

TÜBİTAK

2007-540



TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Group

9/ 94817

Vazospazm Gelişiminde Kapasitatif Kalsiyum Girişinin Farmakolojik
ve Moleküler Yaklaşımlarla Kontrolü

Proje No: SBAG 3033 (104S568)

Doç. Dr. Metiner TOSUN
Yard. Doç. Dr. Buket KOSOVA
Arş. Gör. Dr. Yasemin ERAÇ
Arş. Gör. Çiğdem SELLİ

EKİM 2007
İZMİR

Önsöz

Proje büyük oranda TÜBİTAK (SBAG-3033, MT; BİDEB2211, ÇS) ve kısmen Ege Üniversitesi (BAP-06ECZ013) tarafından desteklenmiştir.

Tüm çalışmalar Ege Üniversitesi (Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji ve Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD) laboratuvar olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hücre içi Ca^{+2} ölçümü için gerekli aparatların duyarlı metal aksamalarını özveri ile yapan Dr. Gökhan Gönül'e, hücre kültürü çalışmalarında teknik destek sağlayan Doç. Dr. Kemal S. Korkmaz (E.Ü. Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü) ve Yrd. Doç. Dr. Ceren Korkmaz'a (Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji AD), pSuper vektör sarfları ve teknik yardımları için Yrd. Doç. Dr. Esra Erdal (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD), Yrd. Doç. Dr. Nehir Özdemir'e (Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) ve mikroemülsiyon formülasyonu için Doç. Dr. Yeşim Karasulu'ya (Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji AD) teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	4
TABLO LİSTESİ.....	7
FOTOĞRAF LİSTESİ.....	8
KISALTMALAR.....	9
1- ÖZET.....	14
2- ABSTRACT.....	15
3- GİRİŞ.....	16
4- GENEL BİLGİLER.....	18
5- GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
5.1 Hücre içi Ca ⁺² iyon konsantrasyonlarındaki değişimlerin izlenmesi.....	31
5.2 Hücre kültürü.....	37
5.3 Post-transkripsiyonel gen susturma.....	37
5.4 Gen susturma sonrası ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi.....	42
5.5 Western blot.....	53
5.6 İmmünoflüoresan boyama ve immünoflüoresans (IF) mikroskopisi.....	54
5.7 <i>In vivo</i> gen susturma amaçlı ön çalışmalar.....	55
5.7.1 Hücre içinde siRNA oluşturan plazmid vektör tasarımı ve klonlanması.....	55
5.7.2 <i>In vivo</i> siRNA uygulama çalışmaları.....	65
5.8 İstatistiksel analiz.....	68
6- BULGULAR.....	69
6.1 İzole canlı dokuda eşzamanlı [Ca ²⁺] _i /izometrik kontraksiyon gelişimi üzerine TRIM ve 2APB'nin etkileri.....	69
6.2 <i>In vitro</i> siRNA uygulaması.....	72
6.2.1 Gen susturmanın TRPC ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisi.....	72
6.2.2 Gen susturmanın kapasitatif Ca ²⁺ üzerindeki etkisi.....	81
6.3 <i>In vivo</i> siRNA uygulaması (Ön deneme sonuçları).....	88
6.3.1 <i>In vivo</i> siRNA uygulamasının TRPC mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	88
6.3.2 <i>In vivo</i> siRNA uygulamasının TRPC protein ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	91
6.3.3 <i>In vivo</i> siRNA uygulamasının Ca ⁺² düzeyleri üzerindeki etkisi.....	92
7- TARTIŞMA ve SONUÇ.....	95
8- REFERANSLAR.....	106

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1. SOC fizyolojik aktivasyon yolağı.....	22
Şekil 4.2. TRPC kanal proteinlerinin yapısı.....	25
Şekil 4.3. TRPC1'in SOC kanallarına katkısı.....	27
Şekil 4.4. SOCE'de TRPC1 ve Orail'in olası rolü.....	27
Şekil 5.1. Genel çalışma planı.....	30
Şekil 5.2. İzole canlı damar dokusunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun ve gerilimlerdeki değişimlerin eşzamanlı ölçülmesinin şematik gösterimi.....	35
Şekil 5.3. İki dalga boyu arasındaki eksitasyon kaymasının ve Ca^{2+} indikatörünün testi.....	36
Şekil 5.4. siRNA uygulamasının şematik gösterimi.....	41
Şekil 5.5. TRPC6 ve β -aktin genleri için amplifikasyon süresince flüoresans emisyonundaki artış.....	48
Şekil 5.6. Standart eğri çizimi ve grafikleri.....	50
Şekil 5.7. PCR ürünün ergime eğrisi analizi.....	52
Şekil 5.8. Hedef gene (TRPC6) spesifik PCR ürününe ait ergime eğrisi analizi.....	52
Şekil 5.9. A7r5 hücrelerinde TRPC1 protein dağılımı.....	55
Şekil 5.10. pSUPER vektör ve eklenecek "insert" dizi.....	56
Şekil 5.11. Oligonükleotidlerin PAGE analizi.....	57
Şekil 5.12. Sırasıyla BglII (A) ve HindIII (B) ile kesilen pSUPER plazmid vektörün agaroz jel görüntüsü.....	58
Şekil 5.13. pSUPER vektörün %0,7 agaroz jel elektroforezi.....	59
Şekil 5.14. İzole edilen plazmidin agaroz jel (%1) elektroforezi.....	62
Şekil 6.1. Reseptör-aracılı veya SOC'ye bağlı artan hücre içi Ca^{+2} ve eşzamanlı gelişen kontraktıl yanıt kalıpları üzerine TRIM'in etkisi.....	70
Şekil 6.2. TRPC1 (A) ve TRPC6 (B) RT-PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri.....	72

Şekil 6.3. TRPC3 (A), C4 (B) ve C5 (C) RT-PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri ...	73
Şekil 6.4. TRPC1 (A) ve TRPC6 (B) amplifikasyon eğrileri.....	74
Şekil 6.5. Gen susturma (siTRPC1) ve kontrol örneklerinde rölatif TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyleri.....	76
Şekil 6.6. Gen susturma (siTRPC1) ve kontrol örneklerinde rölatif TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyleri.....	77
Şekil 6.7. Gen susturma (siTRPC1) ve kontrol örneklerinde rölatif TRPC6 mRNA ekspresyon düzeyleri.....	79
Şekil 6.8. Gen susturma (CypB siRNA) ve kontrol (NT siRNA) örneklerinde rölatif CypB mRNA ekspresyon düzeyi.....	80
Şekil 6.9. CPA'nın neden olduğu Ca^{2+} artışları üzerine 2APB ve TRIM'in etkileri.....	82
Şekil 6.10. Yüksek pasaj numaralı hücrelerde CPA yanıtlarındaki artış.....	83
Şekil 6.11. Düşük pasaj numaralı hücrelere TRPC1 siRNA uygulamasından 72 saat sonra gözlenen SOC yanıtları ve 2-APB'nin etkisi.....	85
Şekil 6.12. Yüksek pasaj numaralı hücrelere TRPC1 siRNA uygulamasından 72 saat sonra gözlenen SOC yanıtları ve 2-APB'nin etkisi.....	86
Şekil 6.13. Gen susturma (siTRPC1) ve kontrol örneklerinde kapasitatif Ca^{+2} girişindeki değişimler.....	88
Şekil 6.14. Parenteral siTRPC1 uygulamasının vasküler düz kas ve endoteldeki TRPC1 ekspresyonu üzerine etkisi.....	89
Şekil 6.15. Parenteral siTRPC1 uygulamasının vasküler düz kas ve endoteldeki TRPC6 ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	90
Şekil 6.16. Parenteral siTRPC1 uygulamasının TRPC1 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	91

Şekil 6.17. Parenteral siTRPC1 uygulamasının TRPC6 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi

Tablo 6.15.1

..... 91

Şekil 6.18. Vasküler düz kasta reseptör stimülasyonuna bağımlı ve bağımsız hücre içi Ca^{+2}

Tablo 6.15.2

konsantrasyonlarındaki değişimler..... 93

Şekil 7.1. Subsarkolemmal kompartman modeli (5-HT, ETR ve SOCC) 101

Tablo 5.1

.....

Tablo 5.2

.....

Tablo 5.3

.....

Tablo 5.4

.....

Tablo 5.5

.....

Tablo 5.6

.....

Tablo 6.1

.....

Tablo 6.2

.....

Tablo 6.3

.....

Tablo 6.4

.....

Tablo 7.1

.....

TABLO LİSTESİ

Tablo 5.1. Spektrofluorometri yönteminde kullanılan kimyasallar	37
Tablo 5.2. TRPC1 siRNA dizileri ve transkript üzerinde eşleştikleri bölgeler.....	38
Tablo 5.3. Negatif ve pozitif kontrol siRNA dizileri	39
Tablo 5.4. siRNA dizilerinin BLASTN analizi.....	40
Tablo 5.5. Primerlerin optimizasyon koşulları; bağlanma sıcaklıkları, MgCl ₂ konsantrasyonları ve uzama süreleri	45
Tablo 5.6. PCR karışımının hazırlanması	46
Tablo 5.7. PCR'da kullanılan primer dizileri.....	46
Tablo 5.8. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR'da kullanılan kimyasal madde/ cihaz ve üretici firmalar	53
Tablo 6.1. TRPC1 ekspresyon düzeyleri.....	75
Tablo 6.2. TRPC1 ekspresyon düzeyleri.....	77
Tablo 6.3. TRPC6 ekspresyon değerleri	78
Tablo 6.4. Gen susturmanın CPA/5HT yanıtları üzerindeki etkisi	87
Tablo 7.1. Ekspresyon düzeyleri ve SOC girişindeki değişim.....	99

FOTOĞRAF LİSTESİ

Fotoğraf 5.1. Spektrofluorometre sistemi	32
Fotoğraf 5.2. Fizyolojik tuz çözeltisi ile perfüze edilebilen polistiren dairesel lameli tutan mandal sistemi taşıyan spektrofotometre küvet tutucusu.....	33
Fotoğraf 5.3. Polistiren lamel ve çelik mandal sistemi	33
Fotoğraf 5.4. İzole damar dokularında eşzamanlı hücre içi Ca^{+2} ve izometrik kasılma ölçüm aparatı	34
Fotoğraf 5.5. Sıçan kuyruk veninden insülin enjektörü ile ilaç uygulaması	66

KISALTMALAR

2-APB	2-aminobiphenylborate
α -AR	Alfa adrenerjik reseptör
AR	Ankyrin Repeat, TRP proteinlerinde bulunan bir peptid dizi tekrarı
ATP	Adenosine triphosphate, Adenozin trifosfat
b.ç.	baz çifti
BLAST	Basic local alignment search tool
BSA	Bovine serum albumin, Sığır serum albumini
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
[Ca ⁺²] _i	Hücre içi Ca ⁺² konsantrasyonu
CaM	Calmodulin, kalmodülün
CCE	Capacitative calcium entry, kapasitatif kalsiyum girişi
cDNA	Complementer DNA, komplementer DNA
CIRB	CaM IP ₃ R Binding domain, bütün TRPC'lerde bulunan CaM ve IP ₃ R etkileşim bölgesi
CPA	Cyclopiazonic acid, siklopiazonik asit
CRAC	Calcium release-activated Ca ²⁺ , Ca ⁺² saliverilişi tarafından aktive edilen

	Ca ⁺² , bkz. SOC ve SOCE.
CyPB	Cyclophillin B, siklofilin B
DAG	Diaçil gliserol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole, çift sarmal DNA boyar belirteç
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, bir kültüre hücre büyüme ortamı
DS	Distile su
ECL	Enhanced chemiluminescence, güçlendirilmiş kemilüminesans
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
ET	Endotelin
EtOH	Etanol
FTS	Fizyolojik tuzlu su, %0.9'luk NaCl çözeltisi
HBS	HEPES-Buffered Saline, HEPES ile tamponlanmış %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi
HEPES	N-2-Hidroksietilpiperazin-N'-2-Etansulfonic Asid, tampon çözelti
HRP	Horseradish peroksidaz
5-HT	5-Hidroksi triptamin, serotonin

IP ₃	İnositol-1,4,5-triphosphate, İnositol-1,4,5-trifosfat
IP ₃ R	IP ₃ reseptörü
LB	Lysogeny broth veya Luria-Bertani broth, zengin bakteriyel besi ortamı
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
PAGE	Poliacrylamide gel electrophoresis, poliakrilamid jel elektroforezi
PAM	Point Accepted Mutations, evrimsel süreç içinde amino asit değişimine yansıyan mutasyon sayısı
PBS	Phosphate-buffered saline, fosfat tamponu içeren %0.9' luk sodyum klorür çözeltisi
PCR	Polimerase chain reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu
PIP ₂	Phosphatidyl inositol 2-phosphate
PLC	Phospholipase C, Fosfolipaz C
PM	Plazma membranı
RNAi	RNA interference, RNA'ya müdahale
ROCC	Receptor-operated Ca ⁺² channels, Reseptör-kontrollü Ca ⁺² kanalları
RT	Reverse transcription, Ters transkripsiyon
RT-PCR	Real-time PCR, Gerçek zamanlı PCR

RyR	Ryanodine receptor, bitkisel bir alkaloid olan ryanodin tarafından aktive edilen SR Ca ⁺² kanalı
SDS	Sodyumdodesilsülfat
SERCA	Sarko(endo)plazmik retikulum Ca ⁺² -ATPaz
siRNA	Small interfering RNA
SL	Sarkolemma, plazma mambranı
SOC	Store-operated Ca ²⁺
SOCC	Store-operated Ca ²⁺ channels, Depo kontrollü Ca ⁺² kanalları
SR/ER	Sarko(endo)plazmik retikulum
STIM	Stromal interaction molecule, stromal interaksiyon molekülü
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tween-20 içeren TBS
6TM	6 Transmembrane domain, plazma membranını 6 kez geçen protein
TPEN	N,N,N',N'-Tetra (2-pridilmetil)etilen diamin, bir ER Ca ⁺² tamponu
TIR	Tripure isolation reagent, Tripure izolasyon çözeltisi
T _m	Melting temperature, Ergime sıcaklığı
TRIM	1-(2-Trifluorometilfenil) imidazol

TRP	Transient receptor potential, geçici membran potansiyeli
TRPC	TRP canonical
VOCC	Voltage-operated Ca ²⁺ Channels, voltaj-kontrollü Ca ²⁺ kanalları
VSM	Vascular smooth muscle, damar düz kası

1- ÖZET

Bu çalışmanın amacı kapasitatif kalsiyum girişinin (Capacitative Ca^{2+} Entry, CCE) vasküler düz kastaki (Vascular Smooth Muscle, VSM) düzenlenme mekanizmasını geleneksel ve gen susturma yöntemleri ile araştırmaktır. İlk olarak, sıçan torasik aortunda kontraksiyon gelişimi ile eşzamanlı olarak, VSM hücrelerinde (A7r5) ise sadece hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarındaki ($[Ca^{2+}]_i$) gerçek zamanlı değişimleri fura-2 epiflüoresans yöntemi ile izleyebilecek bir aparat yapılmıştır. CCE blokörü olduğu ileri sürülen 2-APB ve TRIM'in Ca^{2+} depolarını boşaltarak depo-kontrollü Ca^{2+} kanalını (Store-Operated Ca^{2+} Channel, SOCC) aktive eden selektif sarko-endoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz (SERCA) blokörü siklopiazonik asit (cyclopiazonic acid, CPA) ile artan $[Ca^{2+}]_i$ üzerindeki etkileri araştırılmıştır. CPA'nın artırdığı $[Ca^{2+}]_i$ ve kontraksiyon, 2-APB tarafından, 5-HT yanıtlarını da azalttığından, non-selektif olarak tamamen inhibe edilmiştir. CPA-aracılı $[Ca^{2+}]_i$ ve kontraksiyon artışı voltaj-kontrollü Ca^{2+} kanal blokörü verapamil veya sözde SOCC blokörü TRIM tarafından etkilenmemiştir. SOCC mekanizmasını daha ileri düzeyde incelemek için, kanal blokörleri lameller üzerinde üretilen A7r5 hücrelerinde denenmiştir. 2-APB ve TRIM sağlam dokudakine benzer etkiler göstermiştir. Son olarak, SOCC bileşiminde temel işlevi olduğu düşünülen TRPC1 geninin post-transkripsiyonel susturulmasının etkisini araştırmak için TRPC1 mRNA'sına komplementer 21 bç'lik siRNA'lar A7r5 hücrelerine uygulanmıştır. Transfeksiyondan 72 saat sonra, TRPC1 mRNA düzeyleri %40 oranında azalırken TRPC6 %70 artmıştır. Beklenmedik bir şekilde, siTRPC1 uygulanan hücrelerde SOC artmıştır. Ayrıca, *in vivo* siRNA uygulaması ile TRPC1 ekspresyonu etkilenmezken TRPC6 düzeyleri A7r5'te gözlenen benzer şekilde VSM ve endotelde de artmıştır. Bu sonuçlar TRPC1'in SOCC'nin regülatör alt birimi olabileceğini ve TRPC6 ile kompanse edilebileceğini düşündürmektedir.

2- ABSTRACT

This study investigates the regulatory mechanism of capacitative Ca^{2+} entry (CCE) in vascular smooth muscle (VSM) through conventional and gene silencing approaches. Initially, an original apparatus was designed to monitor real-time changes in cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) via fura-2 epifluorescence in VSM cells (A7r5) as well as force generation simultaneously in isolated aorta. Purported blockers of CCE, 2-APB and TRIM, were tested on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by selective sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) blocker, cyclopiazonic acid (CPA), which activates store-operated Ca^{2+} channels (SOCCs) by emptying Ca^{2+} stores. CPA-elevated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and force were abolished by 2-APB non-selectively as it also decreases 5-HT responses. CPA-elevated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and force were not affected by voltage-operated Ca^{2+} channel blocker, verapamil or a purported SOCC blocker, TRIM. To further investigate SOCC mechanism, channel blockers were tested on A7r5 cells grown on cover slips. 2-APB and TRIM demonstrated similar effects as in intact tissue. Finally, to investigate the effects of post-transcriptional silencing of *TRPC1* gene reportedly acting a central role in multimeric SOCC formation in VSM cells, 21 bp-small interfering RNA (siRNA) complementary to TRPC1 mRNA was administered into the culture medium. 72 h post transfection, TRPC1 mRNA levels were decreased by 48% along with ~70% upregulated TRPC6 levels. Unexpectedly, SOC increased in siTRPC1-administered cells. In addition, in vivo siTRPC1 administration did not apparently affect the TRPC1 expression while it appeared to increase TRPC6 levels in VSM as observed in A7r5 cells as well as in the endothelium. These results suggest that TRPC1 may be the regulatory subunit within the SOCC and possibly replaced by TRPC6 as a result of a compensatory mechanism.

3- GİRİŞ

Bu projenin amacı kardiyovasküler hastalıklarda önemi son on yıl içinde artan kapasitatif kalsiyum girişinin (Capacitative Ca^{+2} Entry, CCE) veya daha yaygın kullanılan adıyla depo-kontrollü Ca^{+2} girişinin (Store-Operated Ca^{+2} Entry, SOCE) vasküler düz kastaki işlevini düzenleyen farmakolojik ve moleküler yaklaşımları araştırmaktır. SOC kanalının (SOC Channel, SOCC) bugüne kadar tanımlanmış voltaj-kontrollü Ca^{+2} kanallarından (voltage-operated Ca^{+2} channels, VOCC) ayrı değerlendirilmesinin temel nedeni kanal yapısına katılan alt birimlerinin farklı genler tarafından kodlanması ve kanal bileşiminin yer, zaman ve uyarı/strese bağlı olarak farklılaşmasıdır (MINKE, 2002; MONTELL, 2005).

İlk defa meyve sineğinde işlevsel varlıklarının gösterilmesi sonrası insanda da değişik dokularda farklı işlevlerinin bulunması ve dogmatik dış uyarı yerine hücre içi mesaj ile aktive olmaları SOCC'yi biyolojik çalışmaların öncelikli hedefi haline getirmiştir (MINKE, 2006; MONTELL, 2003). Selektif antagonistinin bulunmayışı SOCC araştırmasında yeni teknolojilerin kullanımını zorunlu kılmıştır. Bu nedenle, çalışmamızda farmakolojik yaklaşımlara ek olarak gen işlevini tanımlamada kullanılan, özellikle memeli hücrelerinde de işlevselliği kanıtlanan (ELBASHIR, 2001) ve güncel bir işlevsel genomik (functional genomics) yöntemi olan RNA interferans (RNAi) kullanılmıştır. Bu amaçla, hedef gene spesifik 21 bp'lik küçük "müdahale edici" RNA (small interfering RNA, siRNA) transfekte edilen vasküler düz kas hücre kültürleri kullanılarak işlevsel kaybın olduğu fenotip (loss-of-function phenotype) ya da söz konusu genin siRNA-aracılı susturulmasına karşı gelişen kompensatuvar işlev artışı olan fenotip (gain-of-function phenotype) belirlenmeye çalışılmıştır. Bunlara ek olarak, *in vitro* çalışmalarda belirlenen hedef genin *in vivo* ortamda da susturulması

3- GİRİŞ

Bu projenin amacı kardiyovasküler hastalıklarda önemi son on yıl içinde artan kapasitatif kalsiyum girişinin (Capacitative Ca^{+2} Entry, CCE) veya daha yaygın kullanılan adıyla depo-kontrollü Ca^{+2} girişinin (Store-Operated Ca^{+2} Entry, SOCE) vasküler düz kastaki işlevini düzenleyen farmakolojik ve moleküler yaklaşımları araştırmaktır. SOC kanalının (SOC Channel, SOCC) bugüne kadar tanımlanmış voltaj-kontrollü Ca^{+2} kanallarından (voltage-operated Ca^{+2} channels, VOCC) ayrı değerlendirilmesinin temel nedeni kanal yapısına katılan alt birimlerinin farklı genler tarafından kodlanması ve kanal bileşiminin yer, zaman ve uyarı/strese bağlı olarak farklılaşmasıdır (MINKE, 2002; MONTELL, 2005).

İlk defa meyve sineğinde işlevsel varlıklarının gösterilmesi sonrası insanda da değişik dokularda farklı işlevlerinin bulunması ve dogmatik dış uyarı yerine hücre içi mesaj ile aktive olmaları SOCC'yi biyolojik çalışmaların öncelikli hedefi haline getirmiştir (MINKE, 2006; MONTELL, 2003). Selektif antagonistinin bulunmayışı SOCC araştırmasında yeni teknolojilerin kullanımını zorunlu kılmıştır. Bu nedenle, çalışmamızda farmakolojik yaklaşımlara ek olarak gen işlevini tanımlamada kullanılan, özellikle memeli hücrelerinde de işlevselliği kanıtlanan (ELBASHIR, 2001) ve güncel bir işlevsel genomik (functional genomics) yöntemi olan RNA interferans (RNAi) kullanılmıştır. Bu amaçla, hedef gene spesifik 21 bç'lik küçük "müdahale edici" RNA (small interfering RNA, siRNA) transfekte edilen vasküler düz kas hücre kültürleri kullanılarak işlevsel kaybın olduğu fenotip (loss-of-function phenotype) ya da söz konusu genin siRNA-aracılı susturulmasına karşı gelişen kompanse edilebilir işlev artışı olan fenotip (gain-of-function phenotype) belirlenmeye çalışılmıştır. Bunlara ek olarak, *in vitro* çalışmalarda belirlenen hedef genin *in vivo* ortamda da susturulması

in gerekli ön çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, hedef mRNA'nın farklı bölgelerini komplementer olarak tanıyan üç siRNA karışımı mikroemülsiyon formülasyonu içinde sıçan kuyruk veninden enjekte edilmiş ve 72 saat sonra izole edilen damarlarda hedef mRNA düzeyleri ve olası fonksiyonel değişimler test edilmiştir.

Hedef genin (*TRPC1*) SOC kanalının bileşeni olan TRPC1 proteinini kodlaması nedeniyle gerçek zamanlı hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonlarındaki değişimi spektrofotometrik olarak izleyebilecek bir deney aparatının mühendislik tasarımı ile geliştirilmesi de çalışmanın gerçekteşen hedefleri arasında yer almıştır. Moleküler çalışmalara ek olarak SOC'nin vasküler kontraksiyondaki işlevi ve sözde antagonistlere duyarlılığı hücre içi Ca^{+2} ve kontraksiyonun eşzamanlı ölçümü ile test edilmiştir. Proje araştırıcıları olarak bu çalışmanın vasküler araştırmalarda ölkemizde uygulanan ilk "işlevsel genomik" projesi olmasının yanı sıra teknolojik olarak yurtdışı laboratuvarlarla eşgüdüm içinde çalışabilecek potansiyele erişildiği kanısındayız.

4- GENEL BİLGİLER

Proje gelişimi sırasında SOCC bileşimine giren yedi adet transient receptor potential canonical (TRPC1-7) proteinleri içinde TRPC1 alt tipinin hedefsel önemi artmıştır. Haziran 2007'de tamamlanan SBAG-2735 numaralı araştırma projemizde sıçan aortundaki TRPC gen ekspresyonlarının yaşlanma sürecinde belirgin olarak değiştiği gözlenmiştir (ERAC, 2006). Böylelikle, *“vasküler düz kas TRPC1 ekspresyonunun dramatik olarak azalmasının yaşlanma ile ilişkili Ca^{2+} homeostazındaki değişimlerden sorumlu olduğu”* hipotezini geliştirdik. Bu hipotezi test edebilmek için laboratuvarımızda TRPC1'deki azalmayı taklit ederek TRPC1'in işlevini belirleyebileceğimiz bir “fonksiyonel genomik” modeli oluşturulmuştur. Ayrıca, memelilerde iyon kanalını oluşturduğu ileri sürülen ilk TRPC üyesi oluşu (ZITT, 1996), insan, tavşan ve farelerde yaygın eksprese edilen (XU, 2001) TRPC1'i geniş kapsamlı zaman, emek ve maliyet gerektirecek tarama çalışmalarımızın öncelikli hedefi haline getirmiştir.

Ancak, TRPC1'in tek başına kanal işlevi göremeyeceğine ilişkin kanıtlar ve iyon kanalının farklı TRPC alt birimlerinin tetramerik (dörtlü) bileşiminden oluştuğu savı çalışmaların yön ve kapsamını değiştirmiştir (HOFMANN, 2002; PUTNEY, 2004; STRUBING, 2003). Bu nedenle, bulgularımız ve TRPC1 geninin susturulmasına ilişkin güncel literatür (BRUEGGEMANN, 2006) doğrultusunda öncelikle embriyonik sıçan aortik düz kas hücre (A7r5) kültüründe RNA müdahale (RNA interferans, RNAi) yöntemi ile post-transkripsiyonel gen susturma hedef validasyonu yapılmıştır (SELLI, 2007). TRPC1'in transkripsiyonel olarak baskılanmasının kapasitatif Ca^{+2} değişimleri ve diğer TRPC'lerin ekspresyonları üzerindeki etkisi de izlenmiştir.

Post-transkripsiyonel gen susturma (PTGS): RNAi

Başarılı bir şekilde uyguladığımız PTGS (post-transcriptional gene silencing) ve gerçek zamanlı hücre içi Ca^{+2} izleme yöntemleri TRPC1'in CCE'ye aracılık eden depo-kontrollü Ca^{+2} kanalının düzenleyici bileşeni olduğu varsayımını kuvvetlendirmiştir. TRPC1'in bu işlevini tek başına mı yoksa yakın zamanda varlığı keşfedilen STIM1 ve Orai adaptör proteinleri aracılığı ile gerçekleştirdiği olgusu CCE'nin hücre içi aktivasyon yolağını aydınlatma fırsatını oluşturmuştur. SOC'nin patolojik süreçlerdeki işlevsel önemi ve TRP gen ailesinin ekspresyon kalıplarının vasküler sistem dışında özellikle prostat kanserinde de ayrımsal değişiklikler göstermesi (FIXEMER, 2003; TSAVALER, 2001; VANDEN ABEELE, 2003) ve apoptotik süreçlere katılmaları (MARASA, 2006) TRPC'leri hastalık tanı ve tedavisinde hedef haline getirmiştir. Son yıllarda TRPC alt tiplerinin de prostat kanserinde ayrımsal işlevleri olduğunun gösterilmesi TRPC'lerin gündemde tutulmalarına neden olmuştur (PIGOZZI, 2006). Apoptotik sürece katılan genlerin transkripsiyonunda işlev gören nükleer faktör *kappa* B (NF κ B) aktivasyonu SOC girişindeki artış tarafından baskılanarak hücrenin apoptotik sürece girmesini kolaylaştırmaktadır. TRPC1'in bağırsak epitel hücrelerinde küçük engelleyici RNA (small interfering RNA, siRNA) aracılığı ile susturulması azalan SOC girişine bağlı olarak apoptozu engellemektedir. Söz konusu gözlem TRPC1'in intestinal mukozanın apoptotik hücre ölümü ve mukozanın homeostazı için kritik önem taşıdığını kanıtlamaktadır (MARASA, 2006).

