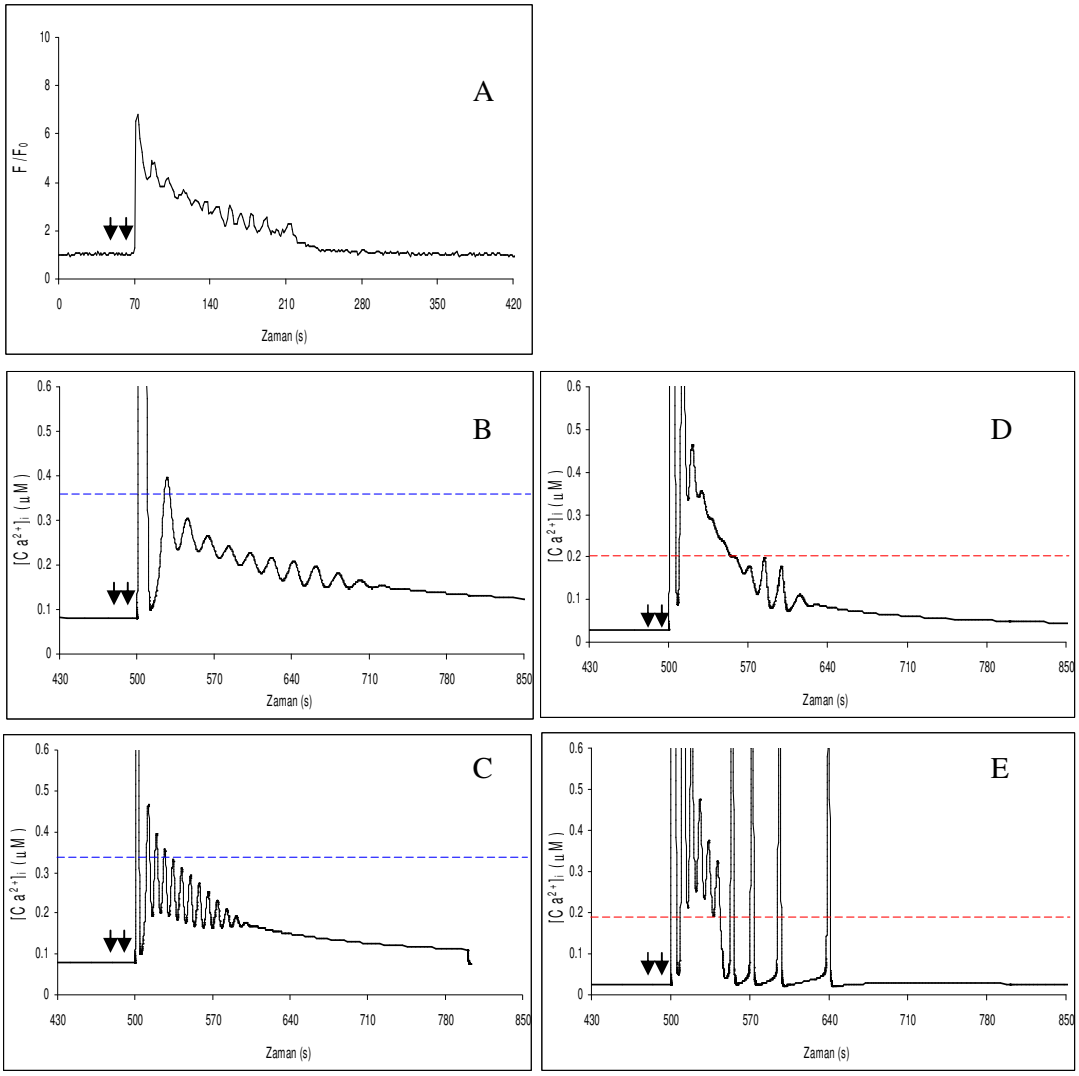
Ancak kanalın bu şekilde uyum göstermesinin termodinamik olabilirliği Stern (1996) tarafından değerlendirildiğinde, sistemin yüksek afiniteli açık durumdan (state) düşük afiniteli duruma (state) geçişi (reseptörün uyum oluşturması) şeklinde spontan gelişimi, dinlenim durumunun yüksek afiniteli kapalı durum (state) yerine düşük afiniteli durum (state) olmasını gerektirecektir. Kanalın daha yüksek bir dozda Ca^{2+} derişimine maruz kalması ile kanalın açılması için gerekli serbest enerji, Ca^{2+} bağlanması ile karşılanmalıdır. Eksojen serbest enerji kaynağı yokluğunda bu gerekliliğin karşılanabilmesi için kanalın en az 10 kalsiyum bağlama bölgesinin olması gerekmektedir. Böyle bir bulgu ise literatürde bulunmamaktadır. Ayrıca Györke ve Fill'in (1993) kullandığı deneysel teknik de bazı eleştirilere maruz kalmıştır. Reseptörün değişen uyarıya karşı davranış kinetiğinin deneysel olarak ölçülmesindeki sıkıntı uyum (adaptasyon) mekanizması gibi deneysel olarak doğrulanamayan dolayısı ile de hipotez olarak kalan mekanistik modellere zemin hazırlamaktadır. Ancak bizim kullandığımız matematik modelde, reseptöre herhangi bir uyum (adaptasyon) özelliği yüklemeye gerek kalmadan (bazı kinetik uyumsuzluklara rağmen) bir kuantal salınım davranışı gözlemleyebilmemiz, kuantal salınım gibi karmaşık davranışların Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) gibi sınırlı modellerle de açıklanabileceğinin ilk olarak gösterilmesidir (Şekil 4.4).

Tek başına ACh uygulaması ve kuantal salınım fenomenini açıklayan bu parametre setleri La^{3+} uygulaması sonucu oluşan PMCA blokajı sonuçlarını da bir ölçüde

açıklamaktadır. Modelde PMCA'nın dinlenim durumunda blokajı dinlenim durumundaki hücrelere La^{3+} uygulaması ile elde edilen deney sonucu ile uyumlu olarak sitozolde Ca^{2+} artışına neden olmamaktadır (Deney bulgusu gösterilmedi). La^{3+} uygulaması ardından verilen ACh (10^{-6} ve 10^{-4} M) uyarısının oluşturduğu yanıtları taklit etmek amacı ile modelde de PMCA blokajı ardından düşük ve yüksek doz IP_3 uygulaması gerçekleştirildi (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). PMCA blokaj miktarı her bir parametre kümesi için farklı seçilmiştir.



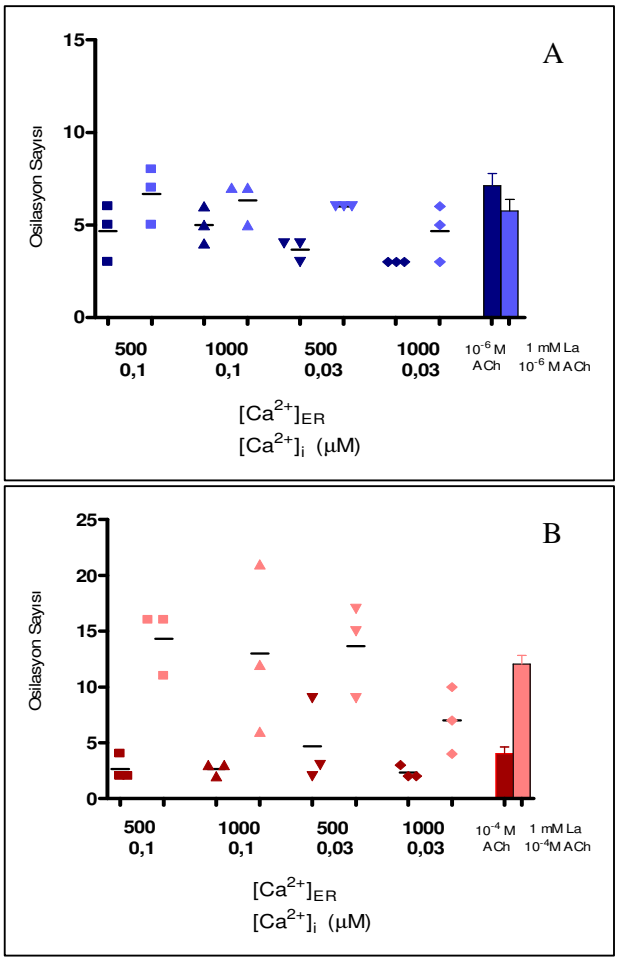
Şekil 4.5. PMCA blokajı ve düşük doz IP_3 uygulaması. A. Tek bir HEK 293 hücresine önce 1 mM La^{3+} ve ardından 10^{-6} M ACh uygulaması ile elde edilen yanıt. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşuluyla önce PMCA blokajı ve ardından 0,5 μM IP_3 uyarısı yapılmış simülasyon sonuçları. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir.



Şekil 4.6. PMCA blokajı ve yüksek doz IP_3 uygulaması. A. Tek bir HEK 293 hücresine önce 1 mM La^{3+} ve ardından 10^{-4} M ACh uygulaması ile elde edilen yanıt. **B.** 500_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda PMCA blokajı ve ardından 10 µM IP_3 uyarısı yapılmış simülasyon sonuçları. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. **Kesikli çizgiler: Kırmızı kesikli çizgiler;** 10^{-4} M ACh uyarısındaki kalibre öçümümüzün tepe değerlerini, **mavi kesikli çizgiler;** literatürdeki agonist uyarısı için bildirilmiş ortalama tepe değerlerini göstermektedir. La^{3+} uygulaması bu değerleri etkilemediği için La^{3+} yokluğunda elde edilen değerler karşılaştırma için kullanılmıştır.

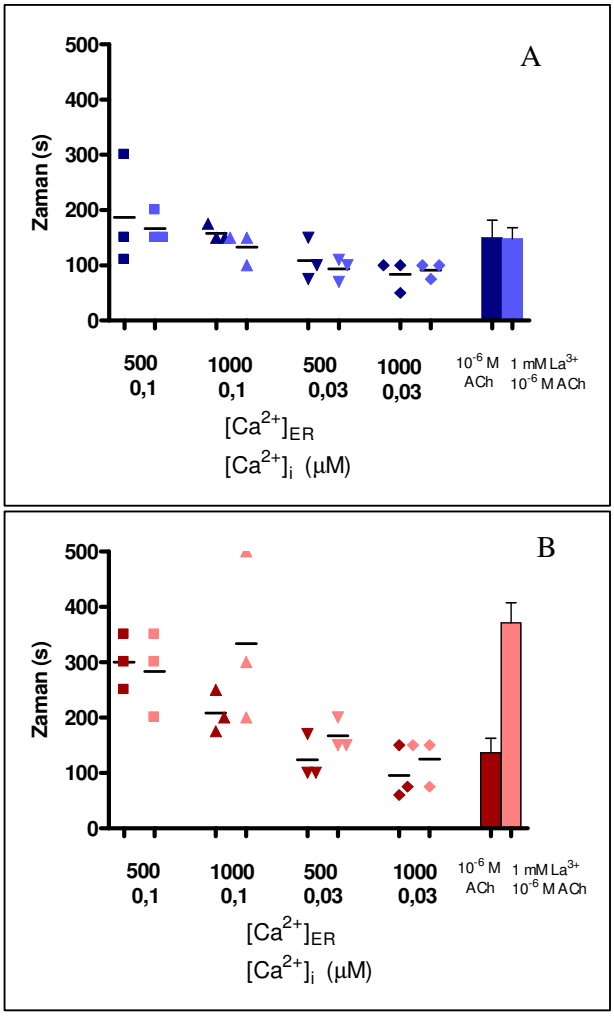
Deney bulgularımıza göre La^{3+} ile PMCA'nın blokajı 10^{-6} M ACh uygulamasının oluşturduğu yanıtların gerek büyüklüklerini gerekse osilasyon sayısılarını etkilemedi. Ancak modelde düşük doz IP_3 uyarısı ile oluşturulan çözümlerin büyüklükleri ve osilasyon sayıları PMCA blokajı ile birlikte bir miktar arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.7.A). Ayrıca deneysel olarak La^{3+} uygulaması ile sığ yanıtların oranının arttığı gözlenirken (Şekil 3.8) model çözümleri benzer bir davranış da gösterememiştir.