İlginç olarak familial segmental glomerüloskleroz sendromundan (FSGS) non-selektif katyon kanalını kodlayan TRPC6 genindeki mutasyonun sorumlu olduğu gösterilmiştir (WINN, 2005). Bu olguda araştırmacılar TRPC6 mutasyonunun glomerüler homeostazı bozduğunu ve/veya apoptozu tetiklediğini ileri sürerek TRPC6'nın da apoptotik süreçlerde işlev gördüğünü önermektedir (WALZ, 2005).

Proje kapsamındaki temel kavramlar ve güncel durumları

Kalsiyum: Kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) tüm memeli organizmalarında hücrenin doğum, yaşam ve ölüm süreçlerinde çok yönlü işlevler gören basit ancak becerikli bir moleküldür. Hareket etmemizi sağlayan iskelet kasının kontraksiyonundan beynimizin bilgi işleme ve depolama sürecine kadar birçok mekanizma Ca^{+2} tarafından düzenlenir. Kalsiyum iyonunun bu mekanizmalardaki temel işlevi hücre içinde bilginin aktarılmasını sağlamaktır. Kalsiyumun bu basit yapısı ile farklı süreçlerde düzenleyici olarak işlev görmesi, hücre içinde belirli bir yerdeki konsantrasyonunun eşik değerlere yükselme veya alçalmasının yanı sıra yer ve zamana bağlı değişim kalıplarındaki farklılıklarla ilişkili gözükmektedir (BERRIDGE, 1998). Söz konusu değişimler bir nöronun diğeri ile sinaptik bağlantı yapmak üzere akson boyunun uzatılmasından, membran eksitasyonu, vezikül sekresyonu, mitoz bölünme, mitokondriyal metabolizma ve düz kas gevşemesi gibi temel intraselüler mekanizmaları kapsar.

Sarko-endoplazmik retikulum ve hücre içi sinyal iletimindeki sıradışı işlevi: Sarko-endoplazmik retikulumun (SR/ER) geleneksel olarak hücre içi Ca^{+2} iyonlarını depoladığı ve gerektiğinde hücre içi sinyal iletimi sonucunda depolanan Ca^{+2} iyonlarını salıvererek hücre içi süreçlere katıldığı bilinmektedir. SR membranından sürekli fakat düşük düzeyde Ca^{+2} sızıntısı meydana gelirken, aktif Ca^{+2} salıverilmesi bugüne kadar belirlenen iki tip spesifik kanal (inozitol-3-fosfat reseptörü, IPR ve ryanodin reseptörü, RyR) aracılığı ile gerçekleşmektedir. SR içerisine kalsiyumun alımı ise SR membranında bulunan Ca^{+2} -pompaları (SERCA) aracılığı ile gerçekleşmektedir (MARTONOSI, 2003). SERCA ailesi farklı genler tarafından kodlanan 3 temel izoformdan (SERCA1, 2 ve 3) oluşmaktadır. Düz kasta daha çok SERCA2b izoformu bulunmaktadır (MACLENNAN, 1992; MARTONOSI, 2003). Bilindiği gibi bir integral membran proteini olan fosfolipaz C (PLC) enziminin aktivasyonu ile ilişkili hücre

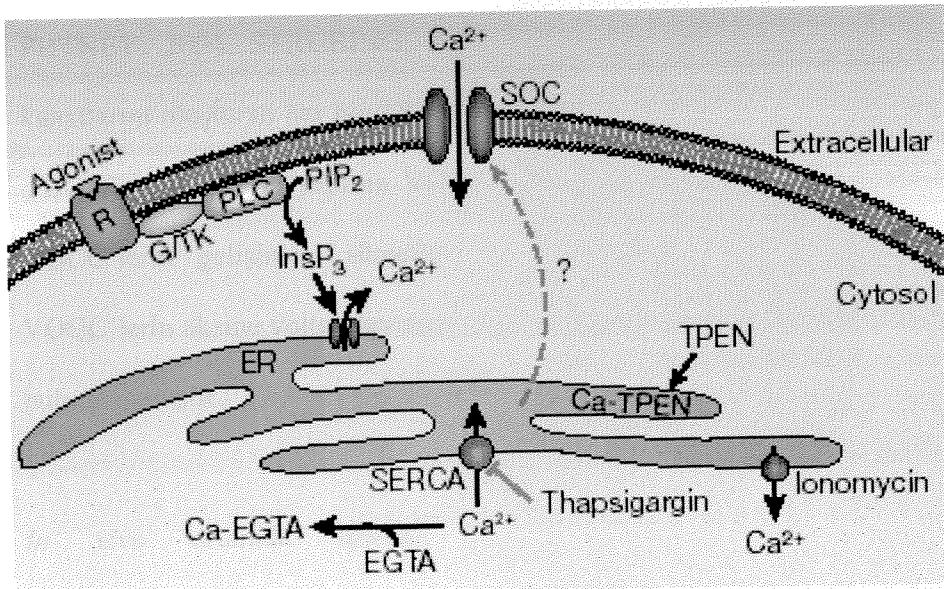
yüze reseptörlerinin uyarılması sonucunda hücre içinde inozitol-3-fosfat (IP₃) düzeyindeki artış depo boşalmasına neden olmaktadır. IP₃, SR membranında bulunan tetramerik (dört birimli) IP₃ tarafından aktive olan Ca⁺² kanalları (IPR) aracılığı ile SR'den Ca⁺² salıverilmesine neden olmaktadır. Yaklaşık 20 yıl kadar önce tanımlanan bu Ca⁺² sinyal yolağı hücre membranından Ca⁺² girişinin aktivasyonuna neden olmaktadır (BERRIDGE, 2003).

Kapasitatif Ca⁺² (Capacitative Ca⁺²) veya Depo-kontrollü Ca⁺² (Store-operated Ca⁺², SOC):

İlk olarak uyarılmayan hücrelerde belirlenen bu Ca⁺² giriş yolağı hücre içi Ca⁺² depolarının boşalmasına yanıt olarak uyarıldığı (ve bu depoların dolması ile inaktive oldukları) için depo-kontrollü Ca⁺² girişi (store-operated Ca⁺² entry, SOCE) olarak isimlendirilmiştir (**Şekil 4.1**) (PUTNEY, 1986). Sonraki yıllarda SOCE, nöron (LI, 1999) ve düz kas hücrelerinde de bulunmuş (ALBERT, 2002; TREPAKOVA, 2000) olup sıçan torasik aortundaki işlevi tanımlanmıştır (TOSUN, 1998). Bunlara ek olarak subaraknoid kanamanın indüklediği tersinir olmayan baziler arter spazmında da işlev gördüğü ilk kez tarafımızdan gösterilmiştir (ZUCCARELLO, 1996). Son bulgular protein sentezinin SR'den Ca⁺² salıverilmesi ve SOC ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Protein sentezinin sonlandırılması ve başlangıç aşamasındaki polipeptidin salıverilmesi SR'den Ca⁺² salıverilmesi sonucunda ribozom-translokon kompleksinin iyon geçirgenliğindeki değişiklik ile ilişkilidir (CAMELLO, 2002; LOMAX, 2002; ONG, 2007). Farklı koşullar ile SR'nin boşalması SOC aktivasyonu üzerinde birleşmektedir. T-lenfosit aktivasyonu (LEWIS, 2001), düz kas kontraksiyonu (OKON, 2002), endotel hücrelerinin geçirgenliği (CIOFFI, 2003; TIRUPPATHI, 2002), salgı bezlerinin sekresyonu (LIU, 2004; LIU, 2000) gibi nörotransmitere bağımlı fizyolojik süreçlere ek olarak SOC ayrıca SR-Ca⁺² konsantrasyonunu koruyarak protein sentezini optimum düzeylerde sürdürülmesini sağlar (HUSSAIN, 1999). SOC'nin protein sentezi, hücre gelişimi ve

proliferasyon için kritik olan hücre içi depoların uygun bir şekilde yeniden dolması için programlanmış yaşamsal bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (VENKATACHALAM, 2002).

SOC kanalları SR Ca^{+2} içeriğini azaltan IP_3 ya da diğer bir uyarının (HOTH, 1992; PAREKH, 1997) yanı sıra thapsigargin (THASTRUP, 1990), siklopiazonik asit (CPA) (SEIDLER, 1989) ve di-ter-bütilhidroksikinon (MOORE, 1987) gibi SERCA inhibitörü ajanların etkisi ile de aktive olabilir. SERCA blokörlerinin kalsiyumun aktif olarak SR içine pompalanmasını inhibe ederek SR'nin pasif olarak boşalması sonucunda SOC girişini reseptörden bağımsız olarak aktive etmeleri SOC araştırmalarına olanak vermiştir. Çalışmamızda SERCA inhibisyonuna neden olarak doğrudan hücre içi Ca^{+2} depolarını boşalttığı bildirilen CPA kullanılmıştır (PAREKH, 2005; PUTNEY, 2001; SCHILLING, 1992).



Şekil 4.1. SOC fizyolojik aktivasyon yolağı. Agonistin reseptörüne (R) bağlanması G proteini ya da tirozin kinaz (TK) aracılığı ile fosfolipaz C'yi (PLC) aktive eder. PLC membrandaki PIP_2 'yi hidroliz eder ve IP_3 oluşmasına neden olur. IP_3 IPR ile ER'den Ca^{+2}

salıverilmesine neden olur. ER Ca^{+2} konsantrasyonundaki azalma SOC kanallarını aktive eder. TPEN: ER Ca^{+2} tamponu (N,N,N',N'-tetra (2-pridilmetil)etilen diamin) (LEWIS, 2007).

SOC kanallarının diğer Ca^{+2} kanallarından yapısal ve işlevsel farklılıkları: SOC kanallarının diğer Ca^{+2} kanallarından yapısal olarak bir takım farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Beş protein altbiriminden (α_1 , α_2 , β , γ , δ) meydana gelen voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları (VOCC) tek gen tarafından kodlanan α_1 altbiriminin 6 defa membranı geçen (6TM) domainlerinin 4 kez tekrarlanması ile kanal yapısı oluştururlar. Her bir modüldeki pozitif yüklü amino asidlerce zengin dördüncü segmentin (S4) voltaj duyargası olarak işlev yaptığı düşünülmektedir (FLOCKERZI, 1986; TAKAHASHI, 1987; TANABE, 1987). Diğer yandan SOC kanallarını oluşturduğu bilinen bazı TRP kanallarının homo- ya da heterotetramerik yapılar oluşturarak fonksiyon gösterdiği önerilmektedir (**Şekil 4.2**) (CLAPHAM, 2003; HOFMANN, 2002; PUTNEY, 2004; STRUBING, 2003; VANNIER, 1998). Hidropati analizlerine göre SOC kanallarını oluşturan her bir TRP alt biriminin membranı 6 kez geçen segmentlerden oluştuğu düşünülmektedir. Bu yapının VOCC'lerin dört 6TM yapısından birine benzemesi nedeniyle VOCC'lerin gelişimsel süreçleri ile ilişkili olabileceklerini akla getirmektedir. Ancak VOCC'lerin aksine voltaj duyargası S4'ün işlevini taşıyan bir TRP proteini SOCC bileşiminde bulunamamıştır.

In vivo ortamda işlevsel TRP kanal komplekslerinin bir araya gelişi homo/heteromultimerleşme ve yapısal proteinler ile kompleks oluşumlar tarafından yönetilmektedir (DIETRICH, 2006). Farklı dokularda önerilen fizyolojik işlevler ile heterolog ekspresyon sistemlerinde gözlenen TRP kanallarının işlevsel özellikleri arasındaki farklılıklar bu oluşumlar ile açıklanabilir. SOC girişine neden olan kanallar hemen hemen tüm hücre tiplerinde eksprese olurken farklı hücrelerde farklı özelliklere sahiptir. İlk belirlenen SOC

salıverilmesine neden olur. ER Ca^{+2} konsantrasyonundaki azalma SOC kanallarını aktive eder. TPEN: ER Ca^{+2} tamponu (N,N,N',N'-tetra (2-pridilmetil)etilen diamin) (LEWIS, 2007).

SOC kanallarının diğer Ca^{+2} kanallarından yapısal ve işlevsel farklılıkları: SOC kanallarının diğer Ca^{+2} kanallarından yapısal olarak bir takım farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Beş protein altbiriminden (α_1 , α_2 , β , γ , δ) meydana gelen voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları (VOCC) tek gen tarafından kodlanan α_1 altbiriminin 6 defa membranı geçen (6TM) domainlerinin 4 kez tekrarlanması ile kanal yapısı oluştururlar. Her bir modüldeki pozitif yüklü amino asidlerce zengin dördüncü segmentin (S4) voltaj duyargası olarak işlev yaptığı düşünülmektedir (FLOCKERZI, 1986; TAKAHASHI, 1987; TANABE, 1987). Diğer yandan SOC kanallarını oluşturduğu bilinen bazı TRP kanallarının homo- ya da heterotetramerik yapılar oluşturarak fonksiyon gösterdiği önerilmektedir (**Şekil 4.2**) (CLAPHAM, 2003; HOFMANN, 2002; PUTNEY, 2004; STRUBING, 2003; VANNIER, 1998). Hidropati analizlerine göre SOC kanallarını oluşturan her bir TRP alt biriminin membranı 6 kez geçen segmentlerden oluştuğu düşünülmektedir. Bu yapının VOCC'lerin dört 6TM yapısından birine benzemesi nedeniyle VOCC'lerin gelişimsel süreçleri ile ilişkili olabileceklerini akla getirmektedir. Ancak VOCC'lerin aksine voltaj duyargası S4'ün işlevini taşıyan bir TRP proteini SOCC bileşiminde bulunamamıştır.

In vivo ortamda işlevsel TRP kanal komplekslerinin bir araya gelişi homo/heteromultimerleşme ve yapısal proteinler ile kompleks oluşumlar tarafından yönetilmektedir (DIETRICH, 2006). Farklı dokularda önerilen fizyolojik işlevler ile heterolog ekspresyon sistemlerinde gözlenen TRP kanallarının işlevsel özellikleri arasındaki farklılıklar bu oluşumlar ile açıklanabilir. SOC girişine neden olan kanallar hemen hemen tüm hücre tiplerinde eksprese olurken farklı hücrelerde farklı özelliklere sahiptir. İlk belirlenen SOC

kanalı Ca^{+2} -salıverilişi ile aktive olan Ca^{+2} (Ca^{+2} release-activated calcium, CRAC) kanalıdır (HOTH, 1992). Bu kanallar T-lenfositlerinde ve sıçan bazofil lösemi (rat basophil leukaemia, RBL) hücrelerinde kalsiyuma son derece yüksek selektivite gösteren kanallardır (PAREKH, 1997; PAREKH, 2005). SOC kanallarının farklı hücrelerde farklı biyofiziksel özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (AMBUDKAR, 2006; BOLOTINA, 2004; LIU, 2004; PAREKH, 2005). Bu kanalların Ca^{+2} selektiviteleri hücre tiplerine göre farklılık göstermektedir. Moleküler yapıları tam olarak bilinmemekle beraber alt tip bileşiminin kanalın fizyolojik işlevi ile ilişkili olarak belirlendiği düşünülmektedir (Şekil 4.2) (AMBUDKAR, 2007; MINKE, 2006; PUTNEY, 2004). Bu ters yönlü (hücre içinden membrana) aktive olan kanalların hücre içi depoların Ca^{+2} içeriğini nasıl algılayabildiği ve hepsinin ortak bir ER-PM sinyali ile aktive olup olmadığı hücre biyolojisinin en önemli bilinmeyenleri arasındadır.

Şekil 4.1. CRAC kanalı proteinlerinin

strukturunu gösteren bir kavramsal

çizimdir. CRAC kanalı, hücre içinden

hücre dışına Ca^{+2} salıverir.

CRAC kanalı, hücre içinden

hücre dışına Ca^{+2} salıverir.

CRAC kanalı, hücre içinden

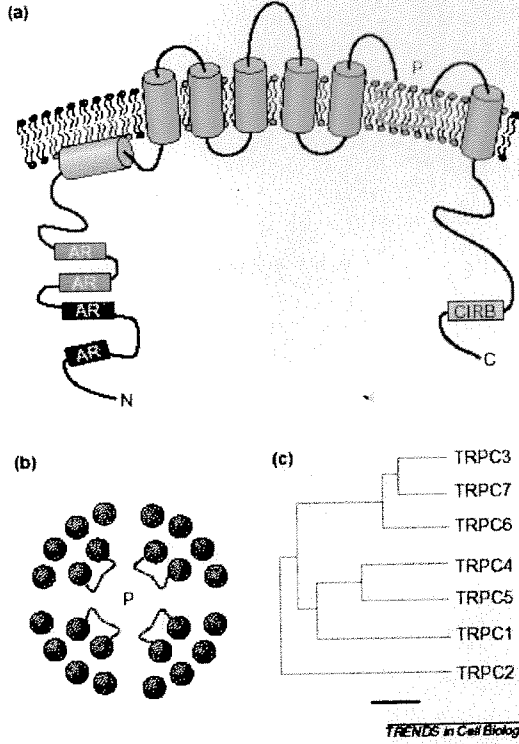
hücre dışına Ca^{+2} salıverir.

CRAC kanalı, hücre içinden

hücre dışına Ca^{+2} salıverir.

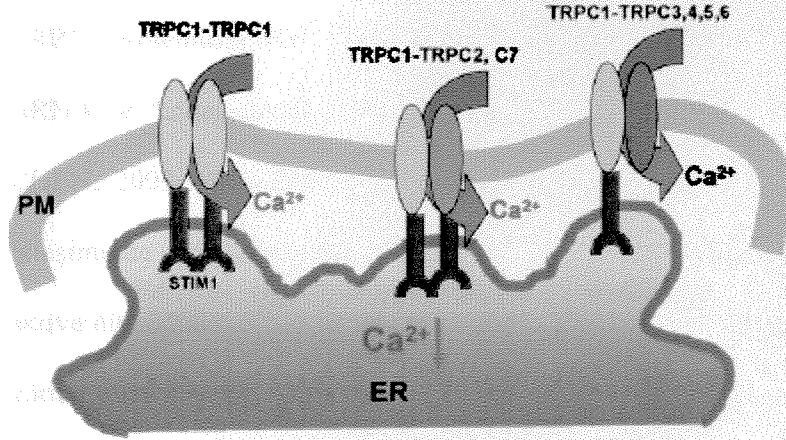
CRAC kanalı, hücre içinden

hücre dışına Ca^{+2} salıverir.

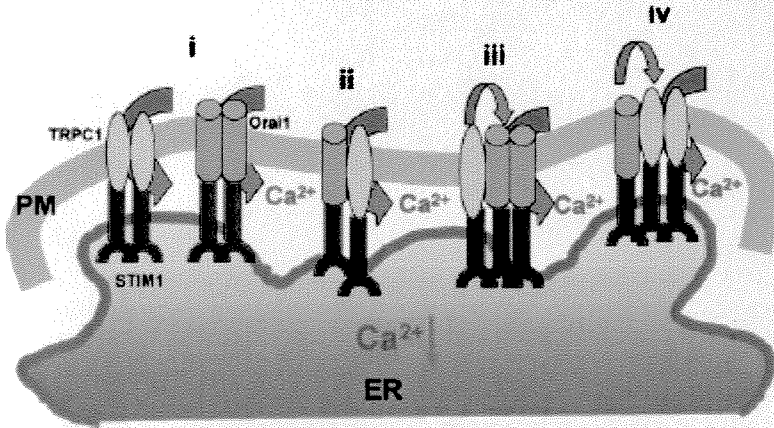


Şekil 4.2. TRPC kanal proteinlerinin yapısı. a) Örnek olarak gösterilen TRPC3 alt biriminin membranı altı kez geçen 6TM segmentleri (kavuniçi) membranı tamamen geçmeyen ve kanalın por kısmını oluşturduğuna inanılan hidrofobik segment (P) görülmekte. Gri renkte görülen segment de hidrofobik yapıda olup membranı geçmemektedir. Amino (N) ucunda dört adet “ankyrin-benzeri tekrar” (AR) bulunmaktadır. Karboksi (C) ucunda ise proteinin plazma membranına doğru iletimini sağladığına inanılan hem kalmoduline hem de IP_3 reseptörüne bağlanan bölge (CIRB, CaM IP_3R binding) bulunmaktadır. b) İşlevsel TRPC kanalının dört TRPC alt biriminin tetramerik bileşiminden oluştuğu önerilmektedir. Kanal konfigürasyonu ve por (mavi) oluşumu plazma membranının üzerinden hipotetik olarak görülmektedir. c) TRPC ailesinin yapısal ilişkileri. Ölçek çubuğu: $\frac{1}{4}$ PAM birimi (accepted point mutations, iki amino asit dizisi arasındaki evrimsel uzaklık miktarının bir ölçütü) (PUTNEY, 2004).

Araştırmacıların en büyük mücadelesi ER'deki Ca^{+2} içeriğinin hangi mekanizma ile hücre membranına aktarıldığıdır. Bu kapsamda kabul gören 3 hipotetik mekanizma bulunmaktadır. (i) SOCC'nin ER'deki IPR Ca^{+2} kanalı ile doğrudan etkileştiği (*konformasyonel kenetlenme*) (IRVINE, 1990), (ii) *difüze olabilen bir faktör*'ün deponun boşalmasının ardından sentezlenerek salıverildiği (PUTNEY, 1990; RANDRIAMAMPITA, 1993) ve (iii) hücre içi veziküllerde bulunan kanalların hücre membranına transfer olduğu (*sekresyon-kenetlenme modeli*) (FASOLATO, 1993) önerilmektedir. Son on yıl içinde SOC girişinin moleküler bileşenleri belirlenmiştir. Bunlar arasında en önemli kanal proteinleri TRPC'lerdir. Bununla birlikte geçen 2 yıl boyunca gerçekleştirilen çalışmalarda SOCC'nin yeni bileşenleri saptanmıştır (**Şekil 4.3 ve 4.4**) (AMBUDKAR, 2007; LIOU, 2005; ROOS, 2005; SMYTH, 2006; SOBOLOFF, 2006).



Şekil 4.3. TRPC1'in SOC kanallarına katkısı. Homomerik ve heteromerik SOC kanalları TRPC1'in diğer TRPC monomerlerle etkileşimi ile meydana gelebilir. Bu TRPC kanallarının bazıları STIM1 aracılığı ile ER'ye kenetlenirken diğerleri STIM1 ile etkileşmez. STIM1 ile etkileşmeyen TRPC'ler TRPC1 gibi depo boşalması ile düzenlenen bir TRPC monomeri ile etkileşerek SOC girişine aracılık edebilir. Şekli basitleştirmek amacı ile sadece dimerik kanallar gösterilmiş, TRPC1 fonksiyonunda rol alan diğer proteinler (IP₃R, Homer, kaveolin gibi) gösterilmemiştir. (AMBUDKAR, 2007)



Şekil 4.4. SOCE'de TRPC1 ve Orai1'in olası rolü. Dört olasılık gösterilmektedir. (i) TRPC1 ve Orai1 birbirinden bağımsız kanallar oluşturur, (ii) TRPC1 ve Orai1 aynı kanala aracılık eder (iii) TRPC1 Orai1 kanalının düzenleyicisidir (üstte turuncu okla gösterilmiştir) (iv) Orai1 TRPC1 kanalının düzenleyicisidir (AMBUDKAR, 2007).

TRPC1 proteininin SOC kanalının bir bileşeni olduğuna ilişkin bulgular giderek artmaktadır. siRNA ile “knock-down” ve faredeki delesyon çalışmaları TRPC1 (BRUEGGEMANN, 2006; CHEN, 2003; WU, 2004) ve TRPC4’ün (FREICHEL, 2001; TIRUPPATHI, 2002) SOCC bileşiminde olduğunu göstermiştir. TRPC3, TRPC6 ve TRPC7 ise diaçilgliserol (DAG) ile aktive olmaktadır (DIETRICH, 2005; INOUE, 2001; SOBOLOFF, 2005). Meyve sineklerinin görme sistemlerindeki keşifleriyle başlayan ve insan homologları bulunan gen ailesi tarafından kodlanan iyon kanalı proteinlerinin dış uyarının ortadan kalkmasına karşın geniş bir çeşitlilikteki hücresel yanıtların sürdürülebilmesinde etkin işlev görmesi TRP genlerini işlevsel genomik çalışmalarının temel hedefleri arasında tutmaktadır. TRP’lerin homomerik ya da heteromerik iyon kanalı oluşturma potansiyelleri çeşitli vasküler hastalıklarda selektif terapötik ajaların geliştirilmesinde spesifik hedefler belirleme açısından oldukça önemli gözükmetedir (VAN BREEMEN, 2006).

TRPC1 proteininin SOC kanalının bir bileşeni olduğuna ilişkin bulgular giderek artmaktadır. siRNA ile “knock-down” ve faredeki delesyon çalışmaları TRPC1 (BRUEGGEMANN, 2006; CHEN, 2003; WU, 2004) ve TRPC4’ün (FREICHEL, 2001; TIRUPPATHI, 2002) SOCC bileşiminde olduğunu göstermiştir. TRPC3, TRPC6 ve TRPC7 ise diaçilgliserol (DAG) ile aktive olmaktadır (DIETRICH, 2005; INOUE, 2001; SOBOLOFF, 2005). Meyve sineklerinin görme sistemlerindeki keşifleriyle başlayan ve insan homologları bulunan gen ailesi tarafından kodlanan iyon kanalı proteinlerinin dış uyarının ortadan kalkmasına karşın geniş bir çeşitlilikteki hücresel yanıtların sürdürülebilmesinde etkin işlev görmesi TRP genlerini işlevsel genomik çalışmalarının temel hedefleri arasında tutmaktadır. TRP’lerin homomerik ya da heteromerik iyon kanalı oluşturma potansiyelleri çeşitli vasküler hastalıklarda selektif terapötik ajaların geliştirilmesinde spesifik hedefler belirleme açısından oldukça önemli gözükmemektedir (VAN BREEMEN, 2006).

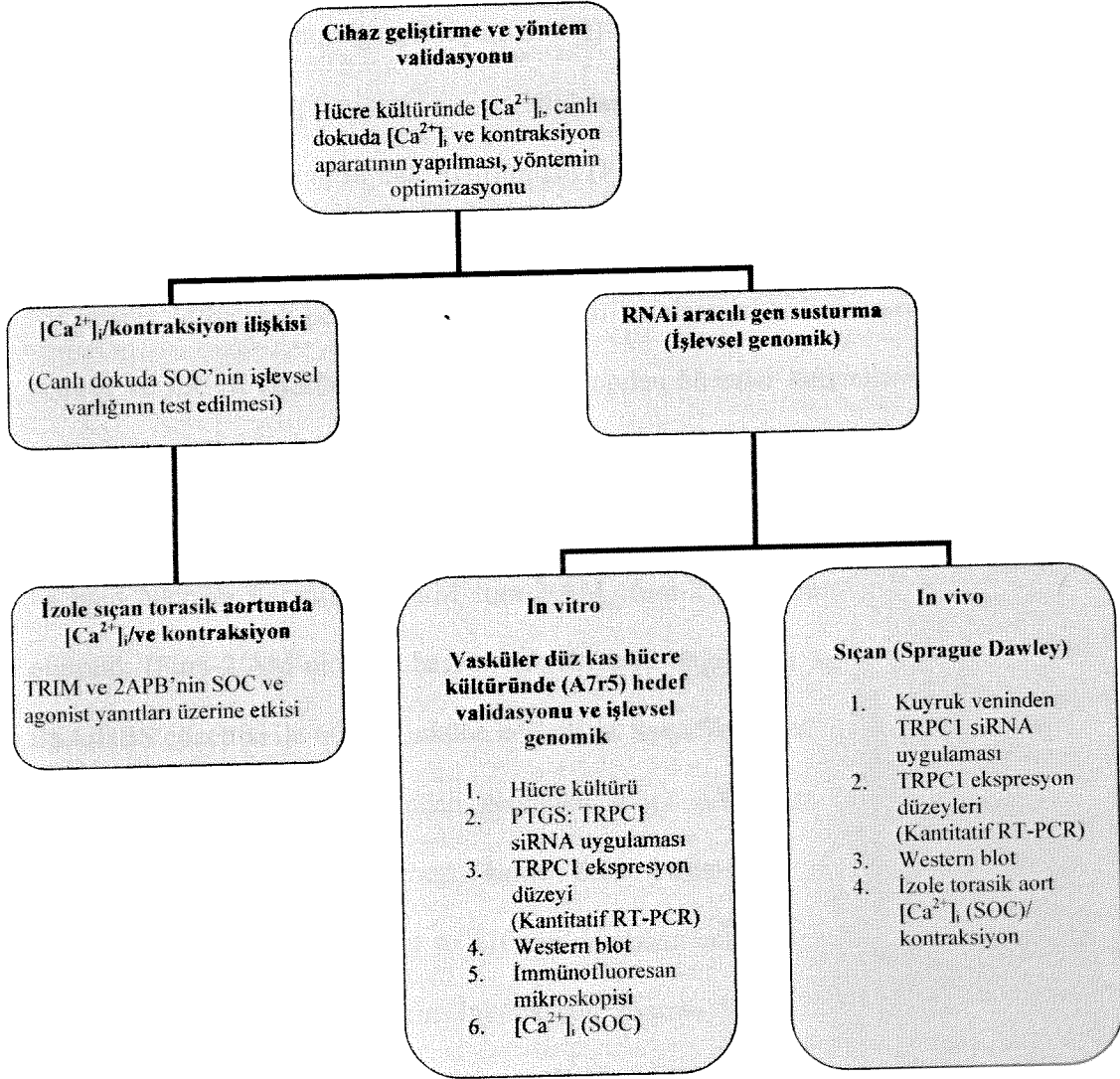
TRPC1 proteininin SOC kanalının bir bileşeni olduğuna ilişkin bulgular giderek artmaktadır. siRNA ile “knock-down” ve faredeki delesyon çalışmaları TRPC1 (BRUEGGEMANN, 2006; CHEN, 2003; WU, 2004) ve TRPC4’ün (FREICHEL, 2001; TIRUPPATHI, 2002) SOCC bileşiminde olduğunu göstermiştir. TRPC3, TRPC6 ve TRPC7 ise diaçilgliserol (DAG) ile aktive olmaktadır (DIETRICH, 2005; INOUE, 2001; SOBOLOFF, 2005). Meyve sineklerinin görme sistemlerindeki keşifleriyle başlayan ve insan homologları bulunan gen ailesi tarafından kodlanan iyon kanalı proteinlerinin dış uyarının ortadan kalkmasına karşın geniş bir çeşitlilikteki hücresel yanıtların sürdürülebilmesinde etkin işlev görmesi TRP genlerini işlevsel genomik çalışmalarının temel hedefleri arasında tutmaktadır. TRP’lerin homomerik ya da heteromerik iyon kanalı oluşturma potansiyelleri çeşitli vasküler hastalıklarda selektif terapötik ajaların geliştirilmesinde spesifik hedefler belirleme açısından oldukça önemli gözükmektedir (VAN BREEMEN, 2006).

5- GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalarımızda kullandığımız RNA, protein izolasyonu, hücre içi Ca^{+2} , simültane Ca^{+2} /kontraktilite deneyleri, hücre kültürü, *in vitro* ve *in vivo* gen susturma uygulamaları Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD, kantitatif RT-PCR ve klonlama çalışmaları ise Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Aşağıda başlangıçta planlanan çalışma akış protokolleri özetlenmektedir (Şekil 5.1). Proje bulguları ve güncel literatürdeki gelişmeler doğrultusunda kapasitatif Ca^{+2} kanalının işlevsel alt tipini belirlemede sinyal/gürültü oranının yüksek olduğu sıçan aortik düz kas hücre hattında (A7r5) *in vitro* gen susturma çalışmalarını yapma gerekliliği doğmuştur. Hedef validasyonu amaçlı RNAi aracılı işlevsel genomik çalışmamız sistemik uygulamaya geçmeden işlevsel TRPC alt tipini belirleme fırsatı vermiştir.

Bu çalışmaları takiben *in vivo* gen susturma ön çalışmaları yapılmıştır. Sistemik uygulama amaçlı TRPC1 mRNA'sının 3 farklı bölgesini hedefleyen çift sarmal siRNA karışımı ile mikroemülsiyon formülasyonu yapılmıştır. Maksimum 300 µl hacminde siRNA mikroemülsiyon formülasyonu sınırlı sayıda bir yaşındaki Sprague Dawley türü erkek sıçanlara kuyruk veni aracılığı ile uygulanmıştır. Bu çalışmalar kapsamında *in vivo* siTRPC1 uygulamasının VSM ve endotel TRPC ekspresyonları ve endotelsiz izole torasik aortundaki kapasitatif Ca^{+2} girişine bağlı simültane Ca^{+2} /kontraktilite değişimleri üzerine olası etkileri izlenmiştir.

Şekil 5.1. Genel çalışma planı



Ek Çalışmalar:

siRNA eksprese eden plazmid vektör üretimi denemeleri

1. TRPC1 shRNA tasarımı
2. pSuper plazmid vektöre TRPC1 shRNA eklenmesi
3. Bakteriyel transformasyon

5.1 Hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonlarındaki değişimlerin izlenmesi

Kurumumuzda kurulumu gerçekleştirilen PTI QM8/2005 yüksek hızlı çoklu eksitasyonlu spektrofotometre, optimizasyonu ve kalibrasyonu yapılarak öncelikle hücre kültürü ile yaptığımız çalışmalara hazır hale getirilmiştir (Fotoğraf 5.1, Şekil 5.3).

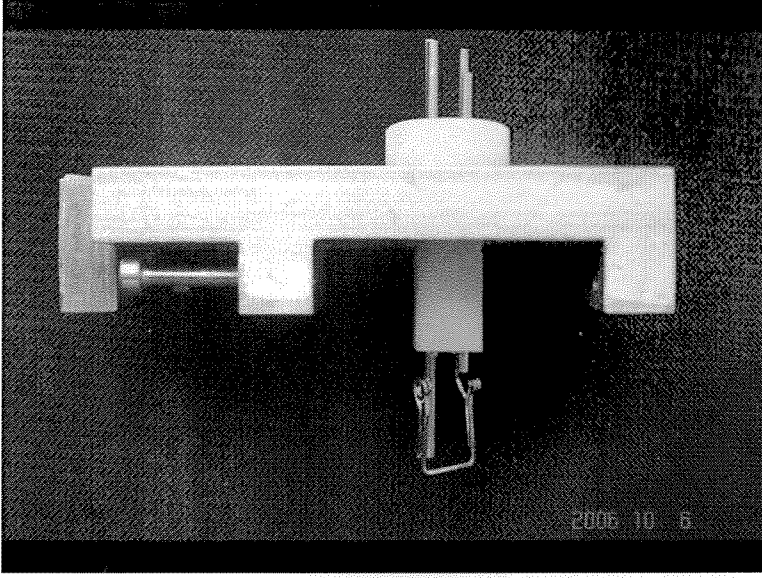
Bu amaçla 24 hazneli petri plağı içine yerleştirilen dairesel polistiren lameller üzerine ekilen kontrol ve siRNA (Bölüm 5.3) uygulaması yapılan hücreler kullanılmıştır. Hücreler tampon çözeltisi (HEPES-Buffered Saline, HBS: 135 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM $MgCl_2$, 1.5 mM $CaCl_2$, 11.6 mM, 5 mM $NaHCO_3$, ve 11.5 mM glukoz, pH:7.3, 25°C, (FAN, 2000) ile yıkanan hücreler karanlıkta 5 μ M fura-2/AM (fura-2 tetra-asetoksi metil ester) ve 0.02% pluronik (Fura-2/AM'nin inkübasyon çözeltisinde dağılımını sağlayan deterjan) içeren %1 BSA/HBS çözeltisi ile 60 dak inkübe edilmiştir. Spesifik olarak Ca^{+2} iyonuna afinite gösteren fura-2 AM, hücre membranından geçtikten sonra AM ester grubu sitozolik esterazlarla uzaklaştırılır. Fura-2'nin serbest halde iken eksitasyon sinyali 380 nm iken Ca^{+2} bağlandığında 340 nm'ye kayar ve 510 nm'de alınan emisyonun şiddeti Ca^{+2} konsantrasyonu ile orantılı olarak artış gösterir. Inkübasyon sonrası 15 dk arayla 2 defa %1 BSA/HBS çözeltisi ile yıkanan lameller çelik mandal ile sabitlenerek spektrofotometre küveti içine yerleştirilmiştir.



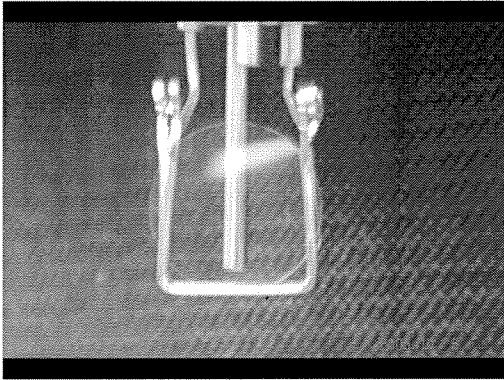
Fotoğraf 5.1. Spektrofluorometre sistemi. 300-600 nm arasında on farklı eksitasyonu 3 milisaniye aralıklarla oluşturabilen cihaz kullanılarak kalsiyuma spesifik bir florofofor olan fura-2/AM inkübe edilmiş hücre kültürlerinde ve canlı dokuda hücre içi Ca^{+2} konsantrasyon değişimleri gerçek zamanlı olarak izlenmiştir. (Soldan sağa: oksijen tankı, küveti ve ilaç çözeltilerini sabit sıcaklıkta tutulmasını sağlayan sirkülatörlü su banyosu, yüksek doğrulukta çalışan peristaltik pompa, fluorometre örnek kompartımanı, emisyon monokromatörüne kenetli foton çoğaltıcı, ksenon ışık kaynağı, monitör; altta: bilgisayar ve çeşitli ara-kontrol donanımları görülmekte.)

Fotoğraf 5.3. Polistiren

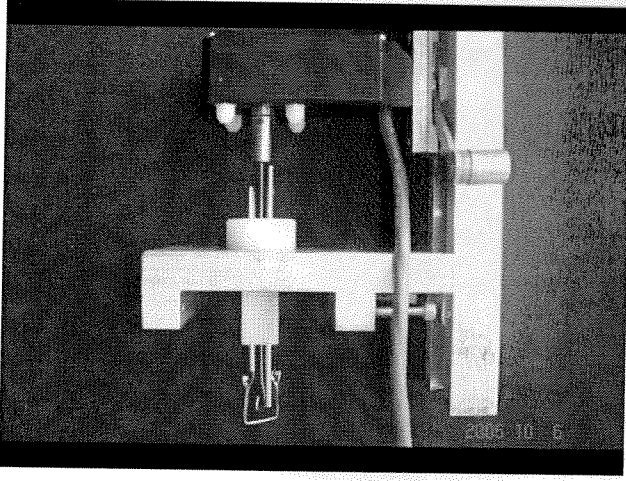
Spektrofluorometre küvet kompartımanına monte edilen gerek hücre kültürü gerekse de canlı doku kullanımına uygun hücre içi eşzamanlı Ca^{+2} /izometrik gerilim aparatı orijinal olarak tasarlanmış ve imal ettirilmiştir (Fotoğraflar 5.2 – 5.4; Şekil 5.2).



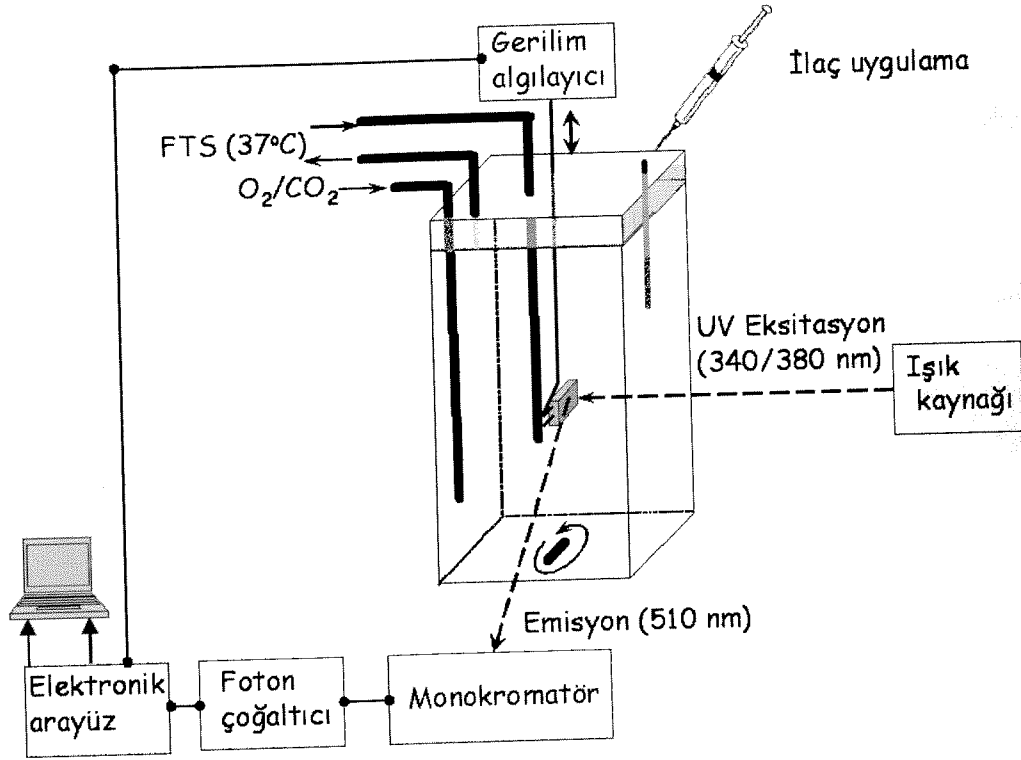
Fotoğraf 5.2. Fizyolojik tuz çözeltisi ile perfüze edilebilen polistiren dairesel lameli tutan mandal sistemi taşıyan spektrofotometre küvet tutucusu. Tüm parçalar PTI QM8/2005 spektrofluorometre cihazına adapte olacak şekilde tasarlanmıştır. (Ölçek: 1/1)



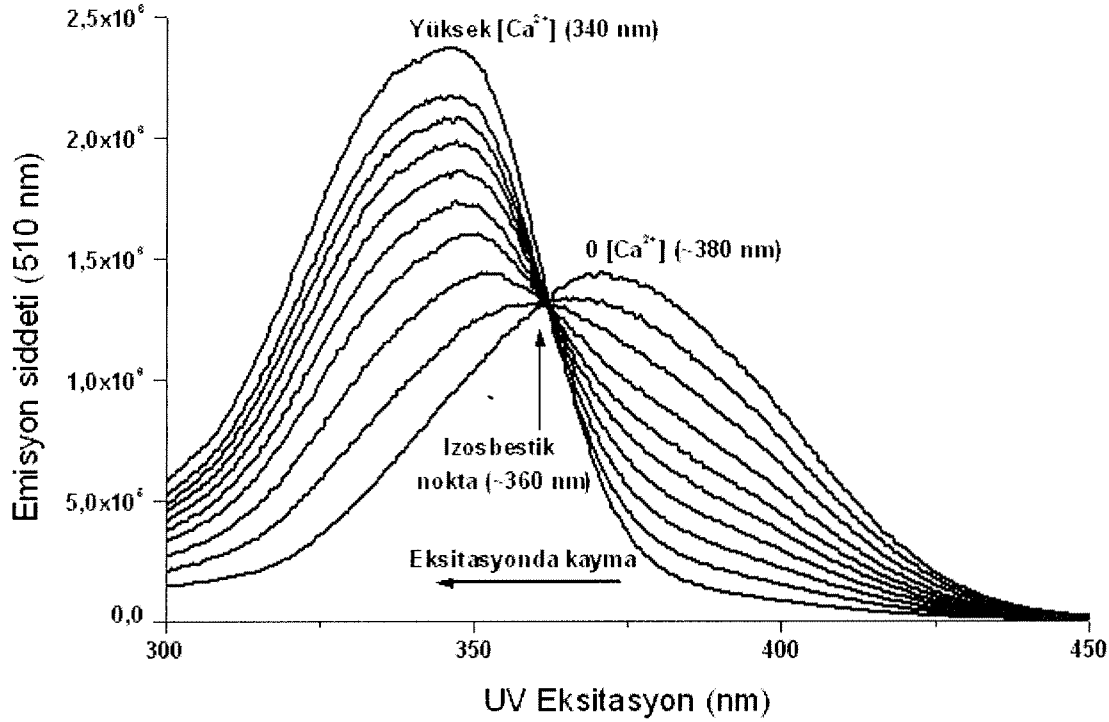
Fotoğraf 5.3. Polistiren lamel ve çelik mandal sistemi. Üzerinde A7r5 hücre kolonileri olan 1,2 mm çapındaki lamel önce çelik mandal ile sabitlendikten sonra spektrofluorometre küveti içine yerleştirilmektedir. (Ölçek: 2x)



Fotoğraf 5.4. İzole damar dokularında eşzamanlı hücre içi Ca^{+2} ve izometrik kasılma ölçüm aparatı. Küvet tutucunun üzerindeki damar düz kasındaki izometrik gerilimleri izlemede kullanılan transdüsör sağ tarafta özel bir kızak sistemine hassas bir şekilde monte edilmiştir. Kızak üstündeki (resim dışında) mikrometre tarafından pozisyonu ince bir şekilde ayarlanabilmektedir.(Ölçek ½)



Şekil 5.2. İzole canlı damar dokusunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun ve gerilimlerdeki değişimlerin eşzamanlı ölçülmesinin şematik gösterimi. Aparat her deneyde değiştirilen ultraviyole ışığa geçirgen özellikte polimetilmetakrilat (1x1x5 cm) spektrofotometre küvetine uyumlu olarak 2 ml kapasitesinde kapalı sistem bir izole organ banyosu gibi çalışmaktadır. Hücre kültürü için olan adaptörde transdüsiye bağlantılı doku tutucu kancalar yerine mikroskop lamelini sabitleyen bir aparat bulunmaktadır.



Şekil 5.3. İki dalga boyu arasındaki eksitasyon kaymasının ve Ca^{2+} indikatörünün testi.

Kalibrasyon kiti (Calcium Calibration Buffer Kit 3, C6775, Molecular Probes) ile Ca^{2+} konsantrasyonundaki hassas artışlara (0-0.017-0.038-0.065-0.100-0.150-0.225-0.351-0.602-1.350 μM) duyarlı fura-2 (iyonik yapıda) molekülünün eksitasyon spektrumundaki değişim. Fura-2'nin izosbestik noktası olan 360 nm'deki eksitasyonu Ca^{2+} iyon konsantrasyonuna duyarlı olmadığından 510 nm dalga boyundaki emisyonunda değişiklik olmaması, Ca^{2+} varlığında ise eksitasyon dalga boyunun 380 nm'den 340 nm'ye kayarken artan Ca^{2+} konsantrasyonuna bağlı olarak 510 nm'deki emisyonunun şiddetinin artması cihazın sağlıklı çalıştığını göstermektedir.

Spektrofluorometri yönteminde kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar ve hazırlanma koşulları **Tablo 5.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1. Spektrofluorometri yönteminde kullanılan kimyasallar. DS, distile su; DMSO, dimetilsülfoksit; PBS, fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su.

Ajan adı	Üretici	Stok / Çözücü	Final Konsantrasyonu
BSA	Sigma	%2 / PBS	%0,1
Fura-2/AM	Molecular Probes	10^{-3} M / DMSO	5×10^{-6} M
Pluronic asit	Molecular Probes	%20 / DMSO	%0,02
Siklopiazonik asit	Sigma	10^{-2} M / DMSO	10^{-5} M
Serotonin	Sigma	10^{-1} M / DS	10^{-6} M

5.2 Hücre kültürü

Avrupa Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan (ECACC) satın alınan A7r5 hücreleri (sıçan, DB1X, embriyonik torasik aort hücre hattı) DMEM/Ham's F12 (%5 FBS + %1 Penisilin, streptomisin) ile beslendi. %80 yoğunluğa (confluency) ulaştığında 1:2 oranında pasajlanan hücrelerin kayıtları tutularak stok durumu ve pasaj noları takip edildi. *In vitro* gen susturma çalışmalarına başlamadan önce farklı RNA izolasyon kit ve protokolleri kullanılarak hücrelerden izole edilen RNA verimini arttırmaya yönelik ön çalışmalar yapıldı ve susturmayı hedeflediğimiz TRPC1'in mRNA'sının varlığı doğrulandı.

5.3 Post-transkripsiyonel gen susturma

Bu amaçla TRPC1 küçük müdahale edici RNA (small interfering RNA, siRNA) oligomerleri ve transfeksiyon ajanı (siGENOME ON-TARGETplus, DharmaFect2, Dharmacon) kullanıldı. Gen susturma çalışmalarında kullanılan siRNA dizileri ve TRPC1 transkripti (mRNA) üzerinde eşleştikleri bölgeler **Tablo 5.2'de** gösterilmiştir.

Tablo 5.2. TRPC1 siRNA dizileri ve transkript üzerinde eşleştikleri bölgeler

Dizi adı	Dizinin nükleotid içeriği
A	Sense GAA CAU AAA UUG CGU AGA UUU Antisense AUC UAC GCA AUU UAU GUU CUU
B	Sense GGA CUA CGG UUG UCA GAA AUU Antisense UUU CUG ACA ACC GUA GUC CUU
C	Sense GAA UUU AAG UCG UCU GAA AUU Antisense UUU CAG ACG ACU UAA AUU CUU
D	Sense UGA ACU UAG UGC UGA CUU AUU Antisense UAA GUC AGC ACU AAG UUC AUU
TRPC1 mRNA	NM_053558, 4015 bç
	<pre> 1 etgccccgt cctgggccc gatgatggcg gccotgtacc cgagcacgga cctctctggc 61 gtctcctcct cctccctgcc ttctcccoca tctctctcat cgcccaacga agtgatggcg 121 ctgaaggatg tgcgagaggt gaaggaggag aacaccttga atgagaagct tttcttgctg 181 gctgcccaca agggtgacta ttatatggtt aaaaagattt tggaggaaaa cagttcaggt 241 gacttgaaca taaattgcgt agatgtgott gggagaaatg ctggtaccat aactattgaa 301 aacgaaagct tggatatact gcagctgott ttggactaog gttgtcagaa aactatggaa 361 cgaattcaga atccggaata ctcaacaaca atggatgttg caccagttat ttagctgct 421 categtaaca actatgagat cctcacaatg cttctgaagc aggacgtggc ttgcccgaag 481 ccccatgctg ttggtgtgga atgcacgctg tgtctgaga aaaacaaaaa ggacagcctc 541 agacattcca ggtttcgtct tgatatctat agatgtctgg ccagtcagc tetaataatg 601 ttaacagagg aggatccaat tctgagagcg ttggaactta gtgctgactt aaggaactc 661 agccttgctg aggtggaatt ctggaatgac tatgaagagc tagcccgtca gtgcaaatg 721 tttgctaag atttgcttgc gcaagctcgg aattctcgtg aactggaagt tatectaaac 781 catacateta gtgatgagcc tottgacaaa cgaggactac tagaagaaag aatgaattta 841 agtcgtctga aacttgctat caaatataac cagaaggagt ttgtctccca gtcaaatgc 901 cagcagttcc tgaacaccgt ttggttcgga cagatgtcag gttaccgccc taagcccacc 3961 gagtgaataa aatttggcat tagattataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa </pre>

bç: baz çifti.

Çalışmanın başlangıcında TRPC1 mRNA dizisinin 4 farklı bölgesine komplementer her biri 21 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidlerin, öncelikle tek başlarına daha sonra gerektiğinde susturma etkinliğini arttırmak amacıyla kombine edilmeleri planlandı. %50-70 arasında gen susturma etkinliği görülen hücrelerde işlevsel değişikliklerin saptanması ile ilgili dizinin (Tablo 5.3, Dizi A) kullanımına devam edildi. Gen susturma çalışmalarında pozitif kontrol olarak siklofilinB (CypB) siRNA, negatif kontrol olarak non-targeting (NT) siRNA kullanıldı (Tablo 5.4).

Tablo 5.3. Negatif ve pozitif kontrol siRNA dizileri

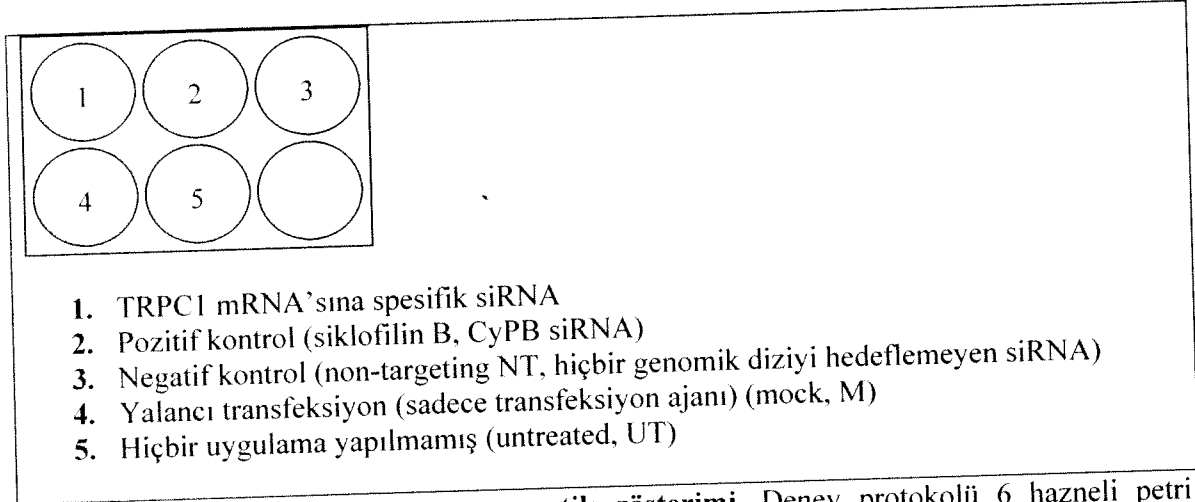
Dizi adı	Nükleotid içeriği
NT siRNA	Sense UAG CGA CUA AAC ACA UCA AUC
	Antisense UUG AUG UGU UUA GUC GCU ACU
CyPB siRNA	Sense GGA AAG ACU GUU CCA AAA AUC
	Antisense UUU UUG GAA CAG UCU UUC CUU

Gen susturma çalışmalarında kullanılan siRNA dizilerinin hedef mRNA ile eşleşip eşleşmediği BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) analizi ile kontrol edildi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=10116>; **Tablo 5.5**).

Tablo 5.4. siRNA dizilerinin BLASTN analizi

Dizi	ANALİZ SONUCU
TRPC1 siRNA (A)	<p>BLASTN 2.2.17 (Aug-26-2007) Reference: Altschul SF, TL Madden, AA Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, and DJ Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. RID: HGVD1E6M012</p> <p>Database: Rattus norvegicus RefSeq RNA 35,902 sequences; 72,405,186 total letters</p> <p>> <u>ref NM_053558.1 </u> UEG Rattus norvegicus transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1 (Trpc1), mRNA Length=4015</p> <p>Score = 38.2 bits (19), Expect = 0.001 Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <pre> Query 1 GAACATAAATTGCGTAGAT 19 Sbjct 246 GAACATAAATTGCGTAGAT 264 </pre>
NT siRNA	<p>BLASTN 2.2.17 (Aug-26-2007) Reference: Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. RID: HGYT3YXW015</p> <p>Database: rat build 4 genome database (reference and alternate assemblies) 8014 sequences; 5,387,086,425 total letters</p> <p>No significant similarity found.</p>
CyPB siRNA	<p>BLASTN 2.2.17 (Aug-26-2007) Reference: Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. RID: HH143ATR012</p> <p>Database: Rattus norvegicus RefSeq RNA 35,902 sequences; 72,405,186 total letters</p> <p>> <u>ref NM_022536.1 </u> UEG Rattus norvegicus peptidylprolyl isomerase B (Ppib), mRNA Length=840</p> <p>Score = 38.2 bits (19), Expect = 0.001 Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%) Strand=Plus/Plus</p> <pre> Query 1 GGAAAGACTGTTCCAAAAA 19 Sbjct 194 GGAAAGACTGTTCCAAAAA 212 </pre>

Yaklaşık ellibin hücre içeren 6 hazneli petri plağı içine ekilen hücelere 12 saat sonra DharmaFECT2 ile siRNA (100 nM) transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyon protokolü aşağıda belirtilen 5 farklı grupta uygulandı (Şekil 5.4):



Şekil 5.4. siRNA uygulamasının şematik gösterimi. Deney protokolü 6 hazneli petri plağında antibiyotik içermeyen besi ortamında % 70 yoğunluğa kadar çoğaltılmış A7r5 hücrelerine uygulanmıştır.

A7r5 transfeksiyon protokolü:

- 2 adet 6 hazneli petri plağında her kuyucuğa yaklaşık 50.000 hücre/ml ekim yapıldı.
- 12 saat sonra hücreler PBS ile yıkandı.
- Oligonükleotid, final konsantrasyon 100 nM olacak şekilde antibiyotiksiz besi ortamı ile karıştırıldı ve 25°C'de 5 dk inkübe edildi.
- Ayrı bir tüpte transfeksiyon ajanı (4 µl) antibiyotiksiz besi ortamı ile karıştırıldı ve 25°C'de 5 dk inkübe edildi.
- Oligonükleotid ve transfeksiyon ajanı içeren besi ortamları birbirine karıştırıldı ve 25°C'de 20 dk inkübe edildi.