Bununla birlikte model, 10^{-4} M ACh uygulamasıyla deneysel olarak gözlemlediğimiz ve yanıt kinetiğinin ana biçimi değişmeden sığ pik sayısında oluşan artış sonucunu tekrarlayabilmektedir. Bu osilasyon sayısındaki artış sayısal olarak da deneysel gözlemlerle tutarlıdır (Şekil 4.7.B)



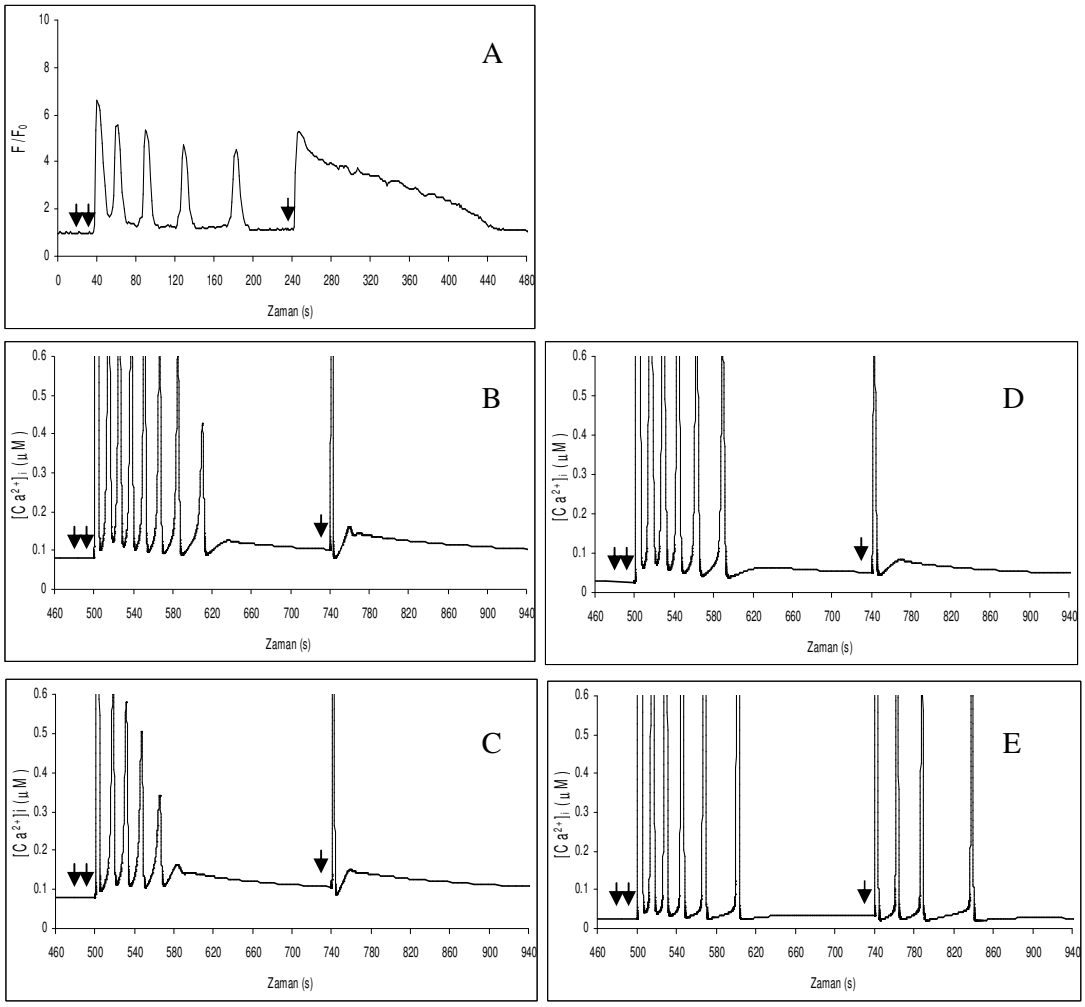
Şekil 4.7. Her bir kombinasyon için üç parametre setinde PMCA blokajı varlığında ve yokluğunda düşük ve yüksek dozda oluşturdukları yanıtlardaki osilasyonlar sayıldı. Simülasyon sonuçlarındaki osilasyon sayıları deney bulguları ile (her bir grafikteki çubuk desenler) ile karşılaştırıldı. **A.** 10^{-6} M ACh ve düşük doz IP_3 uyarısı (0,5 µM) ile oluşan osilasyonların sayıları. Belirtilen ER ve sitozolik [Ca^{2+}] başlangıç koşuluna sahip modellerin çözümü ile elde edilen osilasyonların PMCA blokajı varlığında ve yokluğundaki sayıları. **Koyu mavi çubuk;** La^{3+} yokken ve **açık mavi çubuk;** La^{3+} varlığında 10^{-6} M ACh uyarısı ile deneysel olarak gözlenmiş osilasyonların sayıları. **B.** 10^{-4} M ACh ve yüksek doz IP_3 uyarısı (10 µM) için osilasyon sayıları. Model çözümlerinde elde edilen osilasyonların PMCA blokajı varlığında ve yokluğundaki sayıları. **Koyu kırmızı çubuk;** La^{3+} yokken ve **pembe çubuk;** La^{3+} varlığında 10^{-4} M ACh uyarısı ile deneysel olarak gözlenmiş osilasyon sayıları.

Ancak model çözümlerinde PMCA blokajı sonucu elde edilen yanıt süreleri değişiklikleri düşük doz ACh (10^{-6} M) uyarısı için deneysel gözlemlerle tutarlı iken (Şekil 4.8.A) yüksek doz ACh (10^{-4} M) uyarısı için deneysel gözlemlerle uyumlu değildir. Deneysel olarak gözlemlenen La^{3+} varlığında yanıtların uzaması fenomeni model çözümlerinde görülmemektedir (Şekil 4.8.B).



Şekil 4.8. PMCA blokajı varlığında ve yokluğunda düşük ve yüksek dozda oluşturdukları yanıtların süreleri her bir parametre seti için ölçüldü. Simülasyon sonuçlarındaki süreler deney bulgusu ile karşılaştırıldı (her bir grafikteki çubuk desenler). **A.** 10^{-6} M ACh ve düşük doz IP_3 uyarısı (0.5 µM) ile oluşan yanıt süreleri. Belirtilen ER ve sitozolik $[Ca^{2+}]$ başlangıç koşuluna sahip modellerin çözümü ile elde edilen yanıtların PMCA blokajı varlığında ve yokluğundaki süreleri. **Koyu mavi çubuk;** La^{3+} yokken ve **açık mavi çubuk**; La^{3+} varlığında 10^{-6} M ACh uyarısı ile deneysel olarak gözlenmiş yanıt süreleri. **B.** 10^{-4} M ACh ve yüksek doz IP_3 uyarısı (10 µM) için yanıt süreleri. Model çözümlerinde elde edilen cevapların PMCA blokajı varlığında ve yokluğundaki süreleri. **Koyu kırmızı çubuk;** La^{3+} yokken ve **pembe çubuk;** La^{3+} varlığında 10^{-4} M ACh uyarısı ile deneysel olarak gözlenmiş yanıt süreleri.

PMCA blokajının kuantal salınıma etkisi de incelendi (Şekil 4.9). La^{3+} varlığında birinci ACh (10^{-4} M) uyarısını takiben uygulanan ikinci (10^{-4} M) ACh'e yanıtlarda osilasyonların ortadan kalktığı ve yanıtın uzadığı deneylerde gözlemlenirken, model çözümlerinden hiç biri bu deneysel gözleme benzer bir sonuç vermedi.

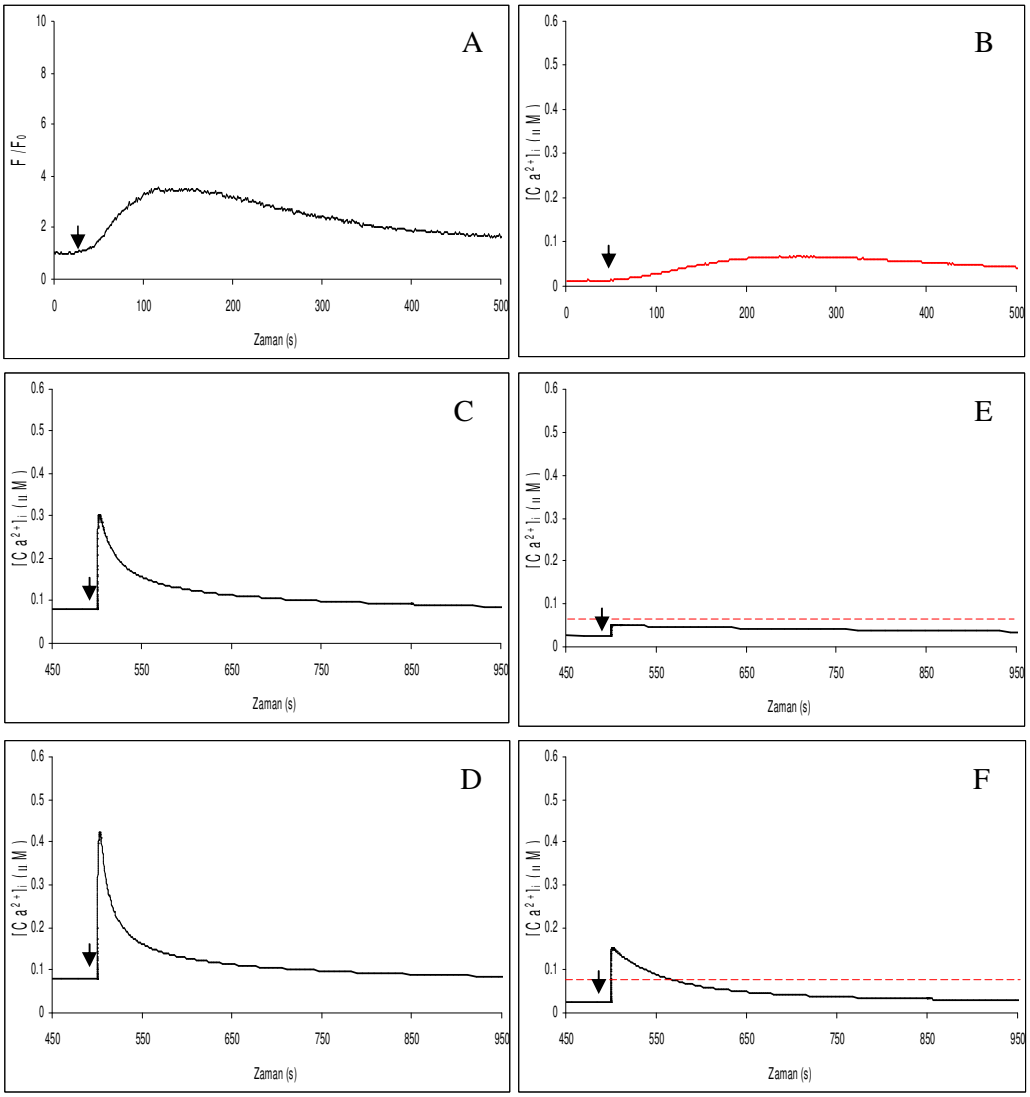


Şekil 4.9. PMCA blokajının kuantal salınıma etkisi. A. Tek bir HEK 293 hücresine 1 mM La^{3+} varlığında önce 10^{-6} M ACh daha sonra da 10^{-4} M ACh uygulaması ile gözlenen yanıt. **B.** 500_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda PMCA blokajı ve önce 0,5 µM, sonrasında 10 µM IP_3 uyarısı yapılmış simülasyon sonuçları. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir.

Othmer-Tang modelinde (Tang ve ark., 1996) özellikle belirtilmemiş olsa da SERCA ile sızıntı arasında zorunlu bir bağlantı vardır. Bunun nedeni SERCA'nın, depo konsantrasyonundan bağımsız olarak Ca^{2+}'u ER'ye taşıması halinde sitoplazmik Ca^{2+} derişiminin sıfıra gitmesi ya da sürekli artması gerekliliğidir. Gerek pompanın kullandığı kimyasal enerjinin (ATP hidrolizi) sınırlı oluşu, gerekse deneysel ölçümlerde sitozolik $[Ca^{2+}]$ herhangi bir uyarı olmadığında sabit kalırken bir SERCA inhibitörü verildiğinde sitoplazmik $[Ca^{2+}]$'da bir artışın gözlenmesi SERCA ile ER arasında mekanizması bilinmese de bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle biz de bu bağlantıyı modelimiz içine olabilecek en basit açıklamayla yerleştirdik:

$P_{leak} = (J_{SERCA}+J_{PMCA}) / (Ca_{ER_ini}-Ca_{i_ini})$;
$J_{leak} = P_{leak} * (Ca_{ER} - Ca_i)$;

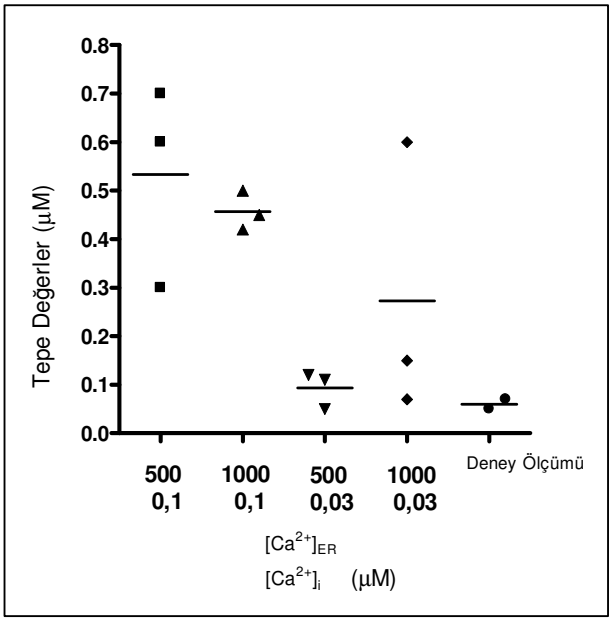
Othmer-Tang modelinde (Tang ve ark., 1996) sızıntı katsayısı başlangıç koşullarındaki $[Ca^{2+}]_{ER}$'ye (Ca_{ER_ini}), $[Ca^{2+}]_i$'a (Ca_{i_ini}) ve SERCA (J_{SERCA}) ve PMCA'nın (J_{PMCA}) neden olduğu akılara bağlı seçilmelidir. Modelde hücrenin dinlenim durumuna karşılık gelen kararlı durumda SERCA'nın neden olduğu akı yavaşlatıldığında çözümlerde yukarıdaki açıklamadan bekleneceği gibi bir sitozolik $[Ca^{2+}]$ artışı gözlendi. Bu durum gerçek hücrelere dinlenim durumda CPA verilerek deneysel olarak taklit edildiğinde bir $[Ca^{2+}]_i$ artışı deneysel olarak da gözlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Tek başına SERCA blokajı. A. Tek bir HEK 293 hücrelerinde 20 µM CPA uygulaması ile gerçekleştirilen SERCA blokajı sonrası gözlenen yanıt. **B.** Aynı hücrelerde 20 µM CPA uygulaması için kalibre $[Ca^{2+}]_i$ ölçüm sonuçları. **C.** 500_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 1000_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 500_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **F.** 1000_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda SERCA blokajı. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. **Kırmızı kesikli çizgiler;** CPA uygulaması ile oluşan konsantrasyon değişikliklerinin tepe değerlerini göstermektedir.

Deney bulgusunda CPA uygulaması sonrası $[Ca^{2+}]_i$ yavaşça artarken (Şekil 4.10.A ve B), simülasyon sonuçlarında SERCA inhibisyonunun $[Ca^{2+}]_i$'de ani bir artışa neden olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.10.C-F). Model çözümlerinden elde edilen ve SERCA inhibisyonu sonucu oluşan $[Ca^{2+}]_i$ artışının tepe değeri gözlemlerimizle karşılaştırıldığında; dinlenim sitozolik $[Ca^{2+}]_i$ değerleri 0,03 µM seçilen modellerin sonuçları (Şekil 10.E ve F) 0,1 µM seçilenler ile karşılaştırıldığında CPA uygulaması

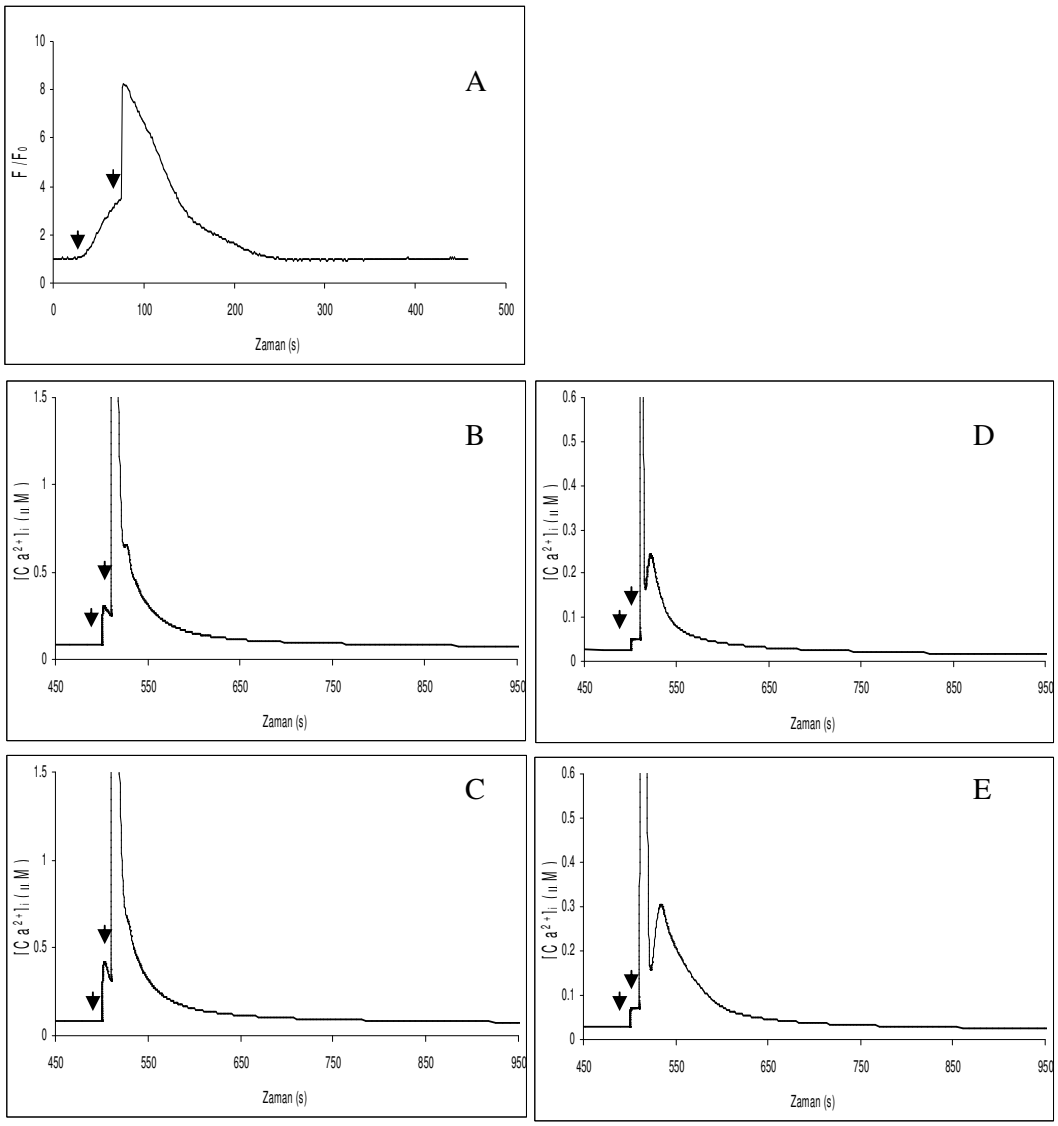
sonrası yapılan deneysel ölçümlere daha yakın olduğu gözlenmiştir. (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