- Hücrelerden PBS uzaklaştırıldı ve antibiyotiksiz besi ortamı eklendi.
- Transfeksiyon karışımı besi ortamı içine eklendi.
- 37°C'de 72 saat boyunca CO₂ inkübatörü içinde bekletildi.
- İnkübasyon sonrası PBS ile yıkanan hücrelerden RNA ve protein izolasyonu yapıldı.

Çalışmanın zorlukları: siRNA transfeksiyonunda antibiyotiksiz besi ortamının kullanılması gerekliliği ve hücrelerin 3 gün gibi uzun bir süre boyunca bu ortam içinde korunmasız olarak bulunması kontaminasyon olasılığını arttırmaktadır.

5.4 Gen susturma sonrası ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

Bu amaçla kantitatif Real Time-PCR ve WB (Western Blot) yöntemleri kullanıldı.

siRNA uygulaması sonrası TriPure izolasyon çözeltisi (TIR, TriPure Isolation Reagent, Roche) kullanılarak hücrelerden total RNA ve protein izolasyonu yapıldı. RNA konsantrasyonları 260 nm (A_{260}) eksitasyon dalga boyundaki absorbansın ölçülmesi ile hesaplandı. RevertAid First Strand cDNA Sentez kiti (MBI Fermentas) kullanılarak cDNA örnekleri oluşturuldu.

Tripure RNA izolasyon protokolü:

- Her kuyucuğa 1 ml TIR eklendi ve pipetaj yapılarak santrifüj tübüne alındı.
- 25°C'de 5 dk bekletildi.
- Her 1 ml TIR için 0,2 ml kloroform eklendi ve 15-20 sn şiddetle çalkalandı.
- 25°C'de 15 dk bekletildi.
- Çözeltiyi 3 faza ayırmak için 12000 x g'de 40 dk +4°C'de santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrasında en üstteki sulu faz yeni bir tüpe alındı.
- Her 1 ml TIR için 0,5 ml izopropanol eklendi ve alt üst çevrilerek karıştırıldı.
- 25°C'de 10 dk bekletildi.
- 12000 x g'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine 1 ml etanol (%75) eklendi ve vortekslendi.
- +4°C'de 5 dk 7500 g'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet kurutuldu ve RNAaz içermeyen su içerisinde çözündürüldü.

cDNA sentez protokolü:

cDNA sentezi Thermal Cycler PCR cihazı (Techne Genius) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- 11 µl RNA + 1 µl Primer (oligo dT) PCR tüpüne alındı.
- Hızlı santrifüj edildi.
- 70°C'de 5 dk bekletildi, buzda soğutuldu ve hızlı santrifüj edildi.
- 4 µl reaksiyon tamponu + 1 µl RNAaz inhibitörü + 2 µl dNTP karışımı ilave edildi.
- 37°C'de 5 dk bekletildi.
- Reaksiyon karışımına 1 µl "reverse" transkriptaz (RT) enzimi eklendi.
- Sırasıyla 42°C'de 60 dk ve 70°C'de 10 dk bekletildi.

Tripure protein izolasyon protokolü:

- RNA izolasyon protokolündeki ilk 6 basamak uygulandı.
- Santrifüj sonrası oluşan üst faz RNA izolasyonunda kullanılmak üzere ayrıldıktan sonra tüpte kalan orta ve alt faz protein izolasyonunda kullanıldı.
- Her 1 ml TIR için 0,3 ml etanol (%100) eklendi ve alt üst yaparak karıştırıldı.
- 25°C'de 3 dk bekletildi.

- 5 dk +4°C'de santrifüj (2000 g) edildi.
- Süpernatant alındı ve üzerine her 1 ml TIR için 1,5 ml izopropanol eklendi ve alt üst yaparak karıştırıldı.
- 25°C'de 10 dk bekletildi.
- 5 dk +4°C'de santrifüj (12000 g) edildi. (Bu aşamada protein pelleti oluşur)
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine 1 ml guanidin HCl (0.3 M %95 etanol içinde) eklendi ve alt üst yaparak karıştırıldı.
- 25°C'de 20 dk bekletildi.
- +4°C'de 5 dk santrifüj (7500 g) edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Son 3 basamaktaki işlemler (guanidin yıkaması) 2 defa daha tekrarlandı.
- Pellet üzerine 1 ml etanol (%100) eklendi ve vortekslendi.
- 25°C'de 20 dk bekletildi.
- +4°C'de 5 dk santrifüj (7500 g) edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet kurutuldu ve %1 SDS içinde çözündürüldü.
- +4°C'de 10 dk santrifüj (10000 g) edildi ve süpernatant yeni bir tübe alındı.
- İzole edilen proteinler -80°C'de saklandı.

Kantitatif RT-PCR:

Kantitatif RT-PCR (Light Cycler, Roche) çalışmaları FastStart DNA Master SYBR Green I kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kullanılan primer dizilerin (**Tablo 5.7**) hedeflediği gen bölgelerinin türler arasındaki korunmuşluğu göz önüne alınmıştır. BLASTN analizi ile de primerlerin hedef gene spesifik oluşları kontrol edildi. Her bir primer için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen koşullar ve PCR karışımlarının içeriği sırasıyla **Tablo 5.5** ve **Tablo 5.6**'da verilmiştir.

PCR ürünlerinin doğruluğu ergime eğrisi analizinin yanı sıra agaroz (%2) jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Light Cycler deney protokolü:

		Programlar							
		I. Denatürasyon	II. Amplifikasyon			III: Ergime Eğrisi		IV. Soğutma	
Analiz modu	-		Kantitasyon			Ergime eğrisi		-	
Döngü sayısı	1		50			1		1	
		Segmentler							
			1	2	3	1	2	3	
Hedef sıcaklık (°C)	95	95	*	72	95	50	99	40	
İnkübasyon süresi	10 dk	10 sn	10 sn	*	0 sn	15 sn	0 sn	30 sn	
Sıcaklık değişimi (°C/sn)	20	20	20	20	20	20	0.2	20	
Analiz modu	-	-	-	tek	-	-	Sürekli	-	

*Tablo 5.5'e bakınız.

Tablo 5.5. Primerlerin optimizasyon koşulları; bağlanma sıcaklıkları, MgCl₂ konsantrasyonları ve uzama süreleri

Gen	Bağlanma (°C)	MgCl ₂ (mM)	Uzama (sn)
<i>TRPC1</i>	57	2	19
<i>TRPC3</i>	58	1	17
<i>TRPC4</i>	57	2	19
<i>TRPC5</i>	54	2	19
<i>TRPC6</i>	57	2	15
<i>Siklofilin</i>	57	1	15

Tablo 5.6. PCR karışımının hazırlanması

* LightCycler FastStart enzim karışımı: Enzim (1a) + Reaksiyon karışımı (1b).

Bileşenler	x2 hacim (µl)	Final konsantrasyon (mM)
H ₂ O	12,4 / 13,2	-
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 / 0,8	2 / 1
İleri primer (10 µM)	1	0,5
Geri primer (10 µM)	1	0,5
Enzim karışımı*	1	-
cDNA	2	-
Toplam:	20	

Tablo 5.7. PCR'da kullanılan primer dizileri

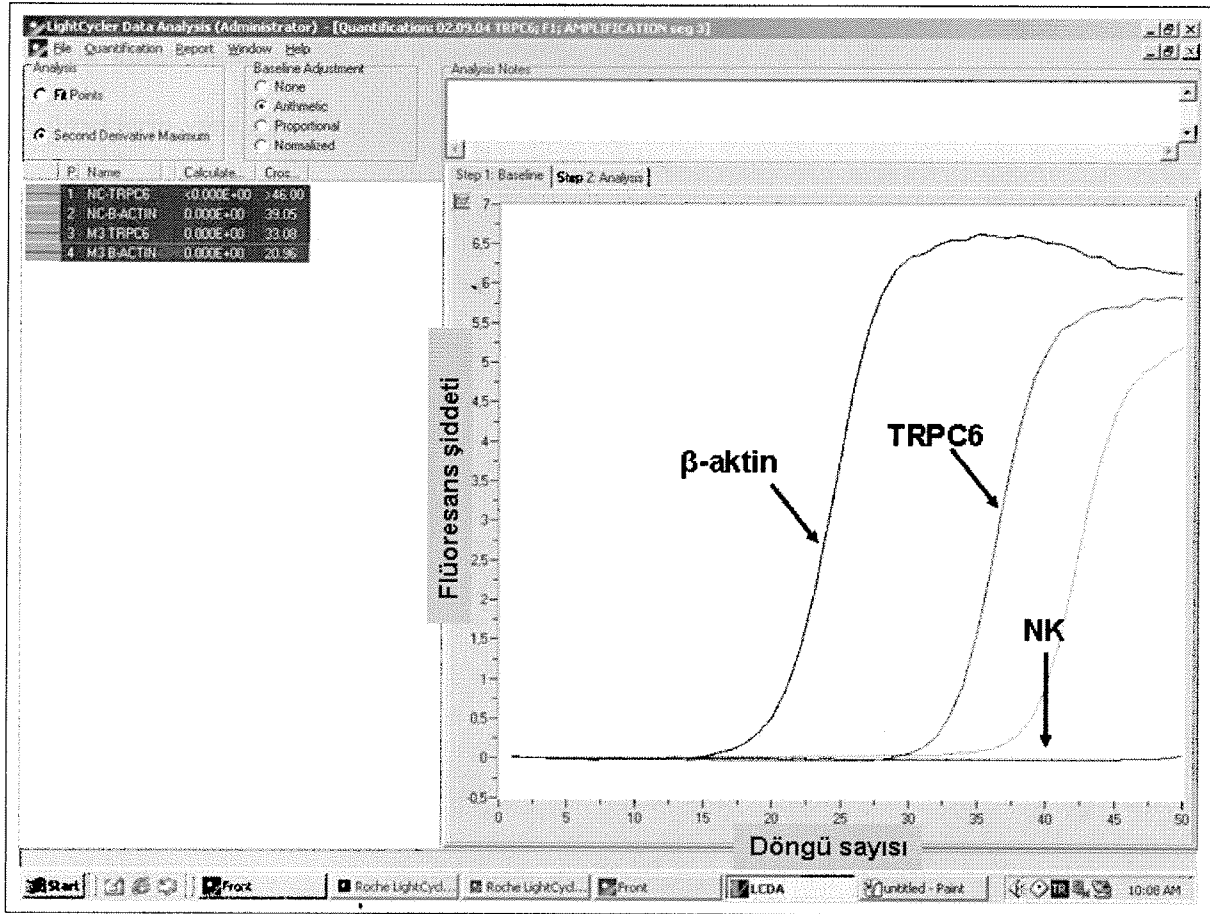
Gen		Primer dizisi (5'-3')	Yerleşim	Ürün (bp)
<i>rTRPC1</i>	İleri	TGG TAT GAA GGG TTG GAA GAC	1300-1321	410
NM_053558	Geri	TGC TGT TCA CAG AAG ATG CC	1689-1709	
<i>rTRPC3</i>	İleri	ATG CTG CTT TTA CCA CGG TTG	1568-1588	226
NM_021771	Geri	ACA TCA CTG TCA TCC TCG ATT TC	1767-1790	
<i>rTRPC4</i>	İleri	CTG CAG ATA TCT CTG GGA AGA	1562-1582	412
NM_053434	Geri	GCT TTG TTC GAG CAA ATT TCC	1953-1973	
<i>rTRPC5</i>	İleri	GCA ATC AAA TAT CAC CAG AAA	1208-1229	271
NM_080898	Geri	GGA GAA GCA TGA AGA GGA AGG	1457-1478	
<i>rTRPC6</i>	İleri	GAT ATC TTC AAA TTC ATG GTC ATA	1894-1918	321
NM_053559	Geri	ATC CGC ATC ATC CTC AAT TTC	2193-2214	
<i>rβ-actin</i>	İleri	AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT	851-870	244
NM_031144	Geri	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TT	1075-1094	
<i>rCyPB</i>	İleri	GGG CTC CGT TGT CTT CCT TT	55-74	345
NM_022536.1	Geri	CCA TAG TGC TTC AGC TTG AAG TTC T	375-399	

Kantitatif RT-PCR'de miktar tayini

SYBR Green boyalar çift sarmal DNA'nın küçük oyuklarına bağlanırlar. Bağlanma ile birlikte flüoresans şiddeti de artar. PCR'nin farklı fazlarında var olan çift sarmal iplikli DNA'nın miktarına bağlı olarak farklı flüoresans sinyalleri belirlenmektedir (**Şekil 5.5**). PCR'nin denatürasyon döngüsünden sonra tüm DNA'lar tek sarmal hale gelirler. Reaksiyonun bu aşamasında SYBR Green I boya DNA'ya bağlanamaz ve flüoresan sinyalinin şiddeti çok düşüktür. PCR primerlerinin hedef diziye bağlandığı aşamada (annealing) küçük miktarda çift sarmal DNA oluşur ve bunlara boyanın bağlanması ile flüoresan şiddeti artar. Uzama fazında (elongation) PCR primerleri uzar ve daha fazla SYBR Green I boyanın bağlanması ile flüoresan daha da artar. Uzama fazının sonunda tüm DNA'lar çift-sarmal hale gelirler ve boyanın maksimum miktarı bağlanır. Fluoresans uzama fazının sonunda kaydedilir (530 nm'de) ve PCR ürününün artan miktarları döngü-döngü izlenebilir. Fluoresans şiddetinin artışının başlaması hedef dizinin başlangıçtaki konsantrasyonuna bağlıdır. Hedef dizinin olmadığı negatif kontrolde de sinyal artışı gözlenebilir. Bunun sebebi boyanın primerlerin kendi kendine bağlanması ile oluşan dimerik yapılara bağlanması olabilir.

PCR ürününün miktarı platoya ulaşmadan önce ilk PCR döngülerinde logaritmik olarak artmaktadır. Örnek konsantrasyonunun (kopya sayısının) doğru olarak belirlenebilmesi için sadece bu ilk döngüler göz önünde tutulmalıdır. Daha ileri PCR döngüleri PCR ürününün final miktarını belirlerken, başlangıç konsantrasyonu konusunda bilgi vermez. Döngülerin her birinin görüntülenmesi PCR'nin hangi döngüde log-lineer fazda olduğunu kesin olarak belirler. Her döngüde PCR ürününün miktarı iki katına çıkar. Bu fazda sinyal kolaylıkla arka plandaki sinyalden ayrılabilir. Böylece hedef dizinin başlangıç konsantrasyonu hakkında

doğru bilgi almır. Şekil 5.5'te görüldüğü gibi PCR'nin log-lineer fazında sinyal şiddetinde belirgin farklılıklar görülebilirken, izleyen plato fazında sinyallerin ayırt edilmesi zordur.

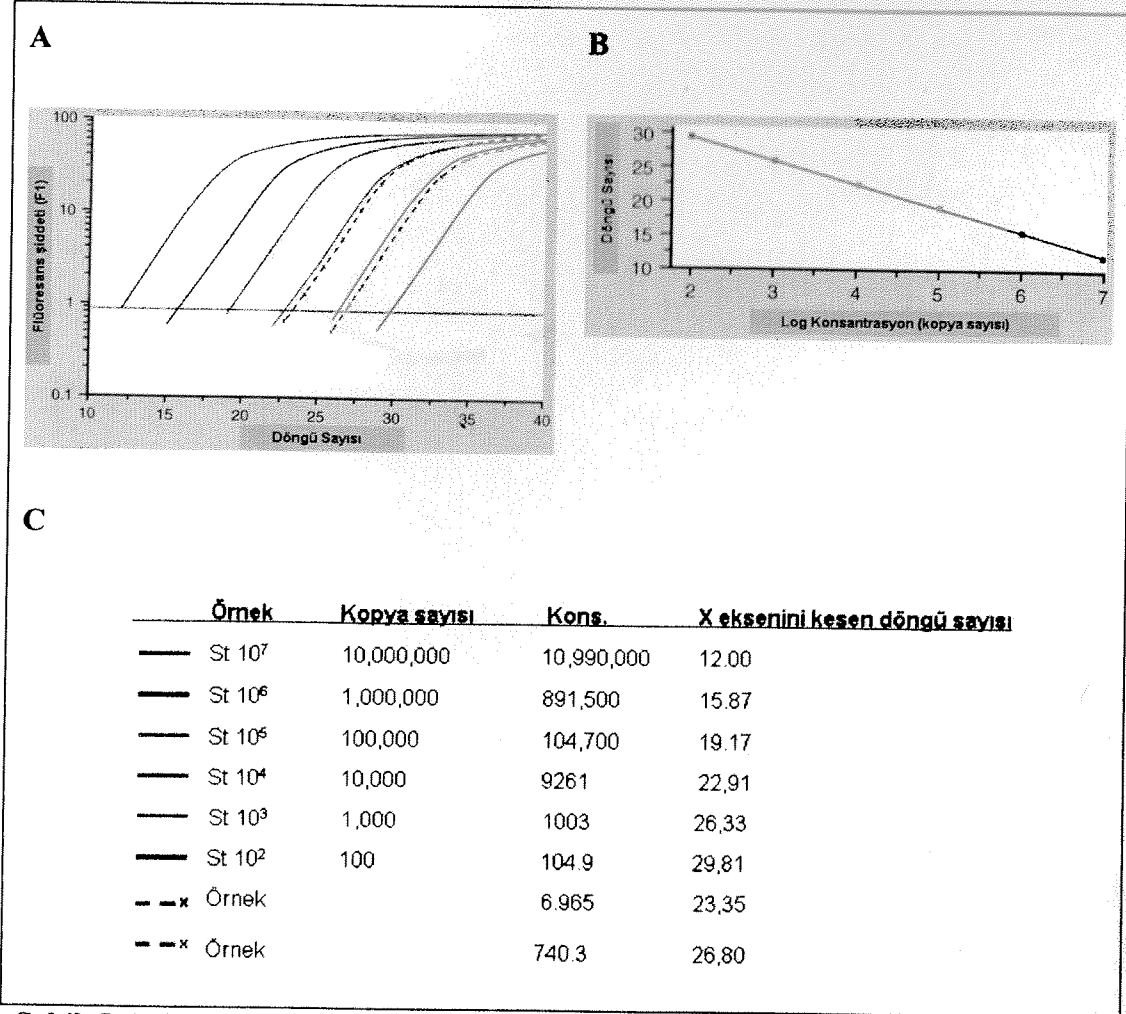


Şekil 5.5. TRPC6 ve β -aktin genleri için amplifikasyon süresince flüoresan emisyonundaki artış. Hedef genlerin amplifikasyonu ilerledikçe, çift-sarmal DNA'ya bağlanan, 470 nm'de uyarılan SYBR Green I boyanın 530 nm'deki flüoresan emisyon şiddeti de artar. Eğrinin logaritmik faza girdiği döngü sayısı cDNA örneğinde hedef gene ait kopya sayısı hakkında bilgi verir. Logaritmik faza önce girmesi o genin örnekte daha fazla olduğunu göstermektedir. Örnek grafikte görüldüğü gibi ev sahibi (house-keeping) gen olan β -aktin beklendiği gibi TRPC6'ya göre çok daha erken bir döngüde logaritmik faza girmiştir.

Standart eğrinin çizimi

Standart kontrol gen olarak β -aktin'in (yapısal "house-keeping" gen) plazmide klonlanmış cDNA'ları kullanıldı. Ticari olarak alınan ve 10^{10} kopya β -aktin cDNA (plazmid DNA) içeren stok kullanılarak steril distile su ile dilüsyon (10^8 - 10^2) serileri hazırlandı. Her bir PCR'da örneklerin yanı sıra 3 farklı standart dilüsyonu ile çalışıldı. Standart dilüsyonları kullanılarak her çalışmaya özel çizilen eğriler ile hedef transkriptin konsantrasyonu hesaplandı.

Her bir TRPC geni için daha önceden ayrı ayrı optimize edilen real-time PCR koşullarında final konsantrasyon 10^7 - 10^2 kopya olacak şekilde seri dilüsyonlar kullanılarak PCR gerçekleştirildi. PCR tamamlandıktan sonra LC yazılımı her bir örnekteki hedef genin kopya sayısını döngü sayısına karşılık flüoresan emisyon şiddeti kullanılarak çizilen logaritmik eğri ile belirler. Diğer bir deyişle her bir standartın lineer logaritmik faza girdiği döngü sayısı yani x-eksenini kestiği noktalar belirlenir. X ekseninde standart konsantrasyonlarının logaritmlarına karşılık döngü sayısı (Y eksen) ile grafik oluşturulması sonucunda standart eğri çizildi (Şekil 5.6). Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler ile PCR işlemi sonunda her gen için ayrı ayrı çizilen bu standart eğriler ile konsantrasyon hesabı yapıldı.



Şekil 5.6. Standart eğri çizimi ve grafikleri. A: Döngü sayısına karşılık flüoresans (F1) şiddetindeki logaritmik artışın eğrisi. B: Standartların logaritmik konsantrasyonlarına karşılık logaritmik faza girdikleri döngü sayıları ile çizilen doğru (standart). C: Örneklerin hesaplanan konsantrasyonları. Her bir örnekteki TRPC genlerinin nicel oranı kendi kalibrasyon eğrilerine göre belirlendikten sonra bu değerler aynı örnekteki β -aktin referans genine normalize edildi. Kons.: ölçülen konsantrasyon (kopya sayısı).

$$\text{Nicel oran} = \text{TRPC}_x \text{ gen kopya sayısı} / \beta\text{-aktin (referans gen) kopya sayısı}$$

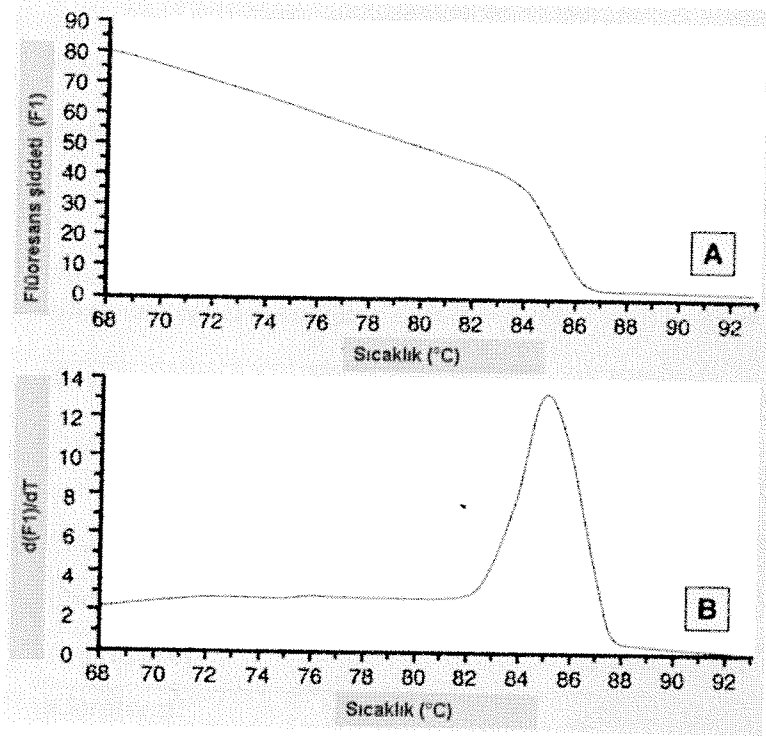
Ergime eğrisi analizi

Her bir çift sarmal DNA ürünü kendine özel ergime sıcaklığına (T_m) sahiptir. T_m DNA'ların %50'sinin tek sarmal hale geldiği diğer yarısının çift sarmal halde kaldığı sıcaklık olarak tanımlanmaktadır. Çift sarmal DNA'nın T_m 'sini belirleyen en önemli faktörler uzunluk ve içerdiği GC sayısıdır. Son PCR döngüsünden sonra ürünler 95°C'de denatüre edilir, daha sonra 50°C'de bağlanırlar. Bu aşamadan sonra 50'den 99°C'ye kadar yavaşça ısıtılırlar. Flüoresans şiddeti her 0.2°C'lik sıcaklık artışları süresince ölçülür. Fragman denatüre olduğu için çift sarmal ürüne bağlı boyanın flüoresans şiddeti (F1) giderek düşer (**Şekil 5.7A**). Bu fragmanın T_m 'si ergime eğrisinin birinci negatif türevinin ($-dF/dT$) alınması ile kolaylıkla hesaplanabilir. Bu ergime eğrisinin dönme noktası $-dF/dT$ eğrisinin pik yaptığı noktayı gösterir (**Şekil 5.7B**).

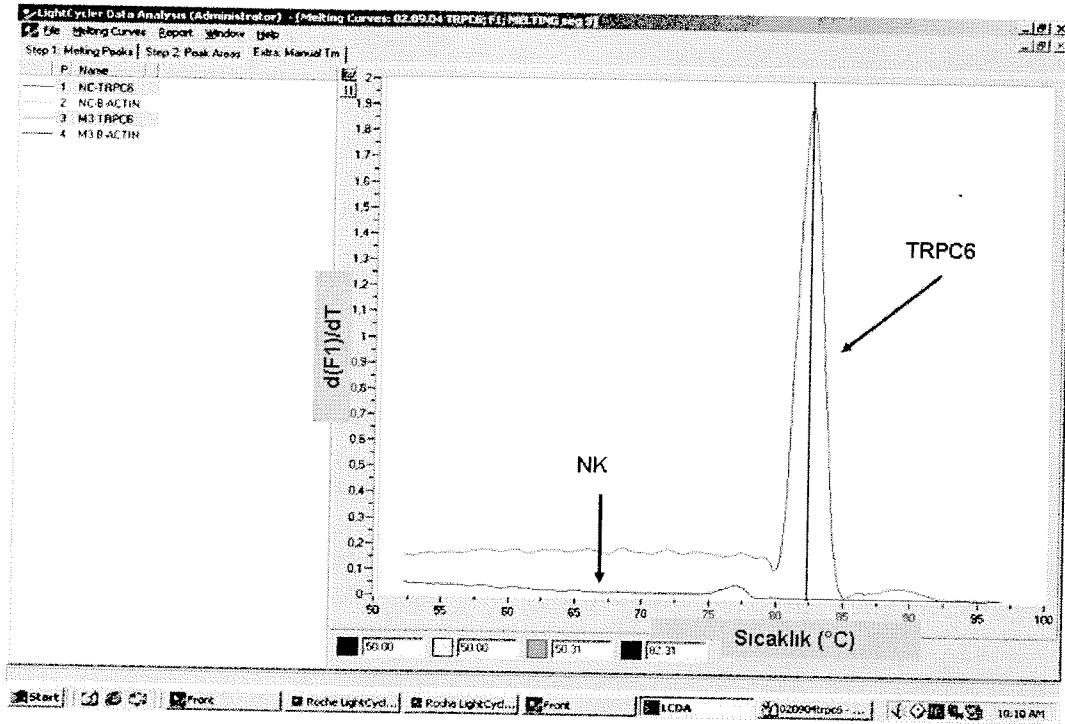
SYBR Green I boyası ile PCR ürününün T_m 'sinin belirlenmesi (**Şekil 5.8**),

- PCR ürününün belirlenmesini
- Spesifik PCR ürününün primer-dimer gibi spesifik olmayan ürünlerden ayrılmasını sağlar.

PCR ürününün T_m kontrolü jel elektroforezinde ürünün uzunluğunun kontrol edilmesi ile karşılaştırılmalıdır. Bu amaçla tüm PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek ürün büyüklüğünün ve bütünlüğünün sağlanması yapıldı.



Şekil 5.7. PCR ürünün ergime eğrisi analizi. A: Denatürasyon sonucu flüoresans şiddetinde görülen azalma. B: Emisyonun zamana bağlı değişimi.



Şekil 5.8. Hedef gene (TRPC6) spesifik PCR ürününe ait ergime eğrisi analizi. NK, negatif kontrol.

RNA izolasyonu, cDNA sentezi, RT-PCR ve elektroforezde kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar **Tablo 5.8**'de gösterilmiştir.

Tablo 5.8. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR'da kullanılan kimyasal madde/ cihaz ve üretici firmalar

Ürün ve Cihaz	Üretici
Agaroz	Applichem
cDNA Synthesis kit for RT-PCR	Roche Applied Science
Etanol	Applichem
Etidyum bromür (EtBr)	Applichem
İzopropanol	Applichem
Kloroform	Merck
Konvansiyonel PCR (Thermal Cycler)	Techne
LC FastStart DNA master SYBR Green I	Roche Applied Science
LC Sample Capillaries (20 µl)	Roche Applied Science
Otomatize PCR (Light Cycler 2.0)	Roche Applied Science
TriPure RNA Isolation Reagent	Roche Applied Science

5.5 Western blot

siRNA uygulaması sonrası hücrelerden izole edilen proteinlerin konsantrasyonu 280 nm (A_{280}) eksitasyon dalga boyundaki absorbansın spektrofotometrik (ND-1000, NanoDrop) olarak belirlenmesi ile hesaplandı ($1 A_{280} = 1 \text{ mg/ml}$). Pozitif kontrol olarak sıçan beyin dokusundan izole edilen protein örneği kullanıldı. Protein örnekleri her kuyucukta 20 µg protein olacak şekilde jele yüklendi ve SDS-PAGE yapıldı. Elektroforez sonrası proteinler, iBlot Transfer cihazı (Invitrogen) kullanılarak membrana aktarıldı. Membran 1 saat (%5 süt tozu, TBS-T içinde) bloklandıktan sonra 1/1500 β-aktin ve 1/200 TRPC1, TRPC6 (anti-rabbit, Chemicon) primer antikorları ile 4°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. TBS-T ile 4 defa yıkama yapıldı. Sekonder antikor (1/1500, HRP konjuge donkey anti-rabbit, Santa Cruz) ile

25°C'de 1 saat inkübe edildi. TBS-T ile yıkama sonrasında, ECL Plus Detection Reagent (Amersham) kullanılarak oluşan kemilüminesans görüntülendi (Kodak GelLogic 1500).