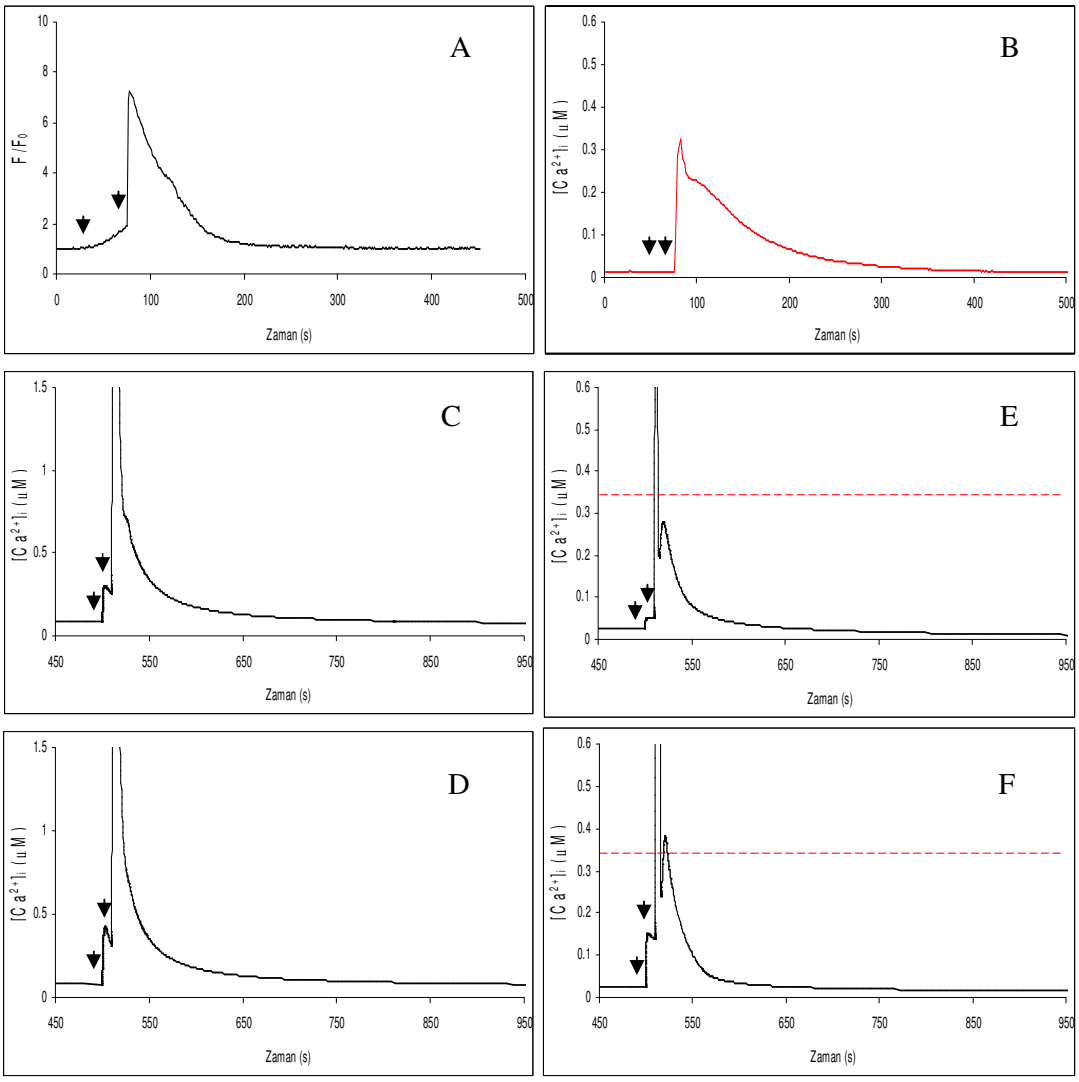
Şekil 4.11. Kararlı durumda yapılan SERCA inhibisyonu ile elde edilen simülasyon sonuçlarının deney bulgusu ile karşılaştırılması. Belirtilen ER ve sitozolik [Ca^{2+}] başlangıç koşuluna sahip modellerde SERCA inhibisyonu sonrası elde edilen tepe değerleri. Deney ölçümü: HEK 293 hücrelerinde CPA uygulaması sonrası ölçülen $[Ca^{2+}]_i$ artışının tepe değeri.

SERCA'nın CPA uygulaması ile inhibisyonu sonucu oluşan $[Ca^{2+}]_i$ artışının deneysel olarak gözlenen kinetiğini modelimizin gösteremiyor olması basitçe SERCA için CPA ile oluşan inhibisyona ait bir kinetiğin modele konmamasına bağlı olabilir. Ancak böyle bir inhibisyon kinetiğinin olup olmadığı ya da parametrelerinin ne olduğu bilinmemektedir.

Yaptığımız deneylerde banyo solüsyonunda CPA'nın varlığı 10^{-6} M ve 10^{-4} M ACh yanıtlarında gördüğümüz osilasyonların tamamen kaybolmasına neden olduğunu gözledik. Bu gözlem SERCA inhibisyonun varlığı sırasında IP_3 uygulamasının yapıldığı model çözümleri ile uyumludur (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). Ancak model çözümlerinde görülen ve IP_3 uygulaması sonucu oluşan ani ve çok yüksek $[Ca^{2+}]_i$ artışları deneysel gözlemlerle uyuşmamaktadır. Bu fark daha önce de tartışıldığı gibi $[Ca^{2+}]_i$ tamponlama sistemlerinin modelde yer almamasına bağlı olabilir.



Şekil 4.12. SERCA blokajı ve ardından düşük doz agonist uygulaması. A. Tek bir HEK 293 hücresinde 20 µM CPA uygulaması ile gerçekleştirilen SERCA blokajı ve ardından 10^{-6} M ACh uygulaması ile ölçülen yanıtlar. **B.** 500_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda önce SERCA blokajı ve hemen ardından 0,5 µM IP_3 uygulaması ile yapılan model çözümleri. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir.



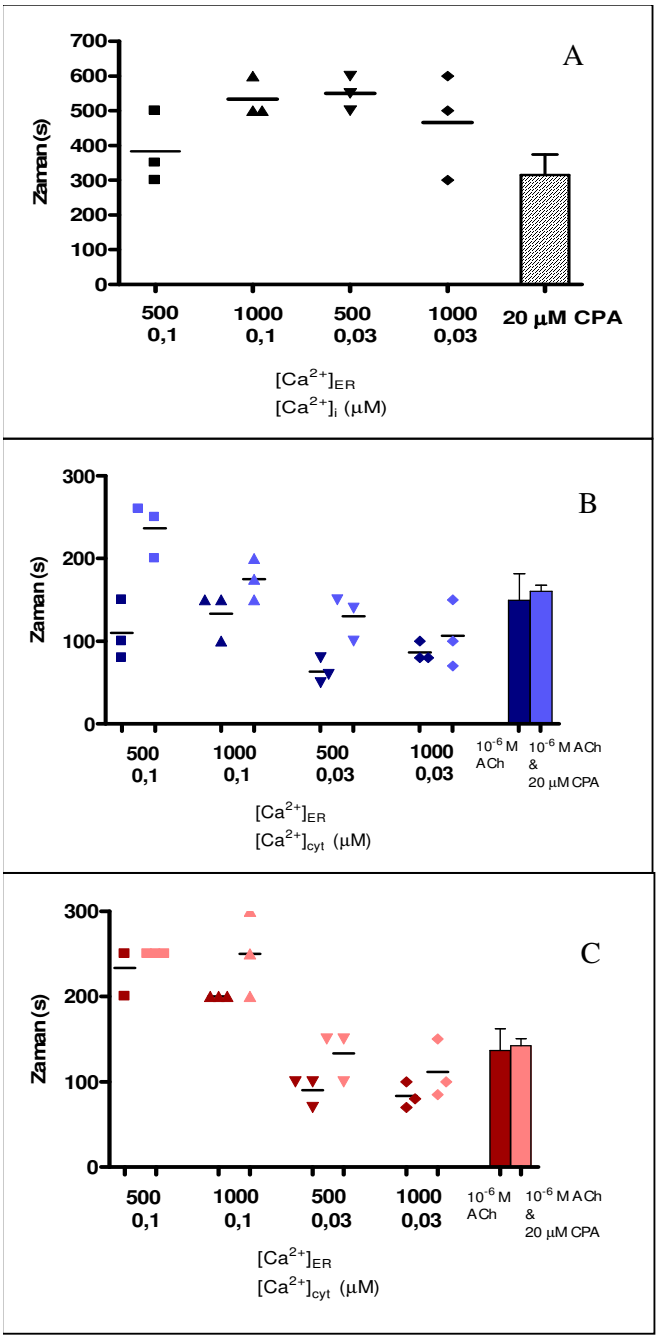
Şekil 4.13. SERCA blokajı ve ardından yüksek doz agonist uygulaması. A. Tek bir HEK 293 hücresinde 20 µM CPA uygulaması ile SERCA blokajının gerçekleştirilmesi ardından 10^{-4} M ACh uygulanması ile ölçülen yanıt. **B.** 20 µM CPA ve ardından 10^{-4} M ACh uygulaması için kalibre $[Ca^{2+}]_i$ ölçümleri. **C.** 500_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 1000_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 500_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **F.** 1000_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşullarına sahip modellerde önce SERCA blokajı ve hemen ardından 0,5 µM IP_3 uygulaması ile elde edilen çözümler. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir. **Kırmızı kesikli çizgiler;** kalibre ölçümümüzde CPA ve ardından 10^{-4} M ACh uygulaması için elde edilen tepe değerlerin ortalamasını göstermektedir.

Hajnoczky ve Thomas (1997) permeabilize hepatositlerde yaptıkları deneylerde sabit IP_3 uyarısı altındaki IP_3R'nün $[Ca^{2+}]_i$ tarafından geri-beslemeli düzenlenmesinin osilasyon karakterli Ca^{2+} salınımı için minimum düzeyde gerekli olduğunu söylemişlerdir. Onlara göre kararlı durum ile pikler arasındaki dönemde IP_3R inaktive değildir ve IP_3'e düşük afinitelidir. Ancak $[Ca^{2+}]_i$ artmaya başladıkça IP_3'e

yüksek afinite ile bağlanır ve kanal açılmaya başladıkça reseptör zamana bağlı inaktivasyona uğrar. Ca^{2+} osilasyonlarını açıklamaya yönelik diğer hipotezler ise, IP_3 üretiminin sabit olmadığı, hücre içi IP_3 üretimini düzenleyen pozitif ve negatif geri besleme mekanizmalarının osilasyonlara neden olduğu (PLC' nin enzim aktivitesi $[Ca^{2+}]_i$ > 100 nM olması ile pozitif olarak düzenlenlenir. PLC aktivasyonu PKC aktivasyonunu indükleyerek IP_3 oluşumunu agonist reseptör veya PLC aktivitesi üzerinden inhibe eder) öne sürülmüştür (Iino, 2010).