5.6 İmmünoflüoresan boyama ve immünoflüoresans (IF) mikroskopisi

siRNA uygulaması sınırlı sayıda hücre içeren petri plaklarında yapıldığından Western blot analizi için yeterli miktarda protein izole edememe riski oluşmuştur. Bu nedenle TRPC1 proteininin A7r5 hücrelerindeki dağılımını IF mikroskopisi ile belirlemeyi amaçladık. Yöntemin optimizasyonunu takiben siTRPC1 uygulanan hücrelerde de IF yapılması planlandı. Bu amaçla hücreler 50.000 hücre/ml yoğunlukta lamel üzerine ekilerek gece boyu 37°C'de inkübe edildi. %4 paraformaldehit ile fikse edildikten sonra %0,2 Triton-X100 içeren PBS ile 15 dk inkübe edilerek permeabilize edildi. %1 BSA içeren PBS ile bloklama yapıldıktan sonra TRPC1 primer antikor (1/50) ile 60 dakika, flüoresan işaretleyici (Alexafluor-484) ile konjuge sekonder antikor (1/150) ile 20 dakika inkübe edildi. Lam üzerine yapıştırma solüsyonu ile kapatılarak görüntülendi (**Şekil 5.9**). Ancak, erişilen gen susturma etkinliğinin düşük oluşu nedeniyle IF çalışmaları TRPC1'in vasküler düz kas hücresindeki yaygın dağılımını göstermenin ötesine geçememiştir.



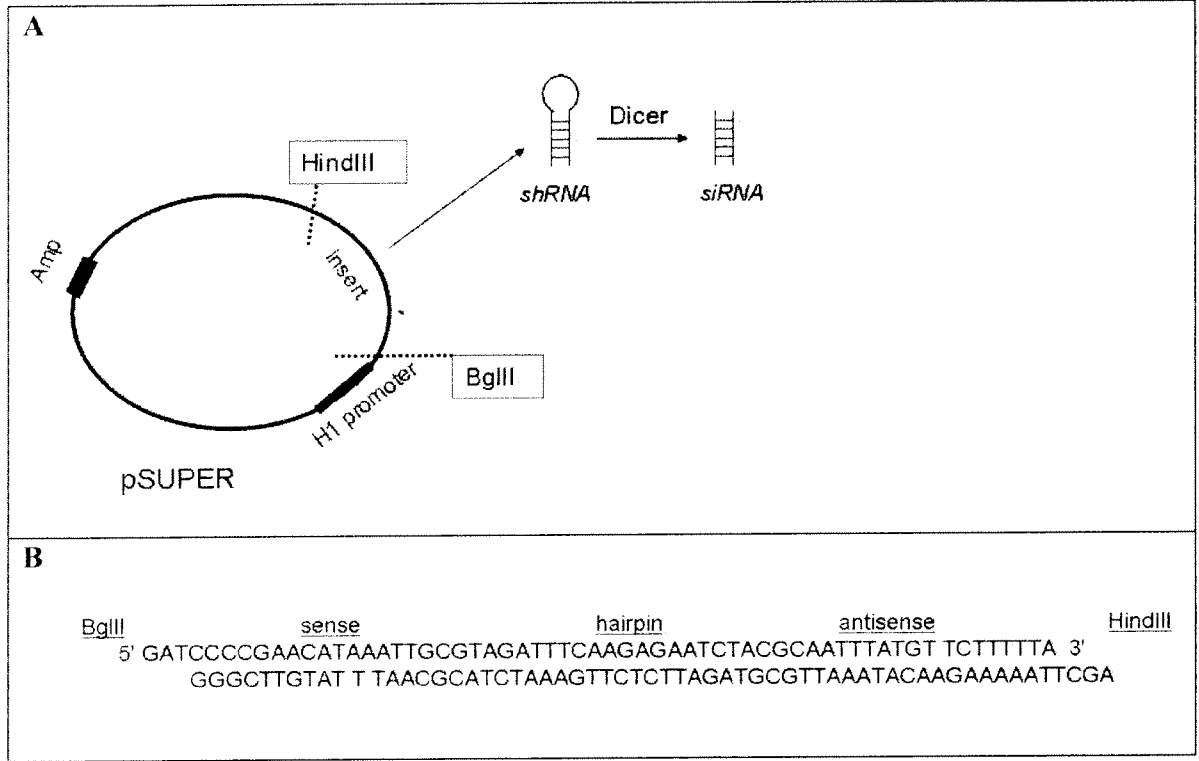
Şekil 5.9. A7r5 hücrelerinde TRPC1 protein dağılımı. Floresan mikroskopi görüntülerinde DAPI ile etkileşen DNA hücre çekirdeğini mavi renkte boyamakta, TRPC1 primer antikoruna bağlanan Alexa Fluor 484-işaretli sekonder antikorlar ise kırmızı renkte görülmektedir.

5.7 *In vivo* gen susturma amaçlı ön çalışmalar

5.7.1 Hücre içinde siRNA oluşturan plazmid vektör tasarımı ve klonlanması

Dharmacon firmasından satın alınan 21mer uzunluğundaki siRNA oligonükleotidleri hızla enzimatik degradasyona uğramaları nedeniyle *in vivo* kullanıma uygun değildir. Bu nedenle *in vivo* gen susturma amacıyla yüksek düzeyde ve stabil siRNA ekspresyonu sağlayan vektör-aracılı siRNA uygulama (shRNA, short hairpin RNA) çalışmaları planlandı. Bu amaçla öncelikle oligonükleotidler plazmid vektör içine yerleştirildikten sonra bakteriyel klonlama ile çoğaltılmasına çalışıldı. İlk aşamada, Brummelkamp (BRUMMELKAMP, 2002) tarafından tanımlanan ve gen ekspresyonunun kalıcı olarak baskılanmasını sağlayan pSUPER siRNA ekspresyon vektörü (Yrd. Doç. Dr. E. Erdal, DEÜ) sağlandı. Ayrıca vektör içine

yerleştirilmek üzere TRPC1 mRNA'sına komplementer insert dizi (DNAEngine, Seattle, ABD) sentezlettilirdi. (Şekil 5.10).



Şekil 5.10. pSUPER vektör ve eklenecek "insert" dizi. Plazmid vektör üzerinde enzim kesim yerleri (A) ve vektöre eklenecek siRNA dizisini kodlayan dizi (B) görülmektedir.

pSUPER klonlama basamakları:

1. İlgili geni hedefleyen diziyi içeren sense ve antisense oligoların dubleks hale getirilmesi (annealing),
2. pSUPER.retro.neo vektörün BglIII ve HindIII ile lineer hale getirilmesi,
3. Annealed oligoların vektör içine klonlanması,
4. Bakteriyel transformasyon.

İnsert dizinin hazırlanması: pSUPER vektör içine yerleştirmek amacıyla *in vitro* çalışmalarımızda %50-70 susturma sağlayan oligonükleotid diziden yola çıkarak 5' ve 3'

uçlarında BglII ve HindIII kesim bölgeleri ve hairpin bölgesi içe
5.10). Her biri 60 nükleotid boyundaki tek zincir “sense” ve “
60mer) sentez ettirildi (OligoEngine). Bu diziler birbirleri ile
ucunda BglII ve 3’ ucunda HindIII kesim bölgesi bulunan çift zi
Annealing protokolü:

- “Annealing” tamponu (100mM NaCl, 50 m sterilizasyonu) hazırlandı.
- 48 µl “annealing” tamponu içine 1 µl “sense” (3 n mg/ml) ilave edildi.
- Reaksiyon karışımı önce 90°C’de 4 dk sonra 70°C’
- Kademeli olarak (her 5 dakikada 10°C azalmalarla)
- Tek zincir diziler ve “annealed” dizi PAGE (%12)

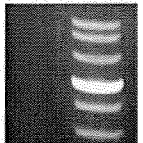
A

sense
antisense
annealed



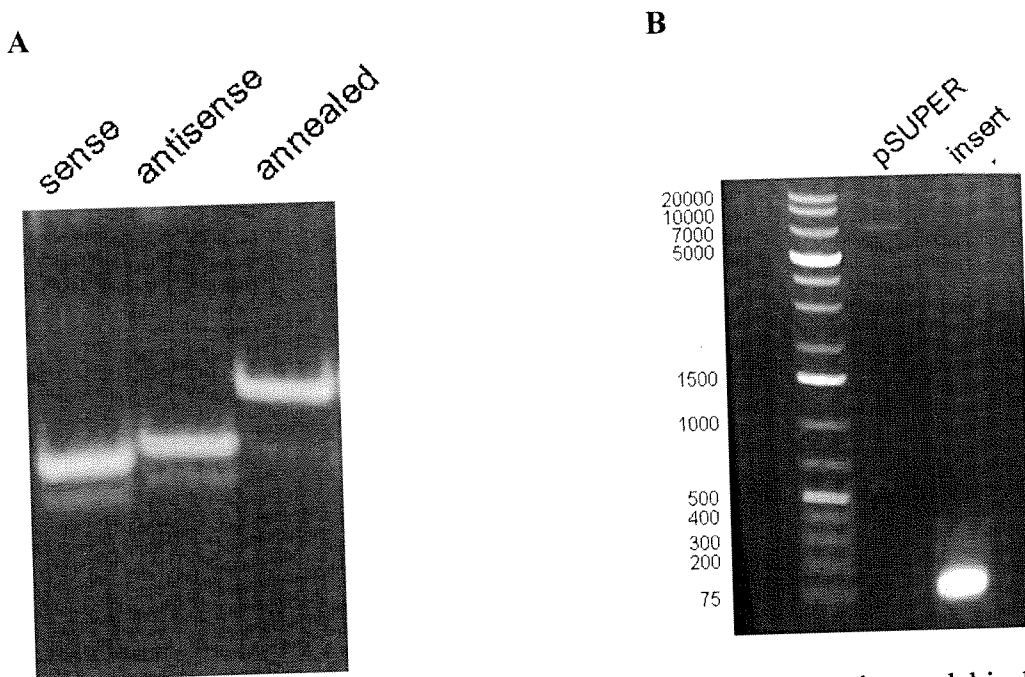
B

20000
10000
7000
5000



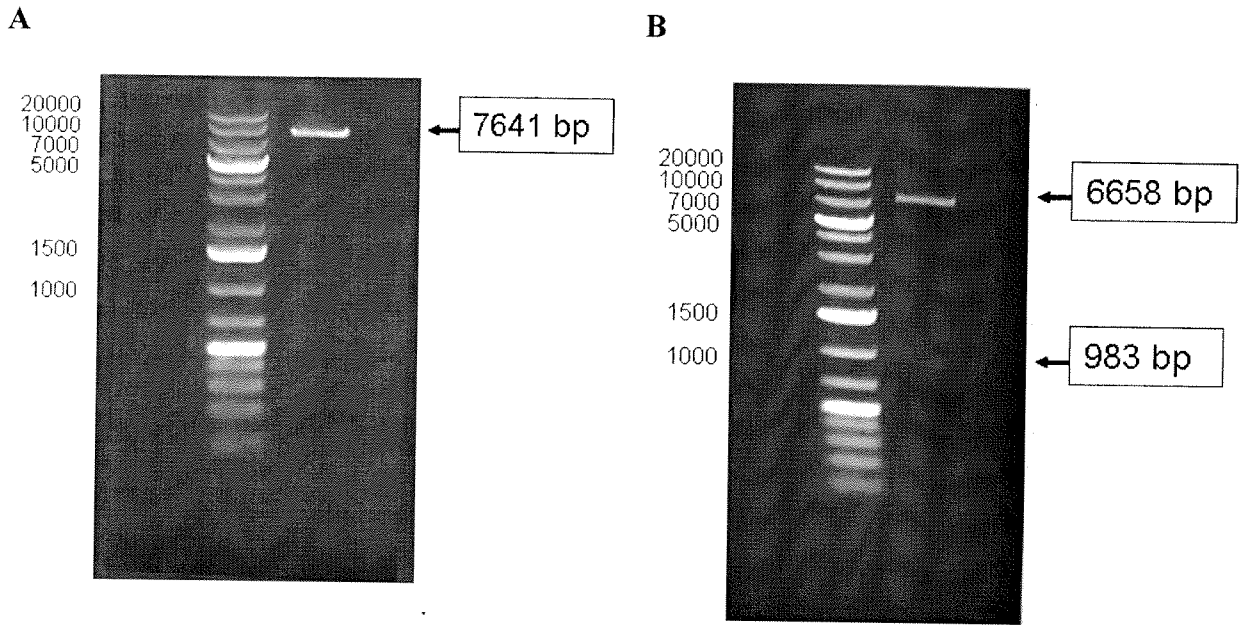
uçlarında BglII ve HindIII kesim bölgeleri ve hairpin bölgesi içeren shRNA tasarlandı (Şekil 5.10). Her biri 60 nükleotid boyundaki tek zincir “sense” ve “antisense” diziler (50 nmol, 60mer) sentez ettirildi (OligoEngine). Bu diziler birbirleri ile eşleştirilerek (annealing) 5’ ucunda BglII ve 3’ ucunda HindIII kesim bölgesi bulunan çift zincir (insert) haline getirildi. Annealing protokolü:

- “Annealing” tamponu (100mM NaCl, 50 mM HEPES, pH:7.4 filtre sterilizasyonu) hazırlandı.
- 48 µl “annealing” tamponu içine 1 µl “sense” (3 mg/ml) ve 1 µl “antisense” (3 mg/ml) ilave edildi.
- Reaksiyon karışımı önce 90°C’de 4 dk sonra 70°C’de 10 dk inkübe edildi.
- Kademeli olarak (her 5 dakikada 10°C azalmalarla) 10°C’ye soğutuldu.
- Tek zincir diziler ve “annealed” dizi PAGE (%12) ile doğrulandı (Şekil 5.11).



Şekil 5.11. Oligonükleotidlerin PAGE analizi. Her biri 60 nt boyundaki oligonükleotidlerin ayrı ayrı ve eşleştirilmiş (annealed) formları (A) ve ligasyon öncesi pSUPER plazmid fragmanı ve eklenecek (insert) dizinin jel görüntüsü (B).

Vektörün lineer haline getirilmesi ve jel pürifikasyonu: Sirküler halde bulunan pSUPER vektör (pSUPER.retro.neo, OligoEngine, hediye) BglII ve HindIII enzimleri ile kesilerek linearize edildi. pSUPER vektör, enzimlerin optimum etkinlikte çalıştıkları tampon çözeltileri içinde önce BglII (Biolabs) sonra HindIII (Fermentas) ile 37°C’de 2 saat inkübe edilerek lineer hale getirildi ve kesim reaksiyonu %1 agaroz jel elektroforezi ile doğrulandı (Şekil 5.12).

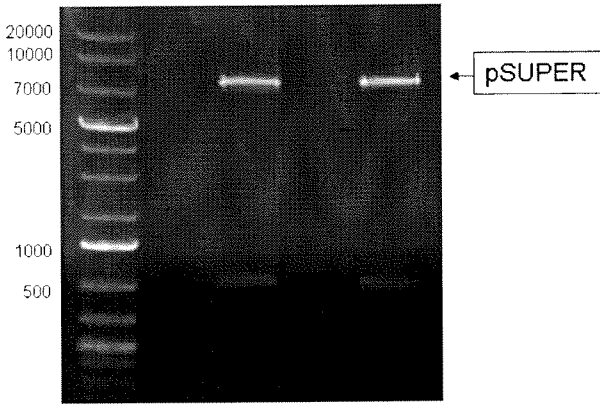


Şekil 5.12. Sırasıyla BglII (A) ve HindIII (B) ile kesilen pSUPER plazmid vektörün agaroz jel görüntüsü. Sirküler pSUPER (7641 bp); HindIII 1441. bp’den, BglII 2424. bp’den keser; çıkarılan parça 983 bp; lineer pSUPER 6658 bp.

Kesim reaksiyonu çözeltisi %0,7 agaroz jele yüklendi (Şekil 5.13) ve pSUPER bandı UV altında kesilerek jelden plazmid vektör ekstraksiyonu (NucleoSpin Extract Kit, Macherey-nagel) yapıldı.

Jel ekstraksiyon protokolü:

- Jelden DNA fragmanı kesildi, santrifüj tübüne alındı ve tartıldı.
- NT1 tamponu (300 µl NT1/100mg jel) içinde 50°C'de 10 dk inkübe edilerek çözünmesi sağlandı.
- Çözelti, toplama tübü içine yerleştirilen kolon üzerinden geçirilerek DNA'nın kolona bağlanması sağlandı ve 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon üzerine NT2 (500 µl) eklendi ve 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon üzerine NT3 (600 µl) eklendi ve 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon üzerine NT3 (200 µl) eklendi ve 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon üzerinden 50 µl NE tamponu geçirildi, oda sıcaklığında 1 dak bekletildi ve 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi.



Şekil 5.13. pSUPER vektörün %0,7 agaroz jel elektroforezi

Ligasyon: Lineer pSUPER ve insert T4 DNA ligaz (Invitrogen) ile ligate edildi. Total 20 µl hacimde ligaz enzimi (0,8 µl) ve tamponu (2 µl), insert: vektör (3:1 µl) ve dH₂O (13,2 µl) içeren ligasyon karışımı 25°C'de gece boyu bekletildi. Vektörün kendi kendine bağlanarak insert içermemesine karşın bakterilere direnç kazandırıp kazandırmadığını test etmek için

negatif kontrol reaksiyonu gerçekleştirildi. Negatif kontrol reaksiyonu sadece insert içermemektedir.

Transformasyon: Ligasyon çözeltisinin tamamı kimyasal kompetan *E. coli* hücrelerine transforme edildi (One Shot Top10 Competent Cells, Invitrogen). Kimyasal transformasyon protokolü:

- Bir tüp (50 µl) OneShot hücre içine pSUPER (0,3 µg/ml, 1 µl) ilave edildi.
- Buzda 30 dk inkübe edildi.
- 42°C su banyosunda 40 sn bekletildi ve sonra buza alındı.
- 250 µl SOC medium eklendi ve çalkalayıcı inkübatörde (42°C 225 rpm) 1 saat inkübe edildi.
- Reaksiyon çözeltisi 100 µg/µl ampisilin içeren LB agar petri'ye yayıldı. (Transforme olan bakteriler ampisilin direnci kazanır ve ampisilin içeren besiyerinde pozitif klonların seçilimi yapılır)
- Petri ters çevrilerek 37°C etüvde gece boyunca inkübe edildi.
- Ertesi gün orta büyüklükteki koloniler seçilerek LB besiyeri (3 ml) içine alındı ve 37°C 225 rpm'de 8 saat inkübe edildi.
- Beklenen bakteriyel çoğalma görülmedi.

Bu aşamada beklenen çoğalmanın görülmeyişi doğru koloninin seçilememesine bağlı olabilir veya LB agar plate üzerinde oluşan koloniler yalancı pozitif olabilir. BLASTN analizinde sense dizi *E. coli* genomu üzerinde herhangi bir bölge ile eşleşmemekle birlikte TRPC1 siRNA dizisinin bakteriler için olasılıkla “off-target” etkiler nedeniyle ölümcül olabileceği de düşünülmüştür.

Karşılaşılan sorunu çözme amacıyla;

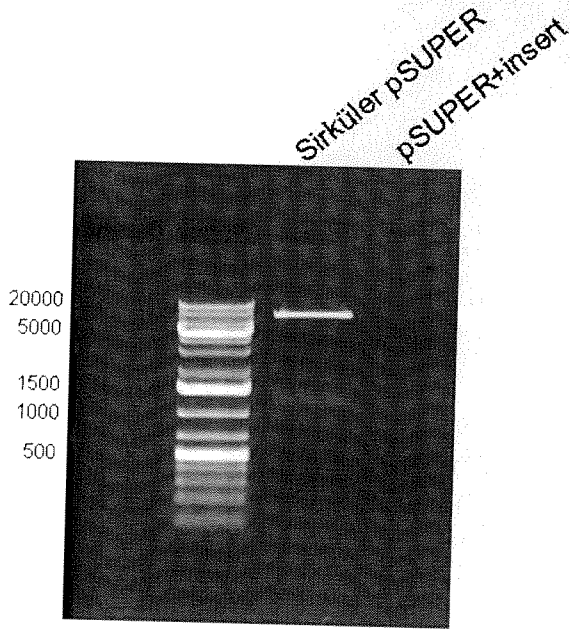
1) LB agar petriden seçilen koloniler yine 100 µg/ml antibiyotik içeren LB agar petriye yayıldı. Çoğalan koloniler petriden alınarak LB besi ortamında çoğaltılmaksızın doğrudan izolasyona alındı (Plasmid Mini Kit, QIAGEN). İzolasyon protokolü:

- Santrifüj tübüne alınan koloni sürüntüsü üzerine P1 tamponu (300 µl) eklendi.
- P2 tamponu (300 µl) eklendi, tüp alt üst çevrilerek şiddetlice çalkalandı ve 25°C'de 5 dk inkübe edildi.
- Önceden 4°C'ye soğutulmuş P3 tamponu eklendi ve tüp hemen alt üst yaparak şiddetlice çalkalandı, buz üzerinde 5 dak inkübe edildi.
- 14.000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Plazmid DNA içeren süpernatant ayrı bir tüpe alındı.
- DNA bağlayıcı kolon; "QIAGEN-tip" içinden 1 ml QBT tamponu geçirilerek dengelendi.
- Süpernatant "QIAGEN-tip" içinden geçirildi.
- "QIAGEN-tip" içinden 2 defa 2 ml QC tamponu geçirilerek yıkandı.
- Kolon üzerinde tutulan DNA QF tamponu (800 µl) ile çözündürüldü.
- Oda sıcaklığındaki izopropanol (560 µl) eklendi (DNA presipitasyonu). 14000 g'de 30 dak santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı.
- DNA pelleti 1 ml %70 etanol ile yıkandı, 10000 g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet kurutuldu ve 50 µl steril TE tamponu, pH:8.0 (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM) içinde çözündürüldü.

İzole edilen plazmidin varlığı kesim yapılarak %1 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Toplam 20 µl hacimde, izole edilen plazmid çözeltisi (2 µl); Fast Digest EcoRI (1 µl); Fast

Digest HindIII (1 μ l); enzim tamponu (2 μ l) ve dH₂O (16 μ l) içeren reaksiyon karışımı 37°C'de 5 dk inkübe edildi. Reaksiyon karışımı (10 μ l) %1 agaroz jele yüklendi. Agaroz jel elektroforezinde beklenen bant görülmedi (Şekil 5.14).



Şekil 5.14. İzole edilen plazmidin agaroz jel (%1) elektroforezi. LB agar petriden seçilen kolonilerden izole edilen örnek ve yanı sıra kontrol amacıyla sirküler pSUPER jele yüklendi. Sol sütunda 500-2000 bp'lik marker (GeneRuler 1 kb DNAladder, Fermentas) bantları görülmektedir.

2) Kimyasal transformasyona alternatif olarak elektroporasyon uygulandı. Bu amaçla öncelikle ligasyon çözeltisi etanol ile çöktürüldü. Presipitasyon protokolü:

- Glukojen (20 μ g/ μ l) 1 μ l, amonyum asetat (7,5 M) 5 μ l, Etanol (%100) 37,5 μ l karıştırıldı
- -80°C'de 10 dk bekletildi.
- 4°C'de 14000 rpm'de 25 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 150 μ l %70 etanol eklendi ve 4°C'de 2 dk santrifüj (14000 rpm) edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Etanol yıkaması tekrarlandı.

- Etanol uzaklaştırıldı ve pellet 10 µl TE tamponunda çözündürüldü.

E. coli hücreleri çoğaltıldı ve kompetan hale getirildi.

Kompetan hale getirme protokolü:

- LB agar petriden seçilen koloniler 3 ml LB besiyeri içinde çoğaltıldı.
 - 4°C'de 4100 rpm'de 3 dk santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı.
 - Protokol boyunca tüpler buz üzerinde tutuldu.
 - -20°C'ye soğutulmuş %10 gliserol eklendi.
 - 4°C'de 4100 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı.
- Yıkama işlemi 4 defa tekrarlandı.
- Pellet 300 µl gliserolde çözündürüldü, sıvı azot içinde hızla donduruldu ve -80°C'de saklandı.

Elektroporasyon protokolü:

- 50 µl kompetan hücre üzerine 1,5 µl ligasyon çözeltisi eklendi.
- Küvet içinde elektroporatöre yerleştirildi (1800 V, 15 µF, 335 R, 0,0047 ms).
- 1 ml SOC besiyeri eklendi.
- 37°C'de 170 rpm'de 1 saat inkübe edildi.
- 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar petriye yayıldı.
- 37°C'de gece boyu inkübe edildi.

Sonuç: Petride pozitif koloni oluşmadı.

3) Transformasyonda kullanılan kimyasal kompetan *E. coli* suşunun (DH10B) plazmide uygun olmadığı düşüncesinden yola çıkarak pSUPER protokolünde önerilen farklı bir bakteri suşu (DH5α) ile kimyasal transformasyon tekrarlandı ancak pozitif koloni oluşmadı.

Not: Laboratuvar olanaklarımızın ve sarf malzemelerinin kısıtlı oluşu, klonlama işleminin farklı basamaklarının farklı laboratuvarlarda yapılmasını gerektirmiştir. Bakteriyel klonlamanın ardı sıra yapılması gerekliliği ve insert içeren vektörün kompetan hücrelere kazandırılmasının zorluğu göz önüne alındığında, zaman ve sarf malzemelerindeki yetersizlik nedeniyle stabil siRNA üreten hücre ve *in vivo* gen susturmaya uygun shRNA taşıyan plazmid oluşturma amaçlı çalışmalar bu aşamada durdurulmuştur.

LB agar petri hazırlanışı:

- 5 g tripton, 2,5 g “bacto-yeast extract” ve 5 g NaCl 400 ml suda çözündürüldü.
- NaOH ile pH:7,0ye ayarlandı ve 500mL’ye tamamlandı.
- 7,5 g agar eklendi ve otoklav sterilizasyonu (120°C 15 dk) yapıldı.
- Su banyosunda 50°C’ye soğutuldu ve antibiyotik (100 µg/ml) ilave edildi.
- Steril çalışma kabininde steril petrilere döküldü.
- Ters çevrilerek 4°C’de saklandı.

LB besiyeri hazırlanışı:

- 10 g tripton, 5 g “bacto-yeast extract” ve 10 g NaCl 900 ml suda çözündürüldü.
- NaOH ile pH:7.0ye ayarlandı ve 1000 ml’ye tamamlandı.
- Otoklav sterilizasyonu (120°C 15 dk) yapıldı.
- Işıktan koruyarak 4°C’de saklandı.

SOC besiyeri hazırlanışı:

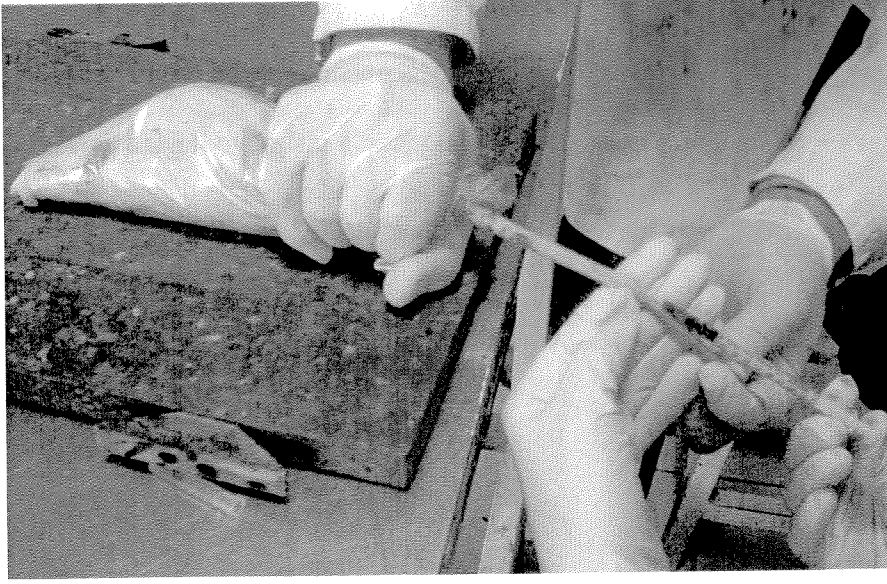
- 5 g tripton, 1,25 g “bacto-yeast extract” ve 0,125 g NaCl, 0,625 ml KCl (1 M) 242,5 ml suda çözündürüldü.

- Otoklav sterilizasyonu (120°C 15 dk) yapıldı.
- 2,5 ml Mg stok (MgCl₂ ve MgSO₄ 1 M, steril) ve 5 ml glukoz (1 M, steril) eklendi.
- 4°C'de saklandı.

5.7.2 *In vivo* siRNA uygulama çalışmaları

TRPC1 gen ekspresyonunun *in vivo* ortamda post-transkripsiyonel olarak susturulması siRNA miktarının sınırlı olması nedeni ile üç deneme ile test edilmiştir. Bu amaçla, TRPC1 mRNA'sının farklı bölgelerine spesifik üçlü siRNA karışımı (**Tablo 5.2.** B, C, D dizileri) özel tampon çözelti (Dharmacon) içinde mikroemülsiyon formülasyonu (125 µl siRNA çözeltisi + 125 µl mikroemülsiyon) hazırlanmıştır. 250 µl siRNA mikroemülsiyon formülasyonu yavaş i.v. infüzyon şeklinde sıçan kuyruk venine insülin enjektörü (21 G) ile uygulanmıştır Kontrol grubu olarak kuyruk veninden sadece sıvağ (125 µl mikroemülsiyon + 125 µl tampon çözelti) uygulanmıştır (**Fotoğraf 5**). Hücre kültüründeki gibi 72 saat sonra doku örnekleri toplanmış ve gerekli izolasyonlar (RNA, protein) yapılmıştır. Aynı zamanda her bir damar dokusunun orta kısmından alınan 3 mm'lik halkalar üzerinde kapasitatif Ca⁺² değişimleri, spektrofloreometreye monte edilmiş özel aparat sayesinde kontraksiyon gelişimleri ile eşzamanlı olarak izlenmiştir.

Mikroemülsiyon formülasyonu: 0,5 g Labrofil M (yağ), 4 g Labrosol (non iyonik surfaktan), 1 g Plural Oleique(non iyonik surfaktan), 0,714 g etanol (ko-surfaktan).



Fotoğraf 5.5. Sıçan kuyruk veninden insülin enjektörü ile ilaç uygulaması. Kontrol (n=3) ve siRNA (n=3) grubu Sprague Dawley türü sıçanlar ağız kısmından hava alabilecek bir poşet yardımı ile sabitlenerek kuyruk veninden 300 µl hacimde mikroemülsiyon çözeltisi verilmiştir.

RNA ve protein izolasyonu:

Servikal dislokasyon ile öldürülen sıçanlardan torasik aort izole edildi. Endotele ait total RNA 1 ml Tripure RNA izolasyon çözeltisinin (Roche Applied Science) aort lümenininden 22-G iğne kullanılarak üç defa geçirilmesi ile elde edildi (SIMON, 2003). Üç aortdan elde edilen endotelializatlar bir araya getirildi (endotel örnekleri). Endoteli uzaklaştırılmış aortlar ise FTS içerisinde dış yüzeyinde bulunan yağ ve bağ dokuları temizlendikten sonra Tripure çözeltisi içerisinde homojenize edildi. Homojenizasyon buz içinde tutulan tüplerde gerçekleştirildi. RNA'ları parçalayan RNAaz'ları inhibe etmek amacıyla RNA izolasyonu sırasında kullanılan tüm cerrahi malzemeler RNase ZAP (Sigma) ile, FTS ve diğer malzemeler (pipet ucu, falkon, ependorf tüp vs.) dietilpirokarbonat (DEPC) içeren DS ile etkileştirildi. Tripure solüsyonunu üreten firmanın izolasyon protokolü kullanılarak damar düz kası ve endotelizatlarından total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA örneklerinin

bütünlüğü agaroz jel elektroforezi yapılarak kontrol edildi. RNA konsantrasyonları 260 nm (A_{260}) dalga boyundaki absorbansın ölçülmesi ile hesaplandı.

Tripure RNA ve protein izolasyon protokolü:

- Her 50-100 mg doku için 1 ml TriPure izolasyon çözeltisi (TIR, TriPure Isolation Reagent) polipropilen santrifüj tübüne alındı (15-25 °C).
 - Taze ya da dondurulmuş doku tüpe alındı ve homojenizatör (Tissue Lyser, Thermo) yardımı ile homojenize edildi.
 - Örnekler nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrılmasını sağlamak üzere 5 dk 15-25 °C'de bekletildi.
 - Her 1 ml TIR için 0,2 ml kloroform eklendi ve tüp şiddetli bir şekilde 15-20 sn çalkalandı.
 - 15 dk 15-25 °C'de bekletildi.
 - Çözeltiyi 3 faza ayırmak için 12000 g'de 40 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
 - Santrifüj sonrasında en üstteki sulu faz yeni bir tüpe alındı.
- <Protein izolasyonu için bkz. Bölüm 5.4. >**
- 0,5 ml izopropanol eklendi ve tüp birkaç sefer karıştırıldı.
 - RNA'nın çökmesi için 5-10 dk 15-25 °C'de bekletildi ve örnekler 12000 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
 - Üstteki faz atıldı ve 1 ml %75 etanol eklendi.
 - RNA pelleti etanol içerisinde 2-3 sn girdaplı karıştırıcı ile yıkandı.
 - Örnekler 7500 g'de 5 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Üstteki faz atıldı.
 - RNA pelletinden kalan etanol hava ile uzaklaştırıldı ve DEPC (diethyl pirokarbonat) ile etkileştirilmiş RNAaz içermeyen su içerisinde RNA pelleti çözüldürüldü.

Simültane Ca²⁺/kontraksiyon deneyleri:

Aortun orta bölümünden kesilen 3 mm uzunluğundaki damar segmenti endotelsizleştirilmiş ve ters çevrilerek Ca²⁺/kontraksiyon aparatına yerleştirilerek 1 g ön gerilim ile 3 saat boyunca karanlıkta 5 µM Fura-2/AM, %0,02 pluronic127, 1 mM probenesid, 0,2 mM neostigmin içeren 2 ml Krebs içinde (mM içeriği: NaCl: 118; KCl: 4,73; MgSO₄: 1,2; CaNa₂EDTA: 0,026; NaH₂PO₄: 1,2; CaCl₂: 2,5; NaHCO₃: 25; glukoz: 11) 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası doku Krebs çözeltisi (37°C, %95 O₂ + %5 CO₂) ile 15 dk'lık aralarla perfüze edilerek kademeli olarak 1 g'lık sabit ön gerilime getirilmiştir. Stabil dinlenim kontraksiyonuna eriştikten sonra test protokolü uygulanmıştır. Deneyin sonunda doku 10 µM verapamil varlığında Ca²⁺ içermeyen Krebs (0 Ca) ile 1,5 dk etkileştikten sonra 10 µM CPA uygulaması ile Ca²⁺ depoları boşaltılmış ve Ca²⁺ 2,5 mM olacak şekilde küvete ilave edilmiştir. Bu protokol ile gözlenen Ca²⁺ artışı izole dokuda sadece SOC'yi göstermektedir.

5.8 İstatistiksel analiz

Tüm veriler ortalama ve ± O.S.H. (ortalamanın standart hatası) olarak ifade edilmiştir. "n" deneyde kullanılan farklı hücre pasajlarının sayısını göstermektedir. Ortalamalar arasındaki farkın anlamlılığı Student's *t*-testi (iki grup karşılaştırıldığında) ya da çoklu karşılaştırmalar için ANOVA ve sonrasında Student-Newman-Keuls testi ile analiz edilmiştir. Ortalamalar arasındaki fark $P < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6- BULGULAR

6.1 İzole canlı dokuda eşzamanlı $[Ca^{2+}]_i$ /izometrik kontraksiyon gelişimi üzerine TRIM ve 2APB'nin etkileri

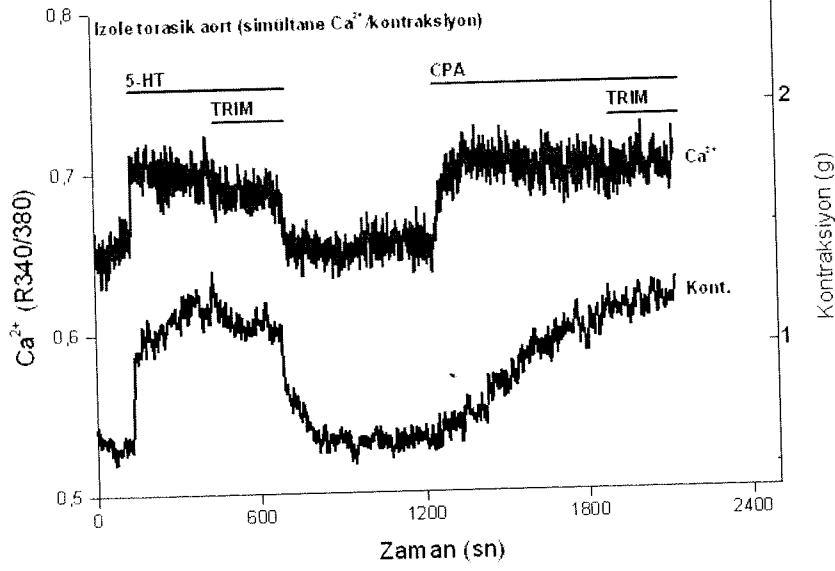
Öncelikle SOC'nin canlı izole dokuda işlevsel olup olmadığını test etmek amacıyla hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonundaki değişimleri kontraktıl yanıt oluşumu ile eşzamanlı olarak izleyebilecek yöntem tasarlanarak laboratuvarımızda kurulumu gerçekleştirilmiştir. Bu sistem kullanılarak SOC blokörü olduğu ileri sürülen farmakolojik ajanların test edilmesi mümkün olmuştur. İlk olarak organik yapılı ve SOC kanalını bloke ettiği bildirilen TRIM'in etkisi incelenmiştir. Literatürde önerilen konsantrasyonda kullanılan TRIM Şekil 6.1.'de görüldüğü gibi CPA'nın neden olduğu hücre içi Ca^{2+} artışını ve buna paralel gelişen kontraktıl yanıtı inhibe edememiştir. Buna karşın düşük düzeyde olsa da 5-HT yanıtlarında azalmaya neden olurken α -adrenerjik reseptör aktivasyonuna bağlı gelişen Ca^{2+} artışını ve kontraksiyonu etkilememiştir.

6- BULGULAR

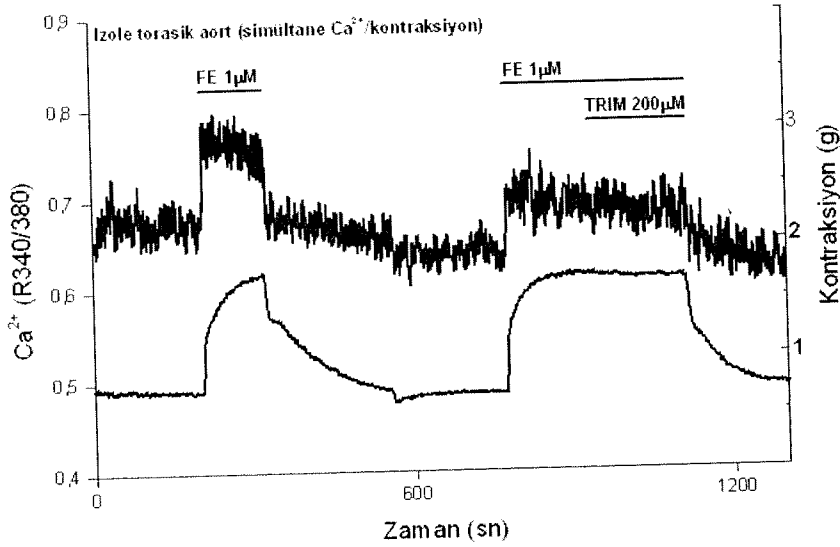
6.1 İzole canlı dokuda eşzamanlı $[Ca^{2+}]_i$ /izometrik kontraksiyon gelişimi üzerine TRIM ve 2APB'nin etkileri

Öncelikle SOC'nin canlı izole dokuda işlevsel olup olmadığını test etmek amacıyla hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişimleri kontraktıl yanıt oluşumu ile eşzamanlı olarak izleyebilecek yöntem tasarlanarak laboratuvarımızda kurulumu gerçekleştirilmiştir. Bu sistem kullanılarak SOC blokörü olduğu ileri sürülen farmakolojik ajanların test edilmesi mümkün olmuştur. İlk olarak organik yapılı ve SOC kanalını bloke ettiği bildirilen TRIM'in etkisi incelenmiştir. Literatürde önerilen konsantrasyonda kullanılan TRIM Şekil 6.1.'de görüldüğü gibi CPA'nın neden olduğu hücre içi Ca^{+2} artışı ve buna paralel gelişen kontraktıl yanıtı inhibe edememiştir. Buna karşın düşük düzeyde olsa da 5-HT yanıtlarında azalmaya neden olurken α -adrenerjik reseptör aktivasyonuna bağlı gelişen Ca^{2+} artışı ve kontraksiyonu etkilememiştir.

A

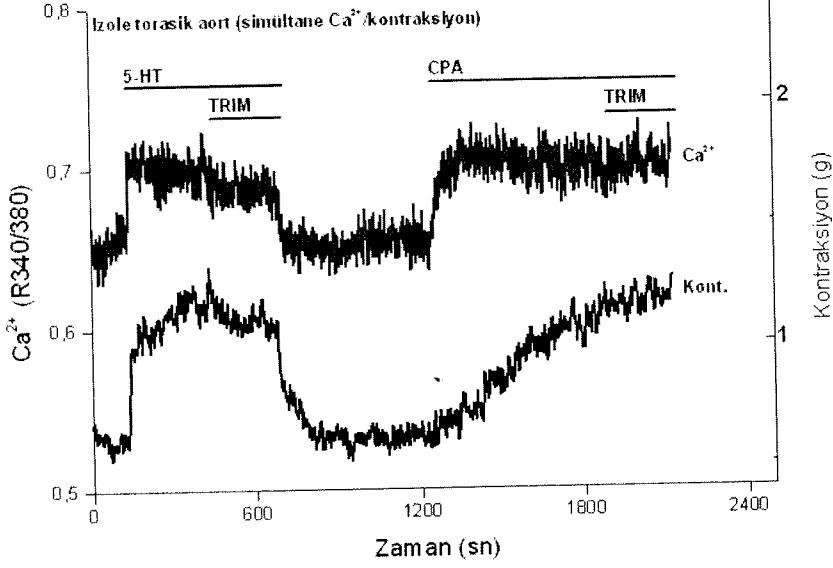


B

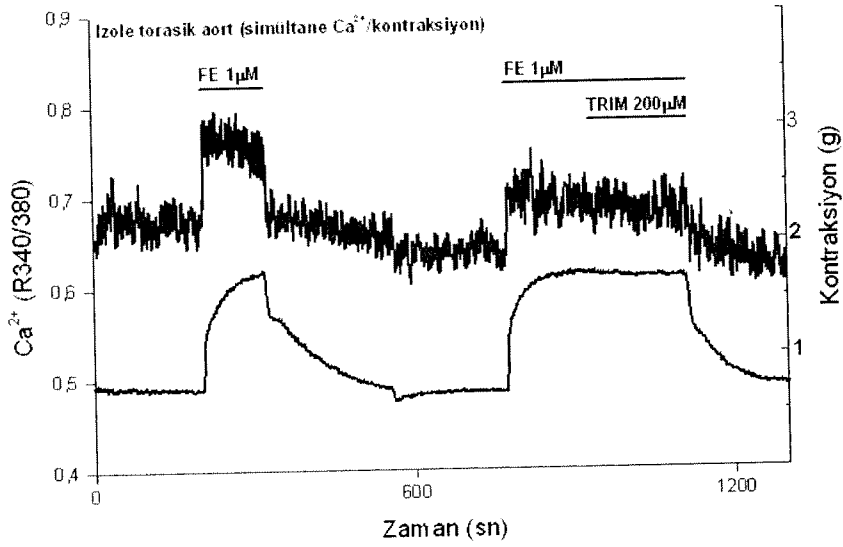


Şekil 6.1. Reseptör-aracılı veya SOC'ye bağlı artan hücre içi Ca^{2+} ve eşzamanlı gelişen kontraktıl yanıt kalıpları üzerine TRIM'in etkisi. 5-HT, fenilefrin ve CPA Ca^{2+} yanıtları üzerine TRIM (200 μ M) uygulanmıştır. Her iki panelde de alttaki trase eş zamanlı gelişen kontraktıl yanıtları göstermektedir.

A



B



Şekil 6.1. Reseptör-aracılı veya SOC'ye bağlı artan hücre içi Ca^{+2} ve eşzamanlı gelişen kontraktıl yanıt kalıpları üzerine TRIM'in etkisi. 5-HT, fenilefrin ve CPA Ca^{2+} yanıtları üzerine TRIM (200 μ M) uygulanmıştır. Her iki panelde de alttaki trase eş zamanlı gelişen kontraktıl yanıtları göstermektedir.

SOCC blokörü olduğu söylenen organik kimyasal maddelerin kısıtlı sayıda ve non-selektif olmaları nedeniyle spesifik gen susturma çalışmalarına geçilmiştir (Bölüm 6.2). Hücre kültür ortamında TRPC1 hedef geninin susturulmasının TRPC ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

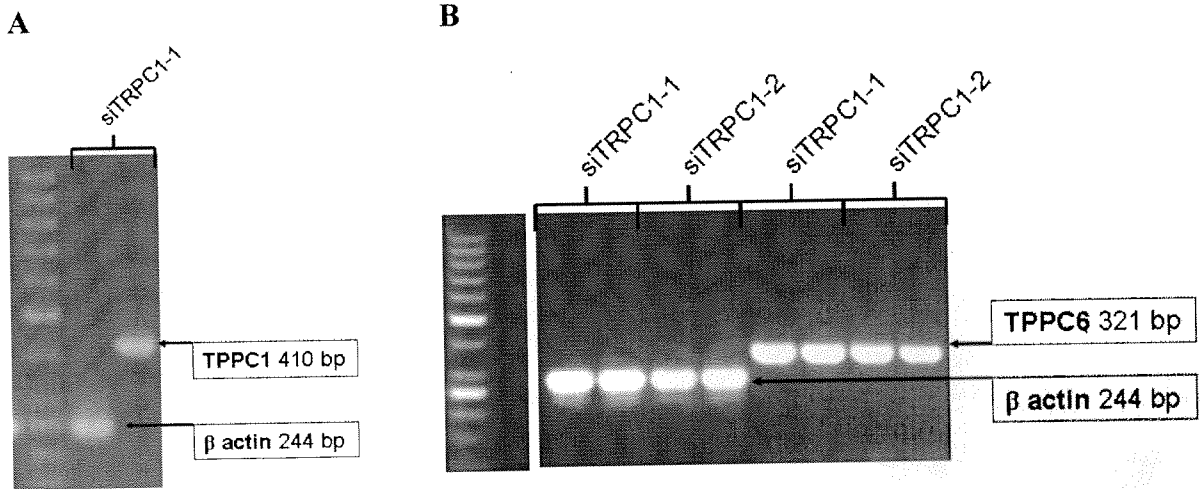
Gen susturma amacı ile kullanılan siRNA dublekslerinin sistemik etkinlik gösterebilmesi için yüksek miktarlarda uygulanması önerilmektedir. siRNA dublekslerinin yüksek maliyetleri nedeniyle bakteriyel transformasyonla çoğaltılmaları çalışmaları ekonomik nedenlerle durdurulmuştur.

6.2 *In vitro* siRNA uygulaması

6.2.1 Gen susturmanın TRPC ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisi

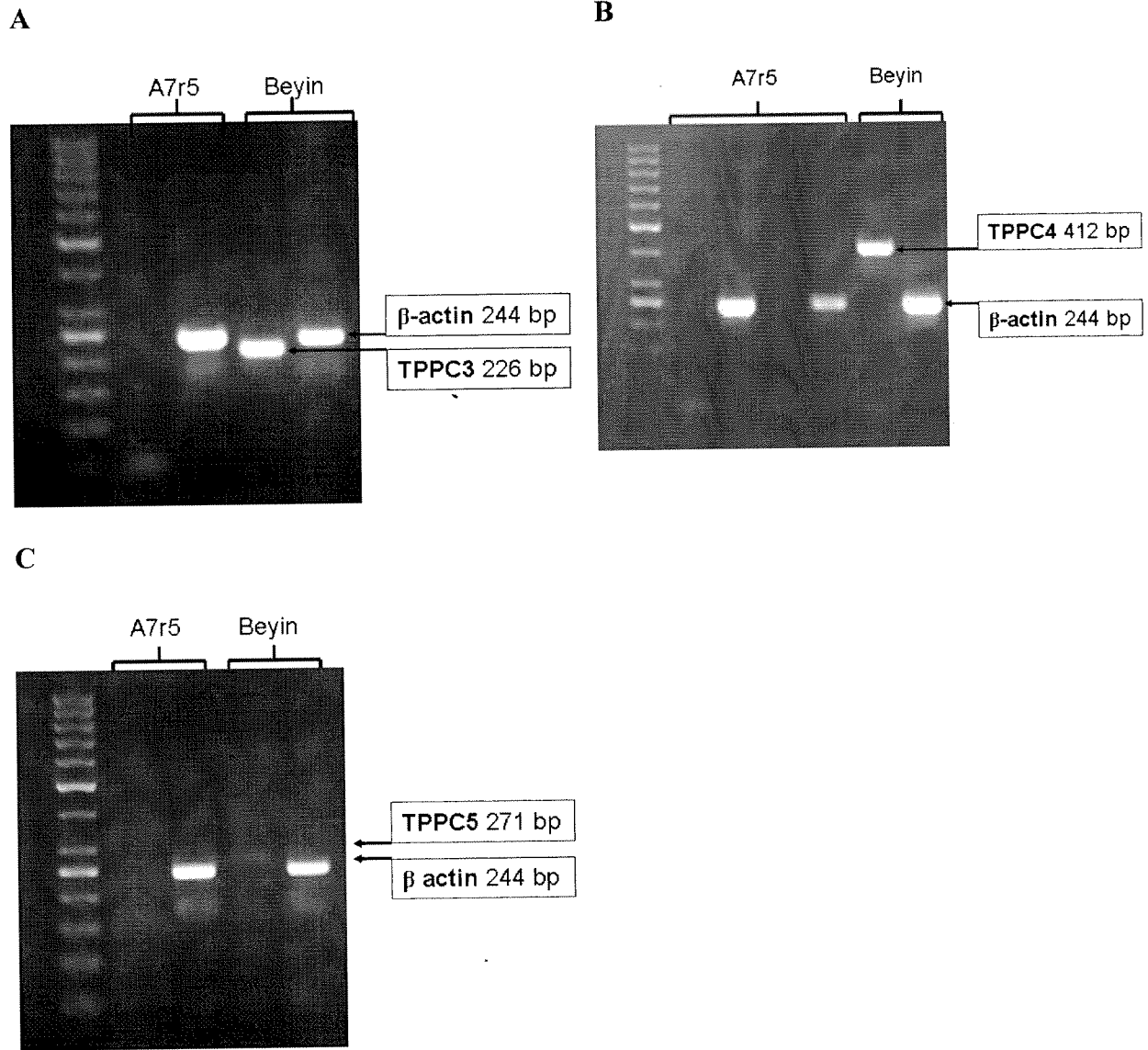
Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR):

Gen susturmanın mRNA düzeyleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. A7r5 hücrelerinde TRPC1 ve TRPC6 tespit edilebilirken (TRPC3, C4 ve C5 belirlenememiştir (Şekil 6.2. A ve B). TRPC3, C4 ve C5 pozitif kontrol olarak kullanılan beyin örneklerinde belirlenmiştir (Şekil 6.3. A-C).



Şekil 6.2. TRPC1 (A) ve TRPC6 (B) RT-PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri.

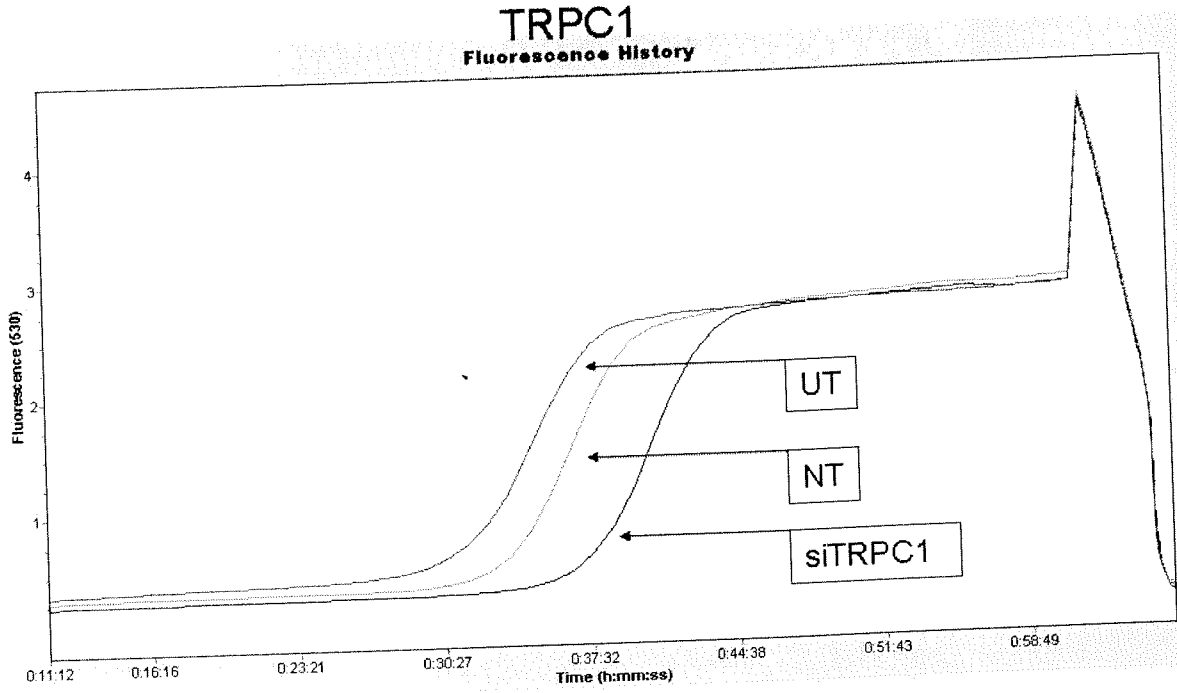
RT-PCR tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımı (10 µl) 2 µl boya (6x) ile karıştırılarak jel elektroforez yapıldı. Marker; GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas).



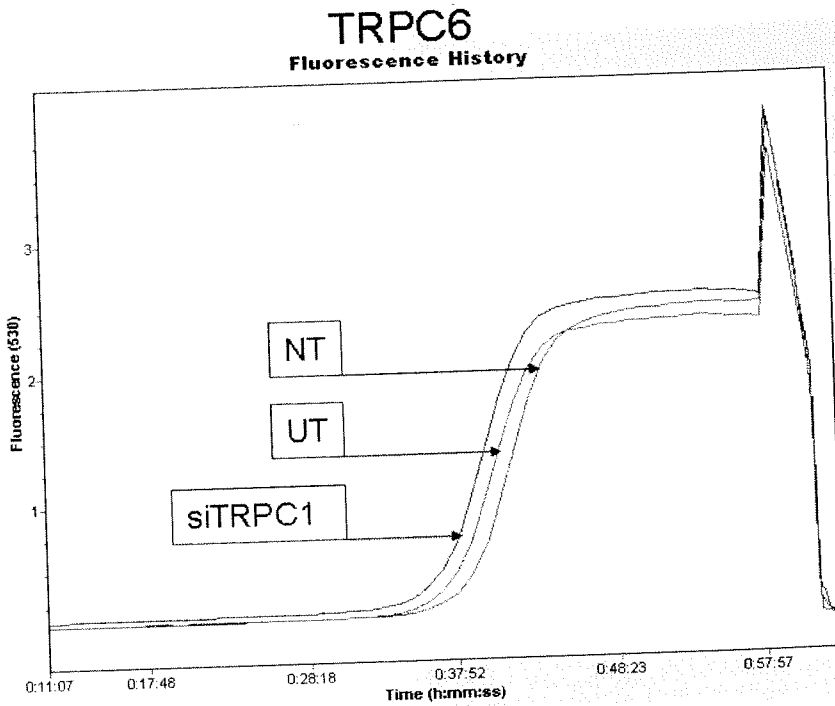
Şekil 6.3. TRPC3 (A), C4 (B) ve C5 (C) RT-PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. TRPC3, C4 ve C5 sıçan beyin dokusunda belirlenebilirken A7r5 hücrelerinde belirlenememiştir. Marker; GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas).