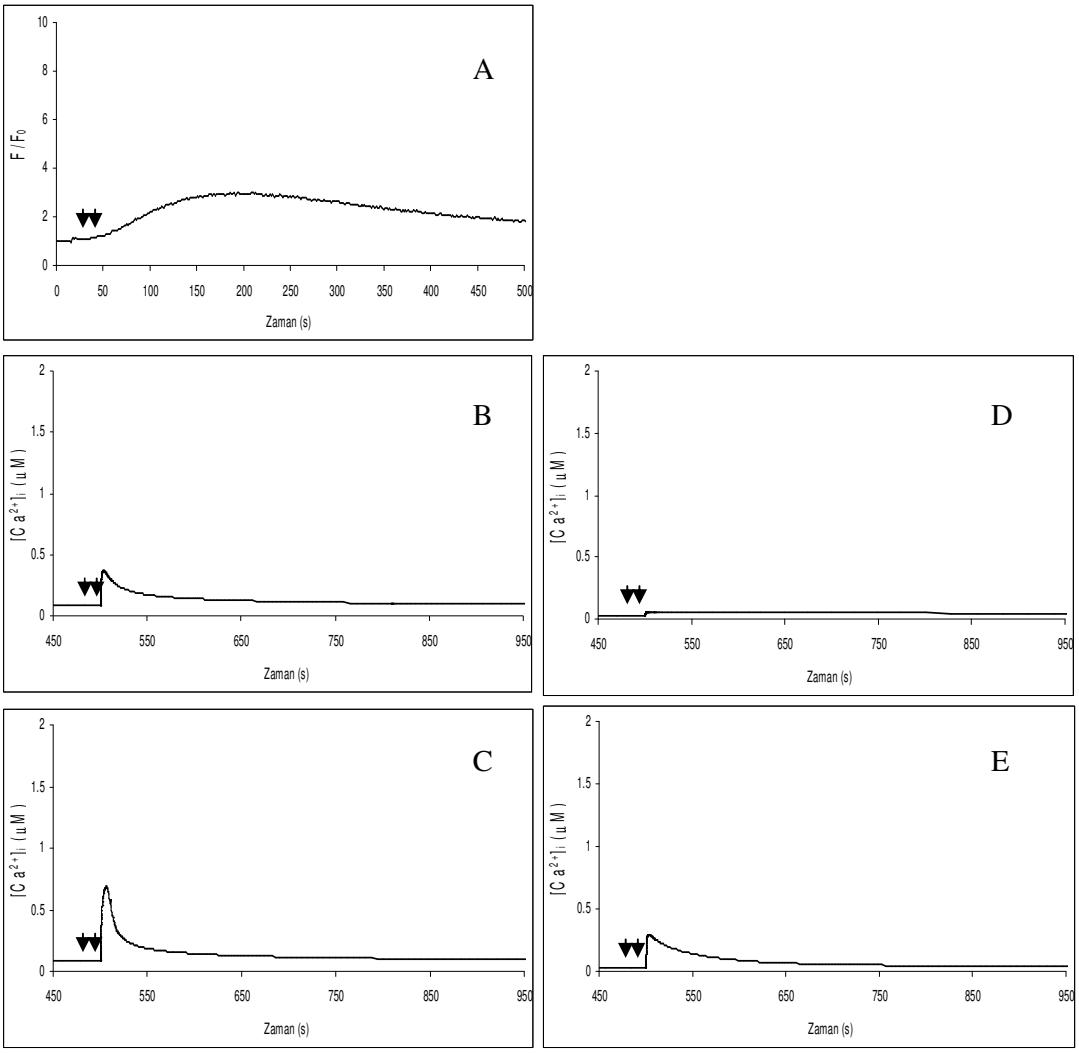
Ayrıca mitokondrinin Ca^{2+} tamponlayabilen bir organel olması, bu zamansal ve uzaysal dinamiklerin açıklanmasında öne çıkmıştır (Ishii ve ark., 2006). Kendi deneysel bulgularımızda, ACh uyarısı sonucu oluşan $[Ca^{2+}]_i$ osilasyonlarını CPA uygulamasının durdurması, osilasyonlarının $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ arasında SERCA tarafından düzenlenen bir dengeyle sağlanabileceğini düşündürdü. Reseptörün zamana bağlı inhibisyona uğramadığı basit bir tüm hücre matematik modeli kullanarak bu durumu tekrarlayabildik.

HEK 293 hücrelerinden elde edilen deney sonuçlarında tek başına SERCA blokajı $[Ca^{2+}]_i$'nin uzun süre yüksek kalmasına neden olurken, blokaj ile birlikte ACh uygulamasının yanıt sürelerini kısalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.14.A ile B ve C'yi karşılaştırınız). Sadece CPA uygulaması ile 300 s süren yanıt ACh uygulaması da yapılınca 150 s civarına düşmektedir. Modellerde SERCA inhibisyonu ile elde edilen çözümlerde elde edilen yanıt süreleri SERCA inhibisyonu üzerine IP_3 uyarısı eklendiğinde benzer bir kısalma göstermişlerdir. Ayrıca SERCA blokajının tek başına uygulanan ACh yanıtlarının sürelerine pek bir etkisi olmadığı deneysel gözlemini de model çözümleri genelde tekrarlayabilmiştir (Şekil 4.14 B ve C).



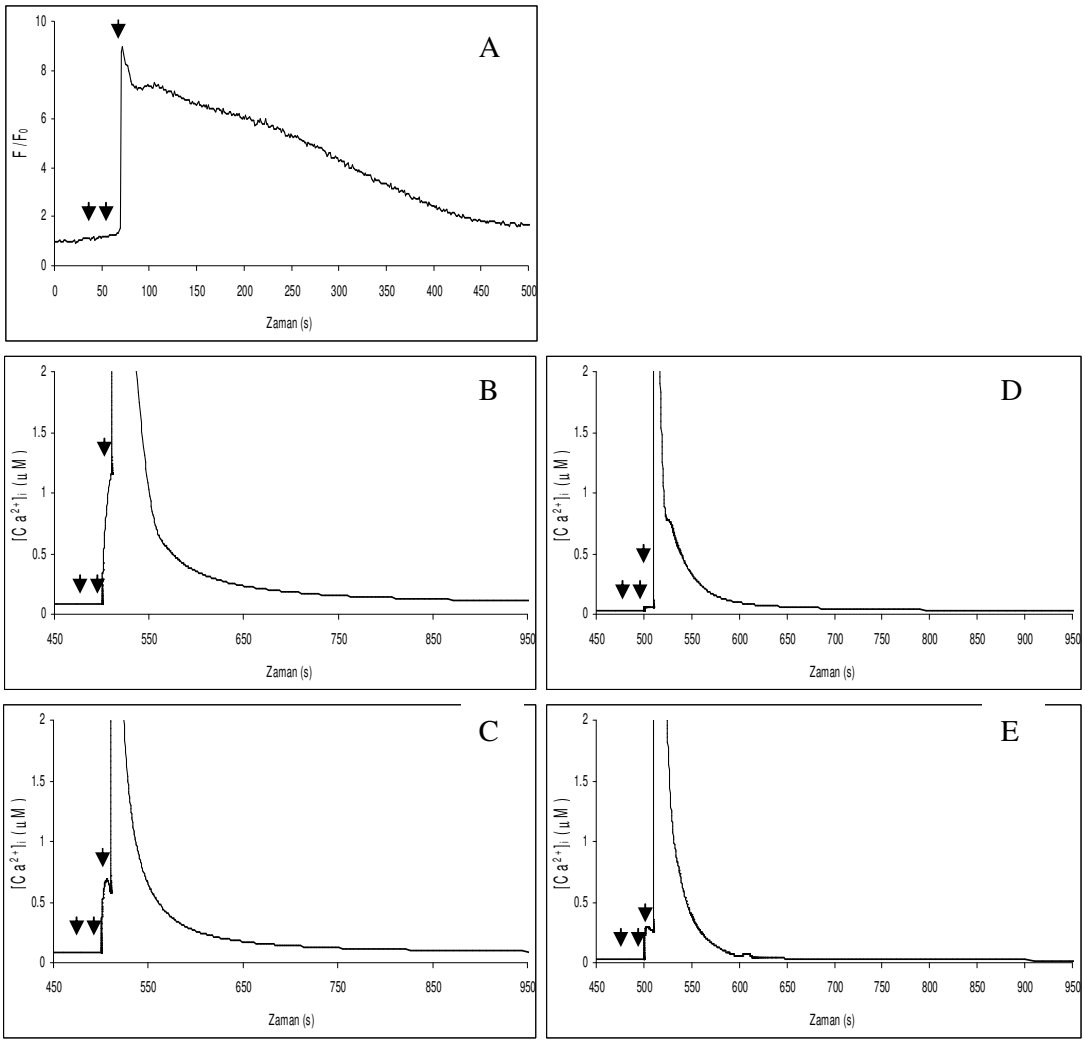
Şekil 4.14. Agonist uyarımının SERCA blokajının yanıt sürelerine etkisi. A. Belirtilen başlangıç değerleri için kararlı durum sırasında SERCA blokajı yapılan model çözümlerindeki yanıt süreleri. (noktalar). Bar CPA uygulaması ardından gözlenen yanıtların ortalama süresini göstermektedir. **B ve C.** SERCA blokajı uygulanmadan veya uygulandıktan sonra ardından 0,5 µM (B) veya 10 µM (C) IP_3 uygulanan model çözümlerindeki yanıt süreleri. **Koyu mavi (kırmızı) noktalar;** yalnız IP_3 uygulaması, **açık mavi (pembe) noktalar;** SERCA blokajı ve ardından IP_3 uygulaması yapılan model çözmlerindeki yanıt sürelerini göstermektedir. **Koyu mavi (kırmızı) çubuklar;** sadece ACh uygulaması, **açık mavi (pembe) çubuklar;** CPA uygulamasından sonra ACh uygulaması yapılan deneylerde ölçülen sürelerin ortalama değerlerini göstermektedir.

Model sonuçları her iki pompanın birlikte inhibe edildiği deney sonuçları ile de karşılaştırıldı. HEK 293 hücrelerinde CPA uygulaması ile SERCA'nın tek başına bloke edildiği duruma benzer şekilde CPA ve La^{3+} birlikte verilerek her iki pompanın da (SERCA ve PMCA) inhibe edilmesi ile deneysel olarak gözlenen $[Ca^{2+}]_i$ artışının kinetiğini model çözümleri taklit edemedi (Şekil 4.15). Ancak deneysel gözlemlerle uyumlu olarak model çözümlerinde de sadece SERCA blokajına kıyasla her iki pompanın blokajı $[Ca^{2+}]_i$ yanıtının tepe değerini daha fazla arttırmamıştır.