Gen susturulmasına bağlı ilgili genin (*TRPC1*) amplifikasyon eğrisinin sağa (Şekil 6.4A) veya ilişkili diğer bir genin amplifikasyon eğrisinin ise sola (Şekil 6.4B) doğru kayması bir örnekte mRNA düzeylerindeki değişim hakkında bilgi vermektedir.

A



B



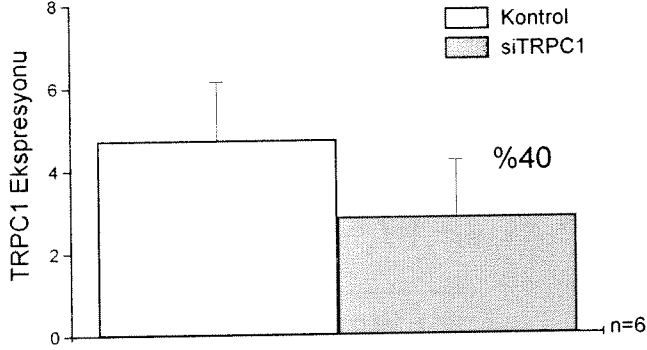
Şekil 6.4. TRPC1 (A) ve TRPC6 (B) amplifikasyon eğrileri.

Aynı koşullarda gerçekleştirilen (100 nM siRNA, 72 saat inkübasyon) üç farklı gen susturma çalışmasına ait TRPC1 ekspresyon düzeyleri **Tablo 6.1.**'de verilmiştir. TRPC1 mRNA düzeyi, kontrol grubuna kıyasla ortalama %40 azalmıştır. Ancak gen susturma çalışmalarımızda aynı koşullarda bulunan iki farklı petri plağı arasında bile ekspresyon düzeyleri açısından belirgin farklılıkların görölmesi, farklı zamanlarda yapılan çalışmalara ait verilerin bir arada değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Gen susturmanın 3 gün gibi bir süreyi kapsaması ve inkübasyon süresince başlangıçta her kuyucuğa aynı sayıda (50.000 hücre/ml) ekilen hücrelerin çoğalma hızının farklılık göstermesi, ekspresyon düzeylerinde rakamsal olarak 10-15 kat (**Tablo 6.1.**) değerkenlik oluşmasına neden olmaktadır. Bu durumda farklı denemelere ait verilerin ortalamalarının alınması, standart sapmanın artmasına neden olmakta ve istatistiksel anlamlılık görölmemektedir (**şekil 6.5.**)

Tablo 6.1. TRPC1 ekspresyon düzeyleri

6 farklı çalışmada siTRPC1 uygulanan ve kontrol örneklerinde TRPC1 mRNA ekspresyon değerleri TRPC1/ β -aktin x100 olarak verilmiştir.

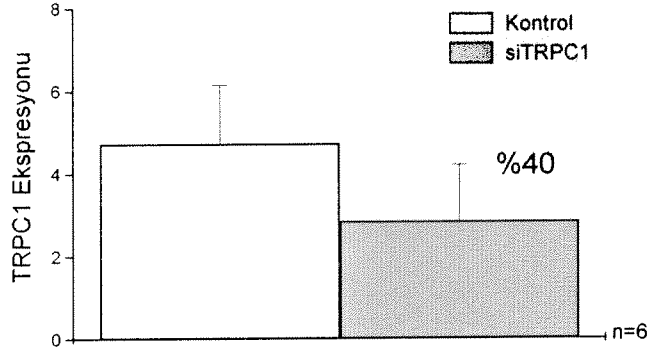
Deneme	TRPC1 Ekspresyonu	
	Kontrol	+ siTRPC1
1	0,78	0,23
2	0,90	0,46
3	8,44	5,33
4	4,29	1,06
5	5,44	3,15
6	8,60	6,92
Ort	4,74	2,86
O.S.H.	1,41	1,13



Şekil 6.5. Gen susturma (siTRPC1) ve kontrol örneklerinde rölatif TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler (TRPC1/ β -aktin x 100) ortalama ve ortalamanın standart hatası (Ort \pm O.S.H.) olarak verilmektedir.

Her denemeye ait değerler ortalamaya alınmaksızın kendi içinde değerlendirildiğinde siRNA uygulanan hücrelerde kontrol hücelere oranla TRPC1 düzeyinde % 20-75 azalma görülmüştür.

Gen susturma çalışmalarında 5 farklı deney grubu ile çalışılmıştır. Bu hücre gruplarındaki TRPC1 ekspresyon düzeyleri aşağıda verilmiştir (Tablo 6.2., Şekil 6.6.). Tüm gruplarda ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. NT ve UT örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması (Student-Newman Keuls testi) nedeniyle her iki değer kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 6.5. Gen susturma (siTRPC1) ve kontrol örneklerinde rölâtif TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler (TRPC1/ β -aktin x 100) ortalama ve ortalamanın standart hatası (Ort \pm O.S.H.) olarak verilmektedir.

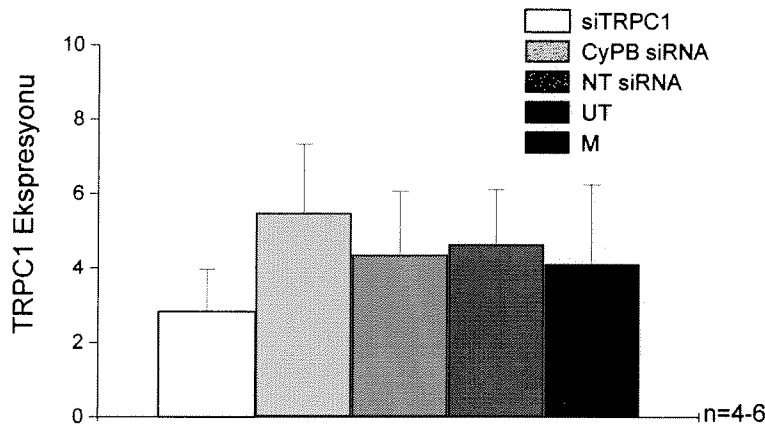
Her denemeye ait değerler ortalama alınmaksızın kendi içinde değerlendirildiğinde siRNA uygulanan hücrelerde kontrol hücrelere oranla TRPC1 düzeyinde % 20-75 azalma görülmüştür.

Gen susturma çalışmalarında 5 farklı deney grubu ile çalışılmıştır. Bu hücre gruplarındaki TRPC1 ekspresyon düzeyleri aşağıda verilmiştir (Tablo 6.2., Şekil 6.6.). Tüm gruplarda ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. NT ve UT örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması (Student-Newman Keuls testi) nedeniyle her iki değer kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 6.2. TRPC1 ekspresyon düzeyleri

Gen susturma çalışmalarında kullanılan 5 farklı deney grubunda TRPC1 mRNA ekspresyon değerleri TRPC1/ β -aktin x 100 olarak verilmiştir. (Pozitif kontrol, CyPB: siklofilinB; Negatif kontroller, NT: “non-targeting”; UT: “untreated”; M: “mock”)

Deneme	TRPC1 Ekspresyonu				
	siTRPC1	CyPB,siRNA	NT siRNA	UT	M
1	0,19	0,37	0,4	0,64	0,52
2	0,34	0,04	—	0,57	0,28
3	5,33	11,04	3,15	8,44	—
4	1,06	5,54	—	4,29	7,10
5	3,15	7,02	5,52	5,44	6,85
6	6,92	8,99	8,39	8,60	5,84
Ort	2,83	5,50	4,37	4,66	4,12
O.S.H.	1,14	1,83	1,70	1,45	1,53

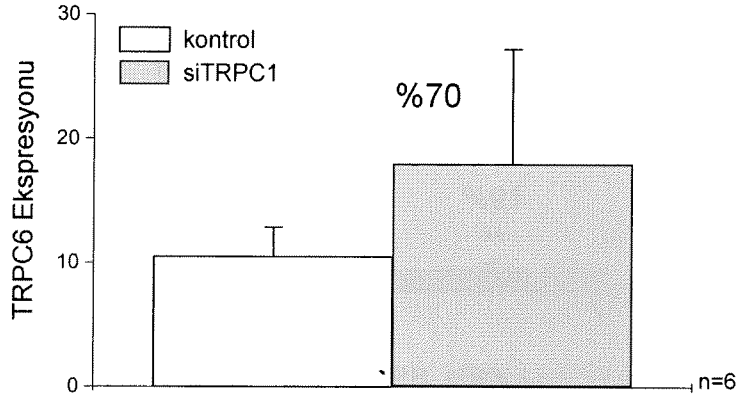


Şekil 6.6. Gen susturma (siTRPC1) ve kontrol örneklerinde rölatif TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler (TRPC1/ β -aktin x 100) ortalama ve ortalamanın standart hatası (Ort \pm O.S.H., n=4-6) olarak verilmektedir.

siTRPC1 aracılı gen susturma uygulanan hücrelerde TRPC1'in yanı sıra TRPC6 düzeyindeki değişiklikler belirlenmiştir. TRPC6 mRNA düzeyi, kontrol grubuna oranla ortalama %70 artmıştır (Tablo 6.3, Şekil 6.7). Her denemeye ait değerler ortalamaya alınmaksızın kendi içinde değerlendirildiğinde siRNA uygulanan hücrelerde kontrol hücelere oranla TRPC6 düzeyinde % 0,25-257 arasında artış görülmüştür.

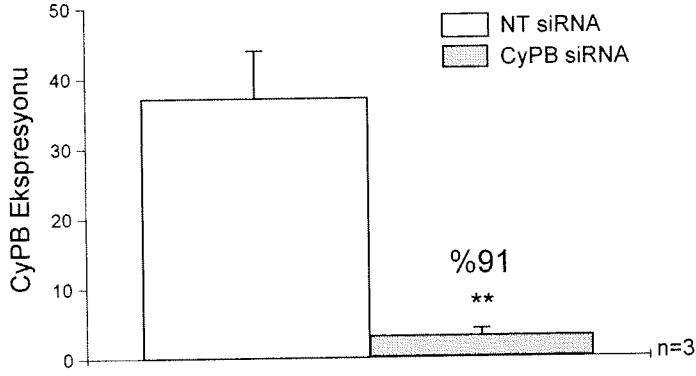
Tablo 6.3. TRPC6 ekspresyon değerleri. Altı farklı çalışmada siTRPC1 uygulanan ve kontrol örneklerinde TRPC6 mRNA ekspresyon değerleri TRPC1/ β -aktin x 100 olarak verilmiştir.

Deneme	TRPC6 Ekspresyonu	
	Kontrol	+ siTRPC1
1	6,79	10,67
2	7,94	7,96
3	12,69	30,03
4	17,58	40,88
5	2,13	7,62
6	15,67	8,98
Ort	10,46	17,69
O.S.H.	2,39	5,80



Şekil 6.7. Gen susturma (siTRPC1) ve kontrol örneklerinde rölatif TRPC6 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler (TRPC6/ β -aktin x 100) ortalama ve ortalamanın standart hatası (Ort \pm O.S.H.) olarak verilmektedir (n= 6).

Gen susturma çalışmalarında pozitif kontrol olarak CyPB siRNA kullanıldı. CyPB mRNA düzeyi, CyPB siRNA uygulanan örneklerde NT siRNA uygulanan örneklere göre belirgin düzeyde ($P<0,01$) azalmış, ortalama yaklaşık %91 susturma sağlanmıştır (**Şekil 6.8**). Bu bulgu transfeksiyonun başarılı olarak gerçekleştirildiği ve TRPC1 düzeyindeki susturmanın göreceli olarak az olmasının kullanılan siRNA dizisi ile ilişkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 6.8. Gen susturma (CyPB siRNA) ve kontrol (NT siRNA) örneklerinde rölatif CyPB mRNA ekspresyon düzeyi. İkili çalışılan örneklerin ortalaması dikkate alınmıştır. Değerler (CyPB/ β -aktin x 100) ortalama ve ortalamasının standart hatası (Ort \pm O.S.H.) olarak verilmektedir. (**; $P < 0,01$) (NT, non-targeting; CyPB; siklofilinB).

Western Blot (WB):

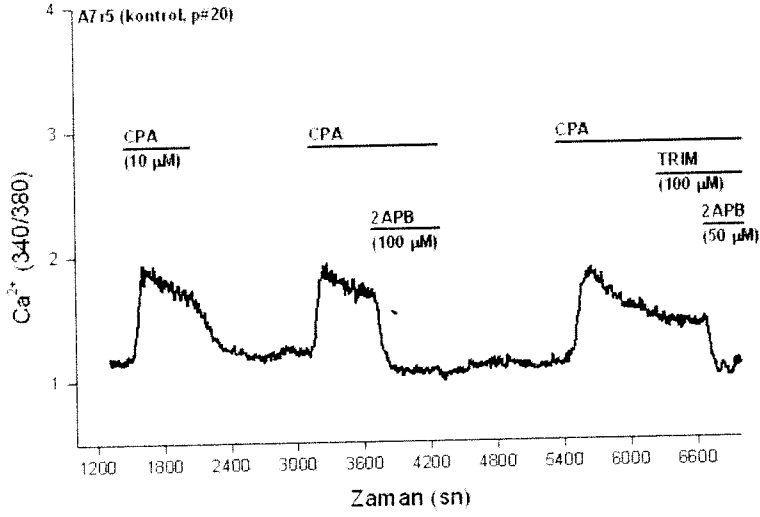
Transkripsiyon sonrası gen susturmanın protein düzeyleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla WB yöntemi kullanılmıştır. WB uygulamasında A7r5 hücrelerinden elde edilen proteinlerin yanı sıra pozitif kontrol olarak sıçan beyin dokusundan izole edilen protein örneği kullanılmıştır. A7r5 protein örneklerinin blot analizlerinde herhangi bir bant görülmemiştir. Bu sonuç, izolasyon sonucu belirgin bir total protein pelleti oluşmasına karşın mevcut yöntemle (TriPure izolasyon kiti) hücrelerden yeterli miktarda hedef proteinin izole edilemediğini göstermektedir. Membranın Ponceau boyaması ile boyama oluşması total protein izolasyonunda bir sorun olmadığını göstermektedir. Tripure izolasyon kitinin seçilmesindeki neden aynı hücrelerden hem RNA hem de protein izolasyonuna olanak sağlaması ve böylece aynı hücre grubunda hem RNA hem protein düzeyindeki susturma etkinliğinin belirlenebilmesidir. Literatürde siRNA çalışmalarında daha yüksek miktarda protein izole edebilmek amacıyla araştırmacıların RNA ve protein izolasyonunu farklı hücre gruplarından yaptıkları (SOBOLOFF, 2005) veya protein ekstratlarını bir araya getirerek

“pool” ettikleri bildirilmektedir. Ancak, aynı koşullarda çalışılan iki farklı petri arasında bile susturma etkinliği açısından belirgin farklılıkların gözlemlenmesi nedeniyle ayrı örneklerde mRNA ve protein analizlerinin yapılması birbirlerini doğrulamayacaktır. Ön denemelerde jelden membrana yüksek verimlilikle protein transfer ettiğini gözlemlediğimiz IBlot transfer cihazı (Invitrogen) ve yüksek duyarlıklı kemiluminesans belirleyici bir görüntüleme cihazı kullanmamıza karşın sonuç alınamamıştır. Bu kapsamda nanokristal ile konjuge primer antikör kullanımının kantitatif bir duyarlık artışı oluşturabileceği düşüncesindeyiz.

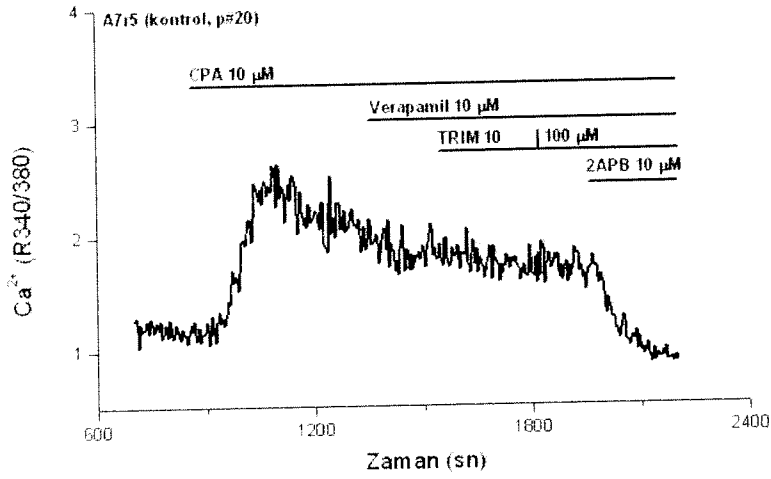
6.2.2 Gen susturmanın kapasitatif Ca^{2+} üzerindeki etkisi

Polistiren lamel üzerinde yetiştirilen TRPC1 geni susturulmuş veya kontrol uygulama yapılmış A7r5 hücreleri Fura-2 ile yüklendikten sonra Yöntem bölümünde belirtildiği gibi epiflüoresans yöntemi ile kullanılarak hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarındaki değişimler kaydedilmiştir. Kontrol agonist olarak sadece 5-HT kullanılmıştır. Bunun nedeni, kültür ortamında vasküler düz kas hücrelerinin sadece vazopresin reseptörlerinden başka sadece 5-HT reseptörlerini bulundurmasıdır. Doğrulamak amacıyla uygulanan KCl, fenilefrin ve seruma yanıt vermemiştir. Reseptörden bağımsız olarak SOC girişi SERCA blokörü olan sisklopiazonik asit (CPA) tarafından her seferinde aktive edilmiştir. Bu nedenle, CPA'nın aktive ettiği SOC yanıtları 5-HT aracılığı ile artan Ca^{2+} yanıtlarına orantılanmıştır. Bazı hücre örneklerinde SOCC'leri bloke ettiği ileri sürülen ve organik yapıları nedeniyle TRIM ve 2APB'nin öncelikle CPA yanıtları üzerindeki etkileri test edilmiştir (Şekil 6.9).

A



B

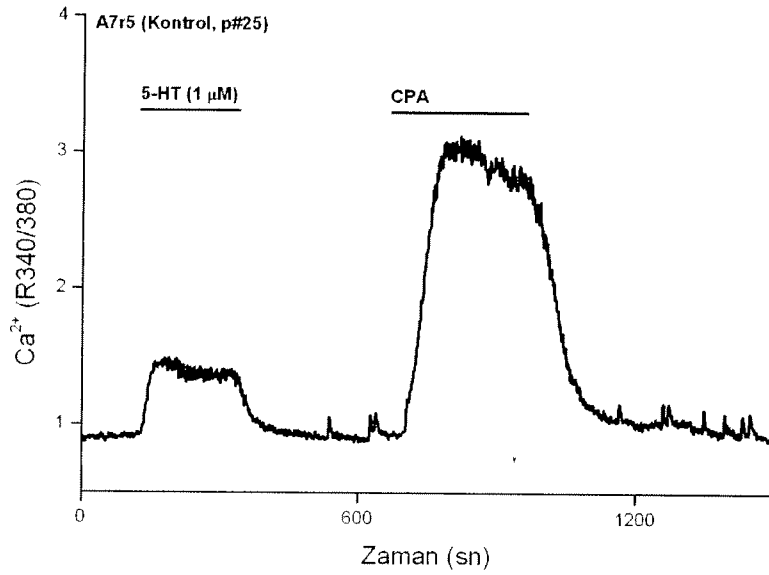


Şekil 6.9. CPA'nın neden olduğu Ca²⁺ artışları üzerine 2APB ve TRIM'in etkileri. 2APB'nin yüksek (100 µM, A) ve düşük (10 µM, B) konsantrasyonlarının etkisi görülmektedir.

2APB 100 µM konsantrasyonda kullanıldığında hücre içi SERCA ilişkili depoları tamamen boşalttığı bilinen 10 µM CPA Ca²⁺ yanıtını bazal düzeyin altına düşürmüştür (Şekil 6.9A).

Daha sonra 10 μM 2APB'nin optimal düzeyde etkili olduğu saptanmıştır (**Şekil 6.9B**). Yüksek konsantrasyonda kullanılmasına karşın CPA yanıtı üzerine TRIM herhangi bir inhibitör etkinlik göstermemiştir (**Şekil 6.9**). Ancak, yine de etkisizliğini doğrulamak için her defasında kullanılmıştır.

İlginç olarak, hücre pasaj numarası arttıkça 5-HT yanıtında belirgin bir değişiklik olmazken CPA yanıtlarında artışlar gözlenmiştir (**Şekil 6.10**).



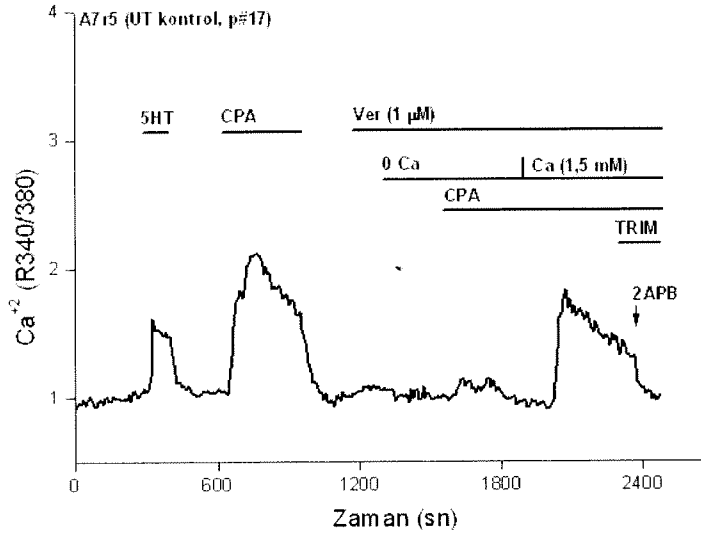
Şekil 6.10. Yüksek pasaj numaralı hücrelerde CPA yanıtlarındaki artış.

CPA yanıtlarının sadece SOC'dan kaynaklanan bölümünün TRIM ve 2-APB duyarlılığını test etmek için perfüzyon çözeltisi Ca^{2+} içermeyen HEPES tampon çözeltisi ile değiştirilmiş ve küvet içine 10 μM CPA uygulanmıştır. Kalsiyumsuz ortamda verilen CPA sadece SR'leri boşaltarak geçici bir Ca^{2+} sinyaline neden olmuştur. CPA uygulamasından 10 dk sonra küvet içine 2 ml'de final konsantrasyon 1,5 mM olacak şekilde konsantre Ca^{2+} çözeltisi eklenmiştir.

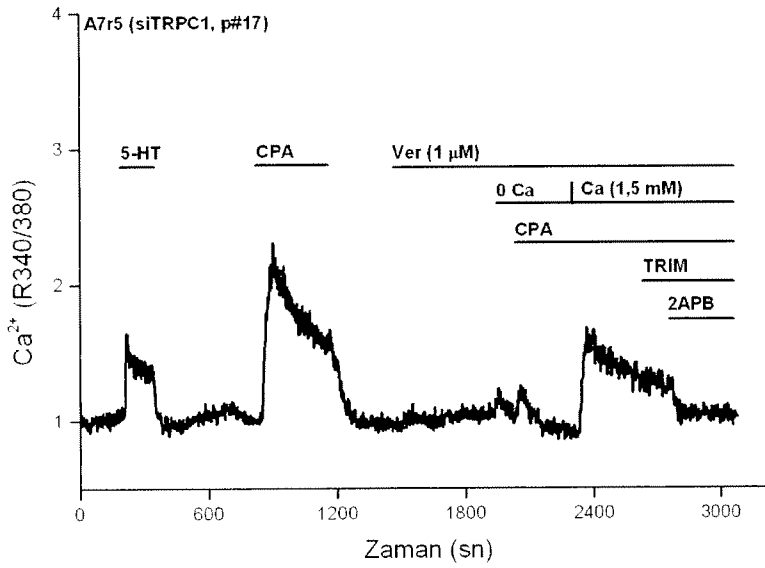
Bu aşamadan sonra gözlenen Ca^{2+} sinyalinin sadece SOC'den kaynaklandığı bilinmektedir (Şekil 6.11). TRIM bu koşulda zamanla azalma eğilimi olan SOC yanıtını değiştirmezken 50 μ M 2APB yine etkili olmuştur.

İleri pasajlarda daha belirgin olmak üzere TRPC1 geninin susturulması beklenenin aksine SOC yanıtlarını artırmıştır (Şekil 6.11, 6.12).

A

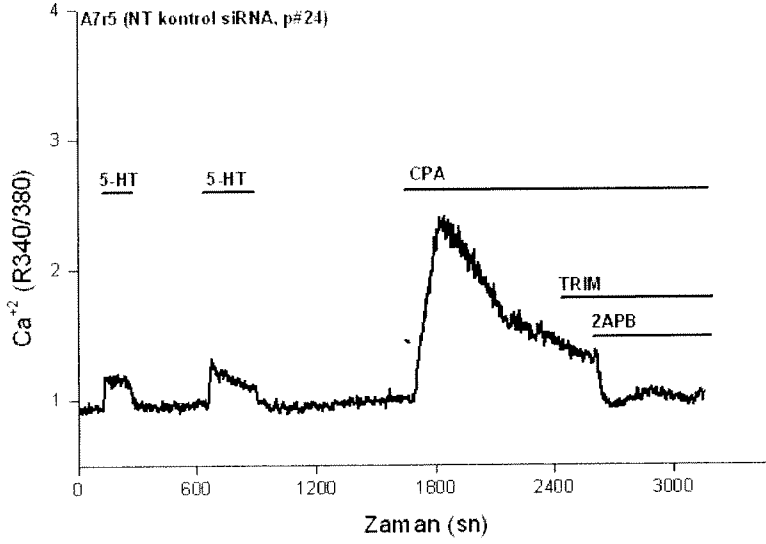


B

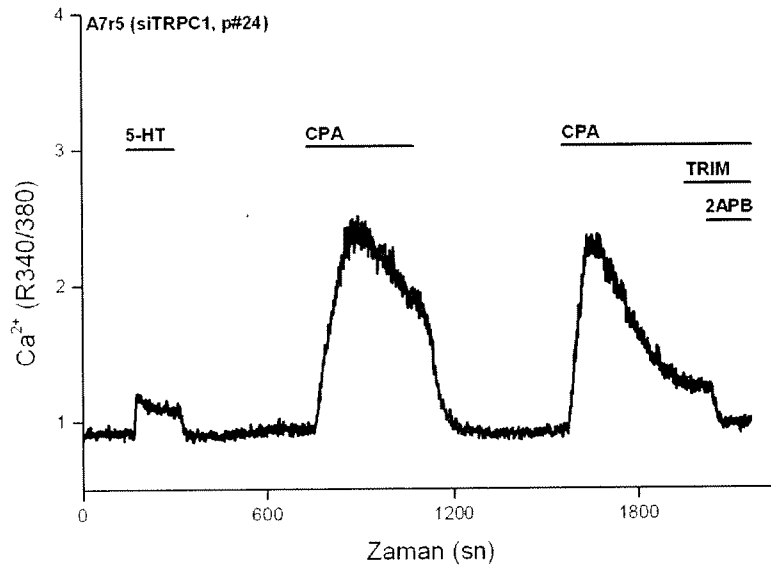


Şekil 6.11. Düşük pasaj numaralı hücrelere TRPC1 siRNA uygulamasından 72 saat sonra gözlenen SOC yanıtları ve 2-APB'nin etkisi. A: kontrol, B: siRNA uygulanmış.

A



B

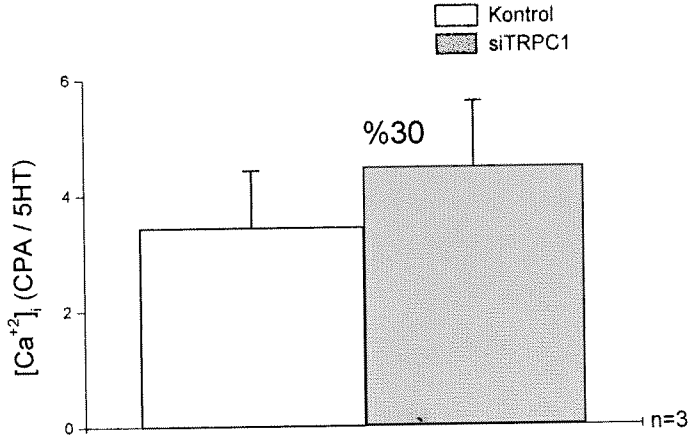


Şekil 6.12. Yüksek pasaj numaralı hürelere TRPC1 siRNA uygulamasından 72 saat sonra gözlenen SOC yanıtları ve 2-APB'nin etkisi. A: kontrol (NT), B: siRNA uygulanmış. Gen susturmanın kapasitatif Ca²⁺ üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla siTRPC1 uygulanan hücrelerde sırasıyla 5HT ve CPA yanıtları alınmış ve CPA yanıtları 5HT yanıtlarına

bölünerek (CPA/5HT) normalize edilmiştir. CPA/5HT yanıtları susturma uygulanan hücrelerde kontrol hücrelere göre ortalama %30 artmıştır. Ancak her denemeye ait sonuçların kendi içinde ve ekspresyon düzeylerindeki değişimlerle birlikte değerlendirilmesi daha gerçekçi olacaktır (Tablo 6.5, Şekil 6.13).

Tablo 6.4. Gen susturmanın CPA/5HT yanıtları üzerindeki etkisi. siTRPC1 uygulanan hücrelerde CPA/5HT yanıtları kontrol hücrelere göre ortalama %30 artmıştır.

Deneme	CPA/5HT		%Değişim
	Kontrol	siTRPC1	
1	3,04	5,95	↑95,37
2	5,32	5,23	↓1,82
3	1,93	2,27	↑17,24
Ort	3,43	4,48	↑30,50
O.S.H.	0,99	1,12	



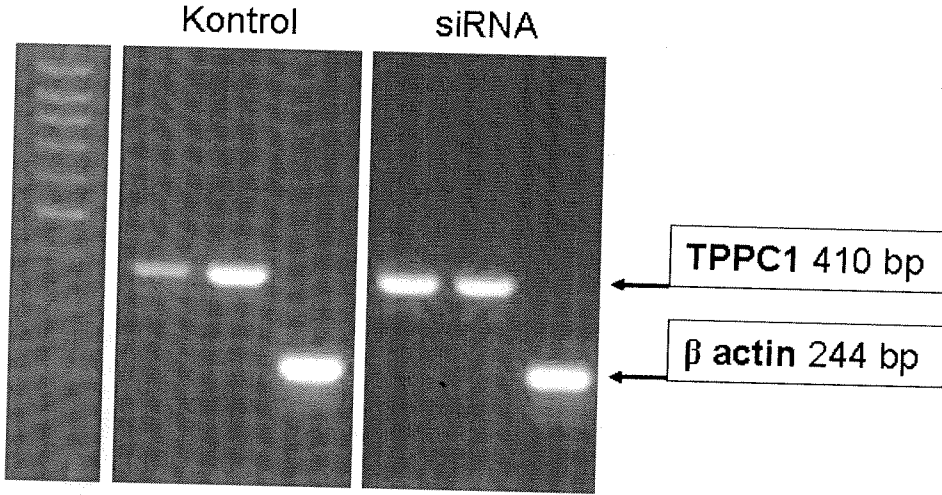
Şekil 6.13. Gen susturma (siTRPC1) ve kontrol örneklerinde kapasitatif Ca⁺² girişindeki değişimler. CPA'nın neden olduğu Ca⁺² artışları 5-HT yanıtları ile normalize edilmiştir. n=3

6.3 *In vivo* siRNA uygulaması (Ön deneme sonuçları)

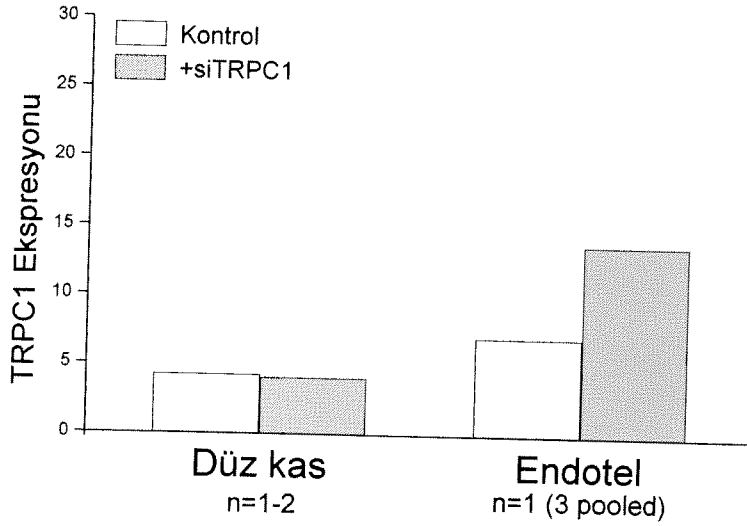
6.3.1 *In vivo* siRNA uygulamasının TRPC mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi

Veri azlığı nedeniyle parenteral siTRPC1 uygulamasının TRPC1 ekspresyonları üzerinde herhangi bir etkisi belirlenememiştir. Ancak, endotelde siTRPC1 uygulaması sonrası TRPC1 ekspresyonlarında artış gözlenmiştir (Şekil 6.14.).

A

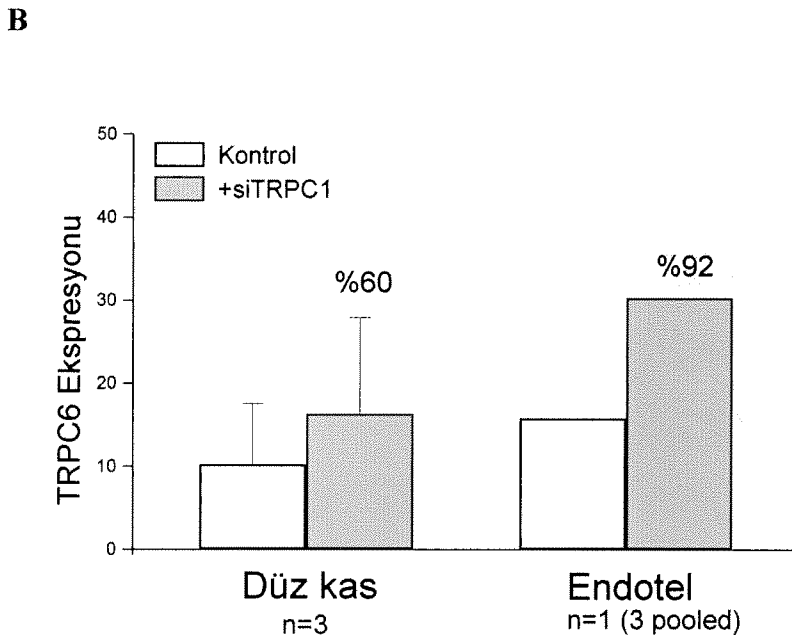
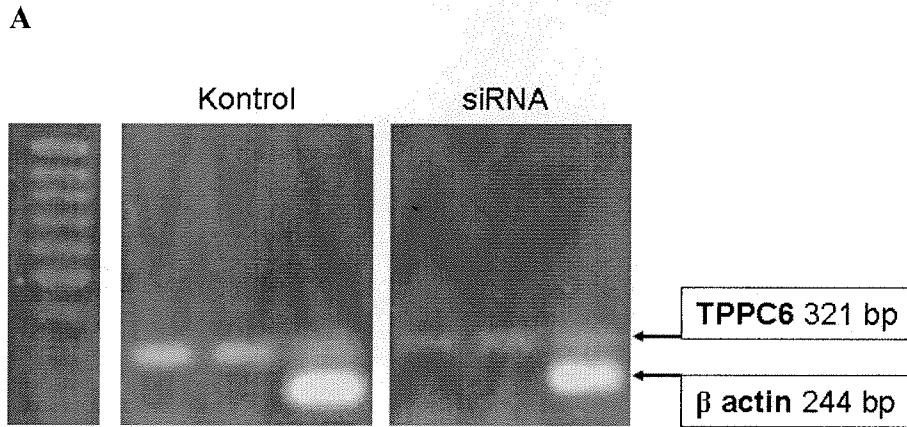


B



Şekil 6.14. Parenteral siTRPC1 uygulamasının vasküler düz kas ve endoteldeki TRPC1 ekspresyonu üzerindeki etkisi. Mikroemülsiyon formülasyonu içinde 40 μ g/kg siTRPC1 karışımının kuyruk veninden uygulanmasının 72 saat sonra SD torasik aortunda TRPC1 ekspresyonu üzerindeki etkisi A: PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri, B: kantitatif ekspresyon değerleri. Üç mRNA örneği birleştirilerek (pooled) çalışılmıştır.

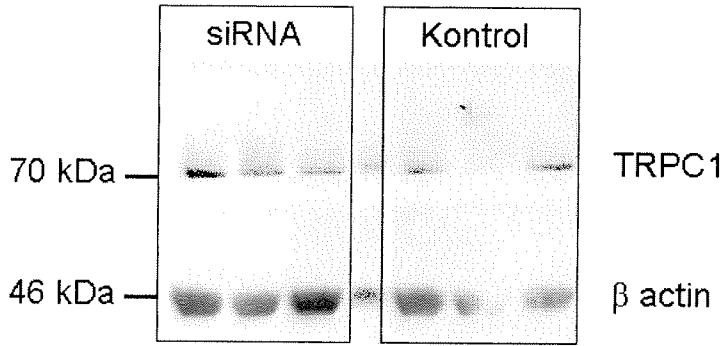
Vasküler düz kas hücre kültüründe elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde siTRPC1 uygulaması *in vivo* ortamda da TRPC6 ekspresyonlarında artışa neden olmuştur (Şekil 6.15B). Sağlam dokuda ek olarak endotelde de benzer artışlar izlenmiştir (Şekil 6.15B).



Şekil 6.15. Parenteral siTRPC1 uygulamasının vasküler düz kas ve endoteldeki TRPC6 ekspresyonu üzerindeki etkisi. Mikroemülsiyon formülasyonu içinde 40 µg/kg siTRPC1 karışımının (250 µl) kuyruk veninden yavaş infüzyon şeklinde uygulanmasının 72 saat sonra torasik aortdaki TRPC6 ekspresyonu üzerindeki etkisi A: PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri, B: kantitatif ekspresyon değerleri.

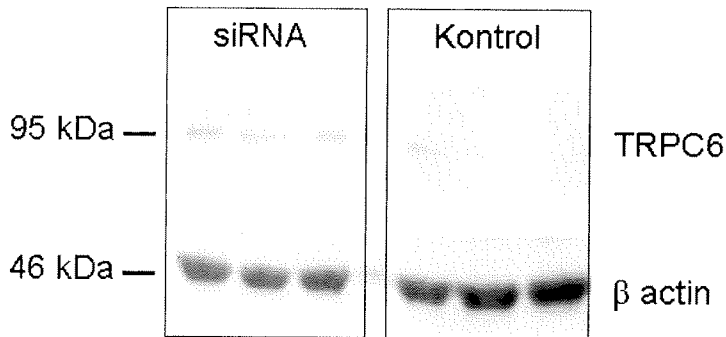
6.3.2 *In vivo* siRNA uygulamasının TRPC protein ekspresyonu üzerindeki etkisi

Parenteral siTRPC1 uygulanan örneklerde TRPC1 protein ekspresyonlarında kontrole oranla görünür bir azalma belirlenememiştir (Şekil 6.16.).



Şekil 6.16. Parenteral siTRPC1 uygulamasının TRPC1 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi. Aynı ayrı TRPC1 ve β-aktin antikoru ile etkileştirilmiş membran fragmanları görülmektedir. Her bir kolon ayrı sıçanlardan izole edilen protein örneklerine aittir.

Parenteral siTRPC1 uygulanan örneklerde TRPC6 protein ekspresyonlarında kontrole oranla artış gözlenmiştir (Şekil 6.17.).



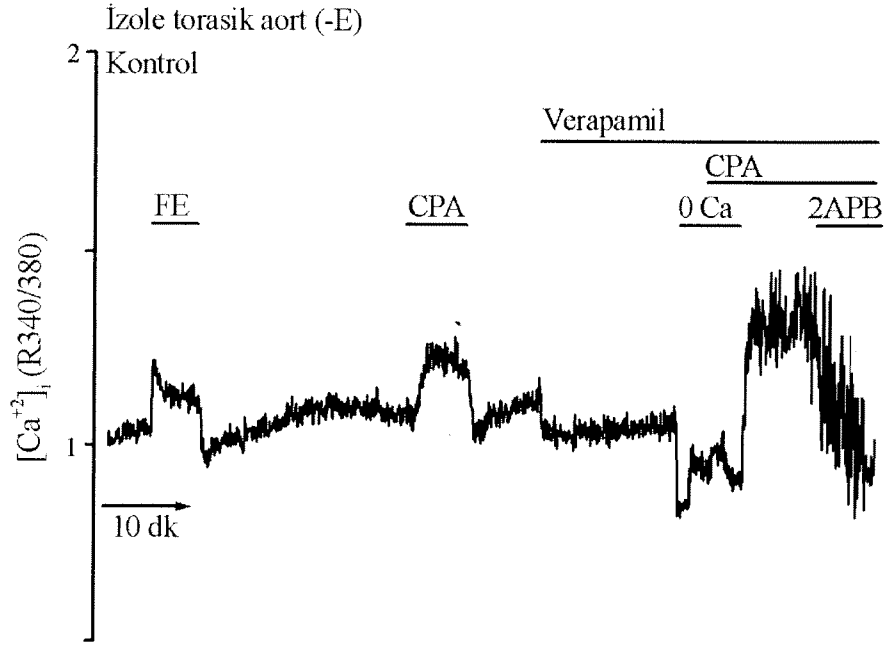
Şekil 6.17. Parenteral siTRPC1 uygulamasının TRPC6 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi. Aynı ayrı TRPC6 ve β-aktin antikoru ile etkileştirilmiş membran fragmanları görülmektedir. Her bir kolon ayrı sıçanlardan izole edilen protein örneklerine aittir.

6.3.3 *In vivo* siRNA uygulamasının Ca^{+2} düzeyleri üzerindeki etkisi

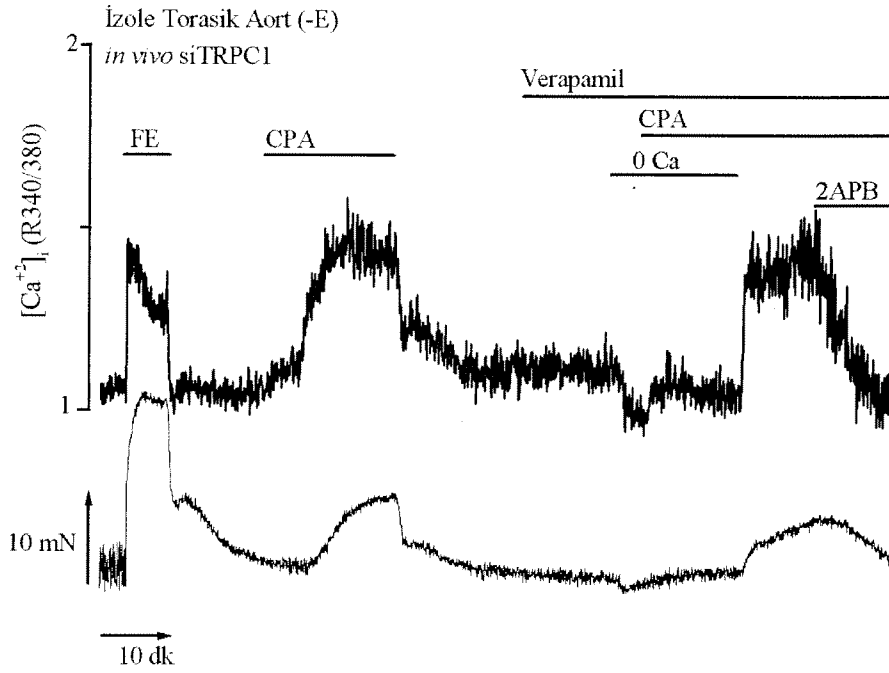
Biyokimyasal çalışmalara ek olarak aynı torasik aortun orta bölümünden kesilen 3 mm boyundaki damar halkası ile simültane Ca^{+2} /kontraktilite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla izole torasik aortta kapasitatif Ca^{+2} girişini (CCE) aktive eden 10 μ M CPA yanıtları karşılaştırılmıştır. CPA'nın neden olduğu Ca^{+2} artışları, L-tipi Ca^{+2} kanallarının olası etkisini gidermek amacıyla Ca^{+2} içermeyen krebsle ve 10 μ M verapamil varlığında CPA uygulanmış ve depoların boşalmasını takiben final konsantrasyonu 2,5 mM olacak şekilde Ca^{+2} küvete ilave edilmiştir. Bu durumda damar düz kas hücreleri içine giren kalsiyumun çoğunlukla TRPC ilişkili depo-kontrollü Ca^{+2} girişinden (SOCE) kaynaklandığı kabul edilmektedir.

Kalsiyumun tekrar ilavesi ile yapılan deneylerde SOCE'de değişiklik görülmezken, normal krebsteki CPA ve α -AR aracılı yanıtlarda artış görülmüştür (Şekil 6.18).

A



B



Şekil 6.18. Vasküler düz kasta reseptör stimülasyonuna bağımlı ve bağımsız hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonlarındaki değişimler. α_1 -Adrenerjik reseptör stimülasyonu 1 μ M

fenilefrin (FE), reseptörden bağımsız ve SERCA inhibisyonu ile Ca^{+2} depolarını boşaltarak SOCE'yi aktive eden 10 μ M CPA uygulamaları görülmektedir. A: Kuyruk veninden sadece sıvağ uygulanmış endotelsizleştirilmiş sıçan izole torasik aortu; B: +siTRPC1, kuyruk veninden mikroemülsiyon formülasyonu içinde 40 μ g/kg siTRPC1 karışımının uygulanmasından 72 saat sonra izole edilen endotelsizleştirilmiş damar segmenti. (Not: Aynı gün içinde en fazla iki deneme yapılabildiği için kontrol ve test grubuna ait sadece iki deney trasesi görülmekte. B panelinde $[Ca^{+2}]_i$ değişimlerinin beraberinde eşzamanlı olarak kontraktıl yanıt gelişimi de izlenebilmiştir.)

7- TARTIŞMA ve SONUÇ

Farede siRNA uygulaması ile PTGS (RNA interferans veya genetik “knock-down”) ve delesyon yolu ile genetik “knock-out” çalışmaları sonucunda TRPC1 (BRUEGGEMANN, 2006; CHEN, 2003; WU, 2004) ve TRPC4’ün (FREICHEL, 2001; TIRUPPATHI, 2002) SOCC bileşiminde olduğu önerilmiştir. Sıçan aortunda baskın izoformlar olan TRPC1 ve TRPC6 ekspresyonlarının (SOBOLOFF, 2005; SOBOLOFF, 2006; YIP, 2004) yaşlanma sürecinde dramatik bir şekilde değişmesi (makale değerlendirme aşamasında, SBAG2735) ve burada sunulan işlevsel genomik bulgularımız doğrultusunda bu iki alt tipin vasküler düz kas Ca^{+2} homeostazı için esansiyel olduğunu düşündürmektedir.

Fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde önemi giderek artan ve gelişimsel süreçte işlevsel oldukları bildirilen (BABICH, 2004; CLARSON, 2003; STRUBING, 2003) TRPC proteinlerinin sıçan torasik aortunda yaşlanma sürecinde ekspresyonlarının ayırmsal olarak değişmesi (SBAG2735) SOCC yapısına giren alt tiplerin bulunması ile yaşlılık fenotipininin belirlenme yolunu açmıştır.

TRPC1’in olası inhibitör etkinliği:

TRPC1’in transkripsiyonel düzeyde ~%40 oranında baskılandığı hücrelerde SERCA blokajı ile aktive olan SOC artışının TRPC1’in Ca^{+2} kanalının düzenleyici alt birimi olduğunu düşündürmüştür. Bu öneriye karşı tek gözlem yine A7r5 hücrelerinde ancak stabil siRNA ekspresyonu oluşturan plazmid vektör kullanılan bir çalışmadan gelmektedir (BRUEGGEMANN, 2006). TRPC1, 4 ve 6 dışında TRPC alt tiplerinin belirlenemediği söz

konusu çalışmada araştırmacılar TRPC1 siRNA eksprese eden A7r5 hücrelerinde yine bir SERCA blokörü olan tapsigargin tarafından oluşturulan SOC girişinin azaldığını gözlemlemişlerdir (BRUEGGEMANN, 2006). Bu kapsamda Brueggemann ve arkadaşlarının kullandığı hücre hatlarının pasaj numaralarının spesifik olarak belirtilmemesi çalışmaların doğrudan yorumunu etkilemektedir. Bu kapsamdaki kendi çalışma protokollerimiz sırasında pasaj numaraları da dikkate alınmıştır. Bunun önemli bir nedeni pasajlanmasında da hücre yaşlanma sürecini taklit etmesidir. CPA yanıtlarının özellikle ileri pasajlarda gözlenmesi bunun önemli bir göstergesidir. SBAG-2735 numaralı projemizde TRPC ekspresyonlarının yaşlanma sürecindeki sıçan aortunda ayırimsal ve dramatik olarak değiştiğinin ilk defa tarafımızdan gözlenmesi (ERAC, 2006) hücre yaşlanmada da aynı regülatör yolların aktive olabileceğini düşündürmektedir.

Pulmoner arter düz kas hücrelerinde de A7r5'lere benzer şekilde TRPC1, 4 ve 6 mRNA düzeyleri diğer TRPC alttiplerinden belirgin düzeyde daha fazla olduğu gösterilmiştir (YU, 2004). TRPC3 ve 5'in belirlenemeyecek düzeyde oluşu bu alttiplerin özellikle endotel hücrelerinde daha işlevsel olduğunu speküle etmektedir. TRPC4 protein düzeylerinin endotelsizleştirmeye paralel olarak azalması (BERGDAHL, 2005) bu izoformun spesifik olarak endotelde bulunduğunu önermektedir (FREICHEL, 2004; MINKE, 2006; PAREKH, 2005). Böylelikle vasküler düz kas için TRPC1 ve TRPC6 en dikkat çekici aday konumuna gelmektedir.

Perivasküler silikon yaka uygulanmış fare karotid arterinde intimal hiperplazi gelişimi beraberinde TRPC1 ekspresyonunda ve SERCA blokörü tapsigarginin neden olduğu hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunda artışlar gözlenmiştir (KUMAR, 2006). Bu gözlem TRPC1'in SOC girişinde etkili olan SOCC'nin işlevsel alt birimi olduğunu önermekle birlikte kendi bulgu ve

önerilerimize görünürde bir zıtlık oluşturmaktadır. Ancak gözlemlerin vasküler hasar modelinde yapılmış olması söz konusu SOCC'nin patolojik durumdaki bileşimi ve işlevi ile ilişkili gözükmektedir.

TRPC6 ekspresyonundaki artışın olası kompensatuvar işlevi:

Çalışmalarımızda TRPC1 ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanması sonucunda TRPC6 ekspresyonunun hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışlarla karakterize SOC potansiyalizasyonun görüldüğü hücrelerde artması oldukça dikkat çekici bir bulgudur. *In vivo* siTRPC1 ön denemelerimizde TRPC1 mRNA düzeylerinde belirgin bir değişim olmamasına karşın TRPC6 ekspresyonundaki artış TRPC1'e herhangi bir müdahalenin TRPC6 ekspresyonunu tetiklediğini düşündürmektedir. TRPC6'nın α -AR aktivasyonu içinde bir komponent olduğuna ilişkin artan veriler doğrultusunda erken ve henüz tek gözlem olmasına karşın parenteral (*in vivo*) siTRPC1 uygulanmış deneklerde fenilefrin-aracılı Ca^{+2} artışı bu önerileri destekleyici gözükmektedir. Bu gözlemler stabil TRPC1 siRNA eksprese eden A7r5 hücrelerinde diğer TRPC alttiplerinde herhangi bir değişiklik görülmemesi ile uyumsuzdur (BRUEGGEMANN, 2006). Bu durum söz konusu araştırmada plazmid vektör aracılı eksprese edilen siRNA'lara bizimkinde ise "çıplak" siRNA" dublekslerinin kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir. TRPC6'nın SOC kanalı bileşiminde olmayıp daha çok α_1 -adrenerjik reseptörlerin sinyal yolağının bir bileşeni olduğuna ilişkin kanıtlar (INOUE, 2001; WELSH, 2002) bulunmakla birlikte TRPC1'in baskılanması ile vasküler düz kas hücrelerinde yaygın bulunan TRPC6'nın tercihli olarak kanal bileşimine girmesi yine de akılcı görülmektedir.

Diğer yandan idiyopatik pulmoner arter hipertansiyonu olan hastalarda artan vasküler rezistanstan başlıca pulmoner arter (PA) düz kas hücre proliferasyonu sorumlu görünmektedir. Normal PA düz kas hücrelerinde en yaygın eksprese edilen TRPC6'nın proliferasyon belirteci

önerilerimize görünürde bir zıtlık oluşturmaktadır. Ancak gözlemlerin vasküler hasar modelinde yapılmış olması söz konusu SOCC'nin patolojik durumdaki bileşimi ve işlevi ile ilişkili gözükmemektedir.

TRPC6 ekspresyonundaki artışın olası kompensatuvar işlevi:

Çalışmalarımızda TRPC1 ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanması sonucunda TRPC6 ekspresyonunun hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışlarla karakterize SOC potansiyalizasyonun görüldüğü hücrelerde artması oldukça dikkat çekici bir bulgudur. *In vivo* siTRPC1 ön denemelerimizde TRPC1 mRNA düzeylerinde belirgin bir değişim olmamasına karşın TRPC6 ekspresyonundaki artış TRPC1'e herhangi bir müdahalenin TRPC6 ekspresyonunu tetiklediğini düşündürmektedir. TRPC6'nın α -AR aktivasyonu içinde bir komponent olduğuna ilişkin artan veriler doğrultusunda erken ve henüz tek gözlem olmasına karşın parenteral (*in vivo*) siTRPC1 uygulanmış deneklerde fenilefrin-aracılı Ca^{+2} artışı bu önerileri destekleyici gözükmemektedir. Bu gözlemler stabil TRPC1 siRNA eksprese eden A7r5 hücrelerinde diğer TRPC alttiplerinde herhangi bir değişiklik görülmemesi ile uyumsuzdur (BRUEGGEMANN, 2006). Bu durum söz konusu araştırmada plazmid vektör aracılı eksprese edilen siRNA'lara bizimkinde ise "çıplak" siRNA" dublekslerinin kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir. TRPC6'nın SOC kanalı bileşiminde olmayıp daha çok α_1 -adrenerjik reseptörlerin sinyal yolağının bir bileşeni olduğuna ilişkin kanıtlar (INOUE, 2001; WELSH, 2002) bulunmakla birlikte TRPC1'in baskılanması ile vasküler düz kas hücresinde yaygın bulunan TRPC6'nın tercihli olarak kanal bileşimine girmesi yine de akılcı görülmektedir.

Diğer yandan idiyopatik pulmoner arter hipertansiyonu olan hastalarda artan vasküler rezistanstan başlıca pulmoner arter (PA) düz kas hücre proliferasyonu sorumlu görülmektedir. Normal PA düz kas hücrelerinde en yaygın eksprese edilen TRPC6'nın proliferasyon belirteci

Ki67 ekspresyonu ile yakın ilişkili olması TRPC6'nın PA hücrelerinin sessiz fazdan mitoz bölünme sürecine geçmelerinde işlevsel olduğunu düşündürmüştür (YU, 2004). Aynı çalışmada, siRNA aracılı TRPC6 ekspresyonunun transkripsiyonel düzeyde baskılanması sonucu PA hücrelerinin proliferasyonunun belirgin düzeyde baskılandığı gösterilerek TRPC6'nın hücre çoğalmasındaki işlevi doğrulanmıştır.

Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda herhangi bir reseptör aktivatörünün kullanılmadığı ve sadece selektif SERCA blokörü CPA tarafından uyarılan hücre içi Ca^{+2} yanıtlarındaki belirgin artışlara paralel post-transkripsiyonel TRPC1 mRNA baskılanma oranına benzer TRPC6 ekspresyon artışı işlevsel bir kompensatuvar mekanizmanın varlığını düşündürmektedir (SELLI, 2007). Buna ek olarak 5-HT ve AVP (arjinin vazopresin) dışında herhangi bir agoniste yanıt vermeyen A7r5 hücre hattındaki söz konusu TRPC1 ve TRPC6 ilişkisi TRPC1 ekspresyonunun ve buna bağlı olarak kapasitatif Ca^{+2} girişinin sıkı bir şekilde kontrol edildiğini düşündürmektedir. CCE'nin genellikle subsarkolemmal alanlarda görülmesi ve bu alanların SR'ler tarafından sınırlandırılmış oluşu CCE'nin özellikle protein sentezinde önemli işlev gördüğü hipotezini kuvvetlendirmektedir (HUSSAIN, 1999). CCE'nin protein sentezindeki olası işlevi proliferatif süreçteki önemi ile de örtüşmektedir.

Tablo 7.1. Ekspresyon düzeyleri ve SOC girişindeki değişim. Aynı seri içinde siTRPC1 uygulanan vasküler düz kas hücrelerinde TRPC1 ekspresyon düzeyinin azalmasının ve C6 düzeyinin artmasının CPA'nın neden olduğu kapasitatif Ca^{+2} artışı üzerindeki etkilerini yorumlamak için bir arada göstermektedir.* TRPC6 ekspresyonunun ileri düzeyde artışının görüldüğü bu denemede ilginç bir şekilde Ca^{+2} yanıtları değişmemiştir. Bu gözlemin