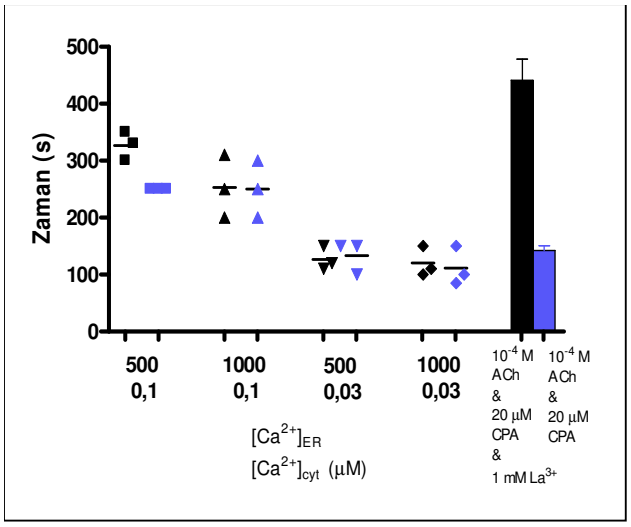
Şekil 4.15. SERCA ve PMCA'nın birlikte blokajı. A. Tek bir HEK 293 hücresinde 20 µM CPA ve sonrasında 1 mM La^{3+} uygulaması ile SERCA ve PMCA blokajı gerçekleştirilmesi ile ölçülen yanıt. **B.** 500_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşullarında SERCA ve PMCA'nın beraber bloke edildiği model çözümleri.

HEK 293 hücrelerinde CPA ve La^{3+} varlığında her iki pompa bloke durumdayken hücrelere ACh (10^{-4} M) uygulandığında, Ca^{2+} yanıtında bir plato fazı gözlenmiştir (Şekil 4.16.A) model çözümlerinde ise böyle bir plato elde edilememiştir (Şekil 4.16.B-E).



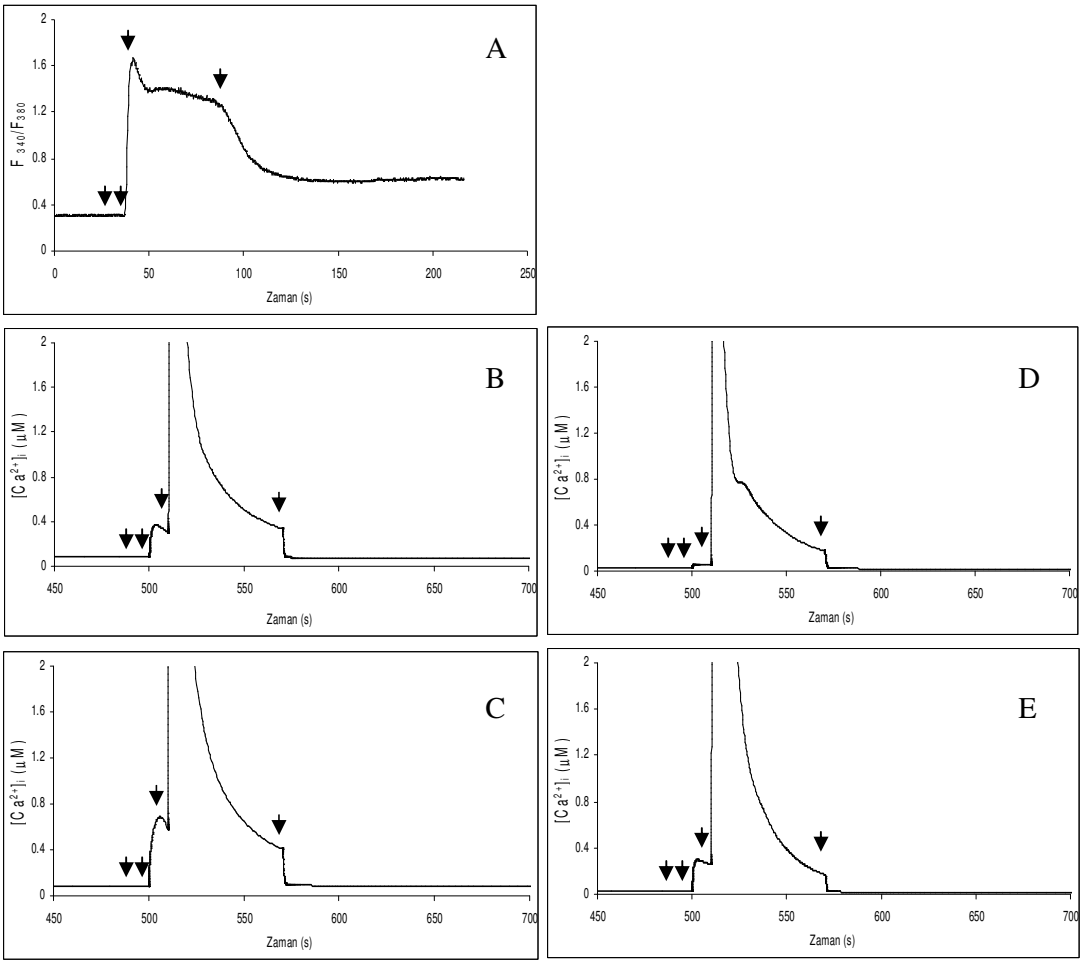
Şekil 4.16. SERCA ve PMCA'nın birlikte blokajının ardından yüksek doz agonist uygulaması. A. Tek bir HEK 293 hücresinde 20 µM CPA ile birlikte 1 mM La^{3+} uygulaması ile SERCA ve PMCA blokajı gerçekleştirildikten sonra hücreye 10^{-4} M ACh uygulaması ile ölçülen yanıt **B.** 500_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 µM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşullarında SERCA ve PMCA'nın beraber bloke edildiği ve ardından ve 10 µM IP_3 uygulamasının yapıldığı model çözümleri. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir.

HEK-293 hücrelerinde yapılan deneysel ölçümlerde CPA ile birlikte La^{3+} uygulanması ardından uygulanan ACh yanıtının süresi sadece CPA uygulaması ile SERCA blokajı yapılan ACh yanıtlarına göre belirgin şekilde uzatmıştır. Ancak model çözümlerimiz bu bulguyu tekrarlayamamıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Yüksek doz agonist uyarısı ile birlikte SERCA blokajının yanıt süresine PMCA blokajının etkisi. Belirtilen başlangıç değereri için SERCA ve PMCA blokajı yapıldıktan sonra 10 µM IP_3 uygulaması (**siyah noktalar**) veya yalnızca SERCA blokajı arkasından 10 µM IP_3 uygulaması yapılan (**mavi noktalar**) model çözümlerinden elde edilen yanıt süreleri. **Siyah çubuk;** CPA ve La^{3+} uygulaması ardından ACh (10^{-4} M) uyarısı ile oluşan yanıtlar için deneysel olarak ölçülen süreler. **Mavi çubuk;** sadece CPA uygulaması ardından ACh (10^{-4} M) uyarısı ile oluşan yanıtlar için ölçülen süreler.

HEK-293 hücrelerine La^{3+} ve CPA'nın beraber uygulandığı ve her iki pompanın bloke olduğu durumda uygulanan ACh'ın (10^{-4} M) bir müddet sonra perfüzyon ile ortamdan uzaklaştırılması ile plato fazında yüksek seyreden $[Ca^{2+}]_i$ un hızla azaldığını gözledik (Şekil 4.18.A). Model çözümleri IP_3 uyarısının kesilmesi ile benzer bir azalma göstermişlerdir (Şekil 4.18.B-E). Deney bulgusunda ACh'nin uzaklaştırılmasıyla $[Ca^{2+}]_i$ başlangıca göre daha yüksek yeni bir dengeye gelirken, model sonuçlarında IP_3 uyarısının kesilmesi $[Ca^{2+}]_i$'nin başlangıç seviyesine dönmesine neden olmuştur.



Şekil 4.18. SERCA ve PMCA'nın birlikte blokajı, ardından 10^{-4}M ACh uygulaması ve son olarak ACh'nin banyo solüsyonundan perfüzyonla uzaklaştırılması. A. Bir grup HEK 293 hücresinde 20 μM CPA ile birlikte 1 mM La^{3+} uygulaması ile SERCA ve PMCA blokajı yapıldıktan sonra hücreye 10^{-4} M ACh uygulanarak ölçülen ortalama yanıt. Bir süre sonra ACh ortamdan yıkanarak uzaklaştırılmıştır. **B.** 500_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **C.** 1000_0,1 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **D.** 500_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$, **E.** 1000_0,03 μM $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ başlangıç koşulunda SERCA ve PMCA blokajı üstüne 10 μM IP_3 uygulanması yapılan ve bir süre sonra IP_3 uygulamasının kesildiği model çözümleri. Uygulama zamanları okla belirtilmiştir.

Bir tüm hücre modelinde sistemdeki bileşenlerin hücre içi Ca^{2+} dinamiğine etkisi doğrusallıktan uzak bir şekilde olur. Böyle bir sistemin genel davranışını açıklamak için sistemdeki elemanların bütüne olan etkilerinin doğru bir şekilde ortaya çıkarılması gerekir. IP_3R'ü tüm sistemin çekirdeğini oluşturur. Bu nedenle nasıl çalıştığının tam olarak kavranması önemlidir. Reseptörün aktivitesinin hem Ca^{2+} hem de IP_3 tarafından düzenlenmesi reseptör davranışının kavranmasını zorlaştırmaktadır. İntakt hücrede reseptör hakkında ancak dolaylı bilgi veren deneyler yapılabildiğinden reseptörün Ca^{2+} dinamiğine etkisi matematik modeller üzerinden anlaşılmaya çalışılmıştır. Literatürde IP_3R'ünü açıklamaya yönelik çok çeşitli modeller mevcuttur. Bu modellerden Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) modeli reseptöre Ca^{2+}'un aktive edici bölgeye, IP_3'ün aktive edici kendi bölgesine ve Ca^{2+}'un inhibe edici bölgeye sıralı bir şekilde bağlanmasını öngörür. Bu modelde reseptöre deneysel olarak kanıtlanmamış her hangi bir durum (state) eklenmemiştir. Ancak bazı çalışmalar reseptörün zamana bağlı inaktive olduğu durumları da modele eklemiştir (Sneyd ve Dufour, 2002). Biz bu çalışmada, deneysel olarak kesinlik kazanmamış bir reseptör durumu (state) içermeyen IP_3R modeli olan Othmer-Tang'ı (Tang ve ark., 1996) kullandık. Hücre içi Ca^{2+} dinamiğindeki diğer belli başlı oyuncular SERCA, PMCA ve ER'den sitoplazmaya doğru olan sızıntının neden olacağı akılar da modele Othmer-Tang modelinin (Tang ve ark., 1996) önerdiği şekilde eklendi. IP_3R'den ve sızıntıdan olacak akı hesaplarına ER ve sitoplazma kompartmanları arasındaki Ca^{2+} derişim farkı da eklendi. Dolayısıyla akıların ER ve sitoplazma arasındaki Ca^{2+} derişim farkından doğrudan etkilenmesi sağlandı. ER hacmi ile sitoplazma hacmi arasındaki farkın akıların derişimlere olan etkisine nasıl yansıyacağını da, iki hacmin birbirine oranı belirledi. Bu parametre bir anlamda bu iki kompartmandaki doğrusal tamponların Ca^{2+} depolama kapasitesini belirleyen bir parametre olarak da düşünülebilir. Bu şekilde düzenlenen bir tüm hücre modelini kullanarak agonist uyarısı sonucu oluşan sitoplazmik Ca^{2+} dinamiğini ve oyuncularının rollerini anlamaya çalıştık.

Deneysel olarak gözlemlenen PMCA'nın tek başına blokajının $[Ca^{2+}]_i$ temel seviyesini etkilememesi (Şekil 3.7), dinlenim durumunda PMCA'nın aktif rol almadığını göstermektedir. Zaten PMCA'nın ölçülen Kd değerin 0.2 μM (Camello

ve ark, 1996) civarında olması da bunu göstermektedir. Agonist uyarısı ile birlikte yapılan PMCA inhibisyonunun düşük doz ACh (10^{-6} M) yanıtlarında önemli bir etkisi olmadığı gözlenirken, yüksek doz ACh (10^{-4} M) yanıtlarında sığ osilasyonların sayısının önemli miktarda artmasına sebep oldu (Şekil 3.9). Bu sonuçlar model çözümlerimizde de tekrarlandı (Şekil 4.7). Her iki pompanın birlikte bloke edildiği durumda ACh uygulaması sürerken yüksek kalan hücre içi Ca^{2+}'un ACh'nin ortamdan uzaklaştırılması ile hızla düşmesi (Şekil 4.18) Ca^{2+} yanıtının devam eden agonist ve IP_3 uyarısına rağmen sonlanmasının (ve dolayısı ile kuantal yanıtın) iddia edildiği gibi reseptörün adaptif davranış gösterip kapanmasından daha çok bizim modelimizde olduğu gibi tüm sistemin yeni bir durum alması olduğunu düşündürmektedir.

Modelin görece az parametre sayısı ile bu sistem elemanlarının davranışlarını kabaca açıklayabiliyor olması, intakt hücrede agonist uyarısı ile oluşan Ca^{2+} yanıtlarının dinamiğinin IP_3R'ne ait karmaşık bir yapı önermeye gerek duymadan, bilinen bileşenlerden oluşan bir tüm hücre modeli tarafından ana hatları ile ve kuantal salınım gibi temel özellikleri ile taklit edilebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte model gözlenen bazı fenomenleri ve özellikle de yanıt kinetiklerinin detaylarını açıklamak konusunda yetersiz görünmektedir. Sitozolde ve ER'de bulunan Ca^{2+} bağlayan ve tampon görevi gören proteinler ve mitokondri gibi Ca^{2+}'u tamponlayan yapıların önemi yadsınamaz. Dolayısı ile bunların modele yerleştirilmesi ile sistem davranışının daha iyi açıklanıp açıklanamayacağı ileride yapılacak model çalışmaları ile araştırılmalıdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada IP_3'ün ER'de kendi reseptörüne bağlanması sonucu sitoplazmaya salınan Ca^{2+}'un gösterdiği karmaşık zamansal yanıt desenlerinin olası nedenleri anlaşılmaya çalışılmıştır. IP_3 aracılı Ca^{2+} salınımında, başlıca oyuncular olan IP_3R, SERCA ve PMCA'nın bu yanıt desenlerinin oluşmasındaki rolleri bu yapıların deneysel olarak pertürbe edilmesiyle incelenmiş ve bu pertürbasyonlar sonrasında sistemin genel davranış özelliğinin belirlenmesine çalışılmıştır. Daha sonra basit bir tüm hücre matematiksel modeli olan Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) kullanılarak bu davranış özellikleri taklit edilmeye çalışılmıştır.

Literatürde, agonist uyarısı ile birlikte Ca^{2+}'un sitoplazmaya osilasyon yaparak salınımına neden olarak, reseptörün zamana bağlı inaktivasyonu, IP_3 üretiminin osilasyon karakterli olması gibi çeşitli mekanizmalar gösterilmiştir. Bu çalışmada ise Ca^{2+} yanıtının osilasyon karakterli bir rejimde olabilmesinin $[Ca^{2+}]_{ER}$ ve $[Ca^{2+}]_i$ arasındaki dengeden kaynaklanabileceği ve bu dengenin korunmasında da SERCA'nın önemli bir rolü olabileceği dolayısı ile Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) gibi basit bir modelin osilasyonlu yanıtları taklit edebileceği tekrar gösterilmiştir.

Basit bir tüm hücre matematik modeli olan Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) deneysel olarak ispatlanamamış reseptör durum (state) ve alt üniteleri açısından literatürdeki diğer modellere göre oldukça sade bir modeldir. Bu modelin kuantal salınımı taklit edilebilmesi yine Ca^{2+} salınımı sonucu $[Ca^{2+}]_{ER}$ azalması ve SERCA-PMCA akıları ile IP_3R akısı arasında bir dengenin oluşması ile mümkün olabilmektdir. Bu şekilde en az durum (state) ve sistem parametresine sahip bir modelle kuantal salınım gibi karmaşık bir fenomenin açıklanabileceği gösterilmiştir.

Ayrıca deneysel olarak gözlenen PMCA ve SERCA inhibisyonunun etkilerinin de Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) modeli tarafından ve üstelik yukarıda belirtilen

fenomenleri taklit edebilen sistem parametre değerleri kullanılarak bir ölçüde taklit edilebildiği gösterilmiştir.

Bu sonuçlar Othmer-Tang (Tang ve ark., 1996) gibi basit ve bilindik mekanizmalarla çalışan birimlere sahip bir hücre modelinin, tek bir parametre seti kullanılarak kuantal salınım, osilasyonlu yanıtlar ve PMCA, SERCA proteinlerinin inhibisyonu ile ortaya çıkan belirgin kinetik davranış değişiklikleri gibi pek çok farklı deneysel gözlemi taklit edebileceğini dolayısı ile de kullanılan bileşenler için yeni davranış özellikleri tanımlamadan da Ca^{2+} sinyal mekanizmasının bir bütün olarak anlaşılabileceğini gösterebilmektedir.

Kullandığımız matematik model karmaşık Ca^{2+} yanıt desenlerini oluşturan mekanizmaların neler olabileceği hakkında bir fikir vermekte ise de deney bulgularında gözlemlediğimiz kinetik davranışları daha doğru taklit edebilmesi ve de taklit etmekte güçlük çektiği gözlemleri açıklayabilir hale gelebilmesi için tampon proteinlerin ve mitokondri gibi tampon sistemlerin de model içine eklenmesi ve bunların oluşturacağı sonuçlardaki iyileşmenin incelenmesi gerekmektedir.

ÖZET

Farklı Kültür Hücrelerinde Agonist Uyarımı İle Oluşan Ca^{2+} Salınımının İleri Yöntemlerle İncelenmesi

Agonist uyarımı ile ER'den sitoplazmaya salınan Ca^{2+} hücre için bir ikinci haberci görevini üstlenir. Plazma membranında bulunan reseptörün agonisti tarafından aktivasyonu ile birlikte sitozele doğru hidrolize olan IP_3 ER membranı üzerinde bulunan IP_3R'den Ca^{2+} salınımını tetikler. Serbest Ca^{2+} derişiminde oluşan değişiklikler sitoplazmada hücreden hücreye değişen kompleks dinamikler gösterir. Aynı miktardaki uyaran için farklı genlik ve frekanstaki osilasyonlar bu kompleks davranışın yalnızca bir kısmını oluşturur.

Submaksimal agonist konsantrasyonlarında ER'den Ca^{2+}'un yalnızca bir kısmının salınması olarak özetlenebilecek "kuantal" kalsiyum salınımı fenomeni de sistem davranışını anlamayı zorlaştırmaktadır. Üstelik Ca^{2+} depolarının sonlu kapasiteleri ve IP_3R'ü üzerinde CICR gibi pozitif geri besleme mekanizmaların varlığı ilk bakışta bu fenomenin varlığı ile uyuşmamaktadır.

İntakt hücrede $[Ca^{2+}]_{ER}$'yi ve reseptörün kinetik davranışını tam olarak ölçememiz nedeniyle pek çok sistem parametresine sahip bu doğrusallıktan uzak sistemin dinamiğinin (osilasyon, spark, puff , frekans kodlama, vb.) daha iyi kavranabilmesi için deneysel çalışmalara eşlik eden teorik çalışmalara da gereksinim duyulmaktadır.

Bu nedenle biz bu çalışmamızda HEK 293 ve LTK 8 hücrelerinin agonist uyarısı sonrası oluşan Ca^{2+} yanıt desenlerine neden olan oyuncuların rollerini deneysel olarak anlamaya çalıştık. IP_3R dinamiği ve kompartmanlar arasındaki Ca^{2+} değişimleri basit (adi) diferansiyel denklemler halinde yazılarak, bir matematik model kullanılarak sistemin davranışı bir bütün olarak anlaşılmaya çalışılmıştır.

Biz bu tez çalışmamızda, en az duruma (state) sahip basit bir tam hücre matematik modeli olan Othmer-Tang modelini (Tang ve ark., 1996) kullanarak deney bulgularımızı ve bu karmaşık salınım sürecini açıklamanın mümkün olup olmadığını inceledik. Simülasyon sonuçlarımız böyle basit bir modelin bu karmaşık zamansal yanıt desenlerini oluşturan mekanizmanın davranışını açıklayabildiğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: IP_3 aracılı Ca^{2+} salınımı, IP_3 Reseptörü, kuantal Ca^{2+} salınımı, matematik modelleme, osilasyon.

SUMMARY

Investigation of Agonist Induced Ca^{2+} Release with Advanced Methods in Different Cell Lines

Ca^{2+} which is released from ER to cytoplasm by agonist induction plays a second messenger role in cells. Activation of plasma membrane receptors by their agonists induces generation and release of IP_3 to cytoplasm, then IP_3 induce Ca^{2+} release from ER by activating IP3R. Changes at free Ca^{2+} concentrations in cytoplasm shows complex dynamics which is differ from cell to cell. Oscillations with different amplitude and frequency with same stimulus level is only a part of this complex behavior.

The phenomenon of quantal calcium release which can be summarised as partial Ca^{2+} release from ER at submaximal agonist concentrations also makes understanding of system difficult. In addition, despite its finite capacity of Ca^{2+} stores and effect of positive feed back mechanisms like CICR on IP_3R looks like incompetible with existance of this phenomenon.

The difficulties and problems on direct measurements of $[Ca^{2+}]_{ER}$ and kinetic behaviors of receptor in intact cell there is need to make theoretic studies which is complementing experimental studies to understand this multi-parametric non-linear system dynamics (oscillation, spark, puff, frequency encoding).

For this reason, in this study we studied experimentaly the role of players which cause complex Ca^{2+} release patterns after agonist stimulation in HEK 293 and LTK8 cells. We also studied to understand the behavior of system as a whole by writing IP_3R dynamic and Ca^{2+} movement between compartmans as ordinary differential equations. For this reason, we used a mathematical model to make a good similarity to experimental data.

In this thesis, we investigated possibility of explaining our experimental data and this complex release process by using Othmer-Tang model (Tang et al., 1996) which is a simple whole cell mathematical model with minimum states. Our simulation results shows that the mechanism which generate this complex temporal respond patterns can be understood by the use of a simple model like this.

Key Words: IP_3 Induced Ca^{2+} Release, IP_3 Receptor, quantal Ca^{2+} release, mathematical modelling, oscillation.

KAYNAKLAR

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

ATRI A, AMUNDSON, J., CLAPHAM, D., SNEYD, J. (1993). A single-pool model for intracellular calcium oscillations and waves in the Xenopus laevis oocyte. *Biophys J.* **65(4)**:1727-39.

BARRERO, M.J., MONTERO, M., ALVAREZ, J. (1997). Dynamics of [Ca2+] in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study. *J Biol Chem***. 272(44)**:27694-9.

BERRIDGE, M.J., BOOTMAN, M.D., LIPP, P. (1998). Calcium a life and death signal. *Nature.* **395**: 645-648.

BERRIDGE, M.J., BOOTMAN, M.D., RODERICK, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **4**: 517-529.

BOOTMAN, M.D., BERRIDGE, M.J. (1995). The elemental principles of calcium signaling. *Cell*. **83**: 675-678.

BOOTMAN, M.D., MISSIAEN L, PARYS, J.B., DE SMEDT, H., CASTEELS, R. (1995). Control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca2+ release by cytosolic Ca2+. *Biochem J.* **306 (Pt 2)**:445-51.

BOOTMAN, M.D., CHEEK, T.R., MORETON, R.B., BENNETT, D.L., BERRIDGE, M. J. (1994). Smoothly graded Ca2+ release from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca2+ stores. *J Biol Chem*. **269**: 24783-24791.

BOOTMAN, M.D., TAYLOR, C.W., BERRIDGE, M.J. (1992). The thiol reagent, thimerosal, evokes Ca2+ spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem*. **267**: 25113-25119.

BURDAKOV, D., PETERSEN, O.H., VERKHRATSKY, A. (2005). Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. *Cell Calcium*. **38**: 303-310.

CAMELLO, C., LOMAX, R., PETERSEN, O.H., TEPIKIN, A.V. (2002). Calcium leak from intracellular stores the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium*. **32**: 355-361.

CHEEK, T.R., MORETON, R.B., BERRIDGE, M.J., STAUDERMAN, K.A., MURAWSKY, M.M., BOOTMAN, M.D. (1993). Quantal Ca2+ release from caffeine-sensitive stores in adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem*. **268**: 27076-27083.

COMBETTES, L., CLARET, M., CHAMPEIL, P. (1992). Do submaximal InsP3 concentrations only induce the partial discharge of permeabilized hepatocyte calcium pools because of the concomitant reduction of intraluminal Ca2+ concentration? *FEBS Lett*. **301**: 287-290.

DAWSON, A.P., LEA, E.J., IRVINE, R.F. (2003). Kinetic model of the inositol trisphosphate receptor that shows both steady-state and quantal patterns of Ca2+ release from intracellular stores. *Biochem. J.* **370**: 621-629.

DE YOUNG GW, KEIZER J. (1992). A Single-Pool Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Receptor-Based Model For Agonist-Stimulated Oscillations In Ca2+ Concentration. *Proc Natl Acad Sci*. **89(20)**:9895-9.

DOLMETSCH, R.E., LEWIS, R.S., GOODNOW, C.C., HEALY, J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca2+ response amplitude and duration. *Nature*. **386**: 855-858.

DUFOUR, J.F., ARIAS, I.M., TURNER, T.J. (1997). Inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium regulate the calcium channel function of the hepatic inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem*. **272**: 2675-2681.

EHRLICH, B.E., BEZPROZVANNY, I. (1994). Intracellular calcium release channels. *Chin J Physiol.* **37(1)**:1-7

FALCKE, M. (2004). Reading the patterns in living cells - the physics of Ca2+ Signaling. *Advances in Physics*, **53:3**, 255 – 440.

FALCKE, M., THUL, R. (2004). Stability of membrane bound reactions. *Phys. Rev. Lett.* **93**:188103.

FERRIS, C.D., CAMERON, A.M., HUGANIR, R.L., SNYDER, S.H. (1992). Quantal calcium release by purified reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Nature* **356**: 350-352.

GOLOVINA, V.A., BLAUSTEIN, M.P. (1997). Spatially and functionally distinct Ca2+ stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science*. **275**: 1643-1648.

GYÖRKE S, FILL M. (1993) Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca(2+)-induced Ca2+ release in heart. *Science.* **260(5109)**:807-9.

GRYNKIEWİCZ G, POENIE M, TSIEN RY. (1985). A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. **260(6)**:3440-50.

HAGAR, R.E., BURGSTAHLER, A.D., NATHANSON, M.H., EHRLİCH, B.E. (1998). Type III InsP3 receptor channel stays open in the presence of increased calcium. *Nature*. **396**: 81-84.

HAJNÓCZKY, G., THOMAS, A.P. (1997). Minimal requirements for calcium oscillations driven by the IP3 receptor. *EMBO. J.* **16**: 3533-3543.

IINO, M. (2010). Spatiotemporal dynamics of Ca^{2+} signaling and its physiological roles. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci*. **86**: 244-56.

IRVINE, R.F. (1990). 'Quantal' Ca2+ release and the control of Ca2+ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett.* **263**: 5-9.

ISHII, K., HIROSE, K., IINO, M. (2006). Ca^{2+} shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca2+ oscillations. *EMBO. Rep*. **7**: 390-396.

KOIZUMI, M., KERR, J.N., SOUKUP, G.A., BREAKER, R.R. (1999). Allosteric ribozymes sensitive to the second messengers cAMP and cGMP. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **42**: 275-276.

MAK, D.O., MCBRIDE, S., FOSKETT, J.K. (1998). Inositol 1,4,5-trisphosphate [correction of tris-phosphate] activation of inositol trisphosphate [correction of tris-phosphate] receptor Ca2+ channel by ligand tuning of Ca2+ inhibition. *Proc Natl Acad Sci* **95(26)**:15821-5

MARCHANT, J., CALLAMARAS, N., PARKER, I. (1999). Initiation of IP(3)-mediated Ca(2+) waves in Xenopus oocytes. *EMBO J.* **18**: 5285-5299.

MEYER, T., STRYER, L. (1990). Transient calcium release induced by successive increments of inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 3841-3845.

MEYER T., WENSEL T., STRYER L. (1990). Kinetics of calcium channel opening by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochemistry*. **29**: 32-7.

MUALLEM, S., PANDOL, S.J., BEEKER, T.G. (1989). Modulation of agonist-activated calcium influx by extracellular pH in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol*. **257**: G917-G924.

OLDERSHAW, K.A., NUNN, D.L., TAYLOR, C.W. (1991). Quantal Ca2+ mobilization stimulated by inositol 1,4,5-trisphosphate in permeabilized hepatocytes. *Biochem. J.* **278**: 705-708.

PENNER, R., NEHER, E. (1988). The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non-excitable cells. *J. Exp. Biol*. **139**: 329-345.

ROBB-GASPERS, L.D., THOMAS, A.P. (1995). Coordination of Ca^{2+} signaling by intercellular propagation of Ca2+ waves in the intact liver. *J. Biol. Chem*. **270**: 8102-8107.

ROONEY, T.A., SASS, E.J., THOMAS, A.P. (1989). Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem*. **264**: 17131-17141.

SALAZAR, C., POLITI, A.Z., HÖFER, T. (2008). Decoding of calcium oscillations by phosphorylation cycles: analytic results. *Biophys. J*. **94**: 1203-1215.

SEIDLER, N.W., JONA, I., VEGH, M., MARTONOSI, A. (1989). Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem*. **264**: 17816-17823.

SHMIGOL, A., SVICHAR, N., KOSTYUK, P., VERKHRATSKY, A. (1996). Gradual caffeine- induced Ca2+ release in mouse dorsal root ganglion neurons is controlled by cytoplasmic and luminal Ca2+. *Neuroscience*. **73(4)**:1061-7.

SKUPIN, A., FALCKE, M. (2007). Statistical properties and information content of calcium oscillations. *Genome Inform*. **18**: 44-53.

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

SNEYD, J., FALCKE, M. (2005). Models of the inositol trisphosphate receptor. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **89**: 207-245.

STAUFFER, T.P., AHN, S., MEYER, T. (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P2 concentration monitored in living cells. *Curr Biol.* **8(6)**:343-6.

STEENBERGEN, J.M., FAY, F.S. (1996). The quantal nature of calcium release to caffeine in single smooth muscle cells results from activation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *J. Biol. Chem*. **271**:1821-1824.

STERN, M.D. (1996). "Adaptive" Behavior of Ligand-Gated Ion Channels: Constraints by Thermodynamics. *Biophysic. J.* **70**: 2100-2109.

TANIMURA, A., TURNER, R.J. (1996). Inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent oscillations of luminal [Ca2+] in permeabilized HSY cells. *J. Biol. Chem.* **271:** 30904-30908.

TANG, Y., STEPHENSON, J.L., OTHMER, H.G. (1996). Simplification and analysis of models of calcium dynamics based on IP3-sensitive calcium channel kinetics. *Biophys J.* **70(1)**:246-63.

TAYLOR, C.W. (1998). Inositol trisphosphate receptors: Ca2+-modulated intracellular Ca2+ channels. *Biochim. Biophys. Acta.* **1436:** 19-33.

TEPIKIN, A.V. (2001). Calcium Signalling. Second Edition. Oxford University Press.

TERASAKI, M. (1994). Redistribution of cytoplasmic components during germinal vesicle breakdown in starfish oocytes. *J. Cell Sci.* **107:** 1797-1805.

TU, H., WANG, Z., NOSYREVA, E., DE SMEDT, H., BEZPROZVANNY, I. (2005). Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. *Biophys. J.* **88:** 1046-1055.

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

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Figen
Soyadı: Çiçek
Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara _ 28.10.1977
Uyruğu: TC
Medeni durumu: Evli
İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üni. Tıp Fak. Biyofizik Ab.D.
06100 Sıhhiye / ANKARA
312 310 30 10 _ 337

II. Eğitimi

2001 _2003 Yüksek Lisans Eğitimi
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Ab.D.

1995 _ 2000 Gaziantep Üniversitesi Mühendislik Fakültesi

Fizik Mühendisliği (İngilizce)

1988-1995 İstiklal Makzume Anadolu Lisesi İskenderun
(İngilizce)

III. Ünvanları

2000 _ Fizik Mühendisi
2003 _ Bilim Uzmanı

VI. Yayınları:

AMBER-CİCEK F, UGUR O, SAYAR K, UGUR M.

Cell adhesion modulates 5-HT(1D) and P2Y receptor signal trafficking differentially in LTK-8 cells.

Eur J Pharmacol. 2008 Aug 20;590(1-3):12-9

BİLGİNOGLU A, CİCEK FA, UGUR M, GURDAL H, TURAN B. The role of gender differences in beta-adrenergic receptor responsiveness of diabetic rat heart.
Mol Cell Biochem. 2007 Nov;305(1-2):63-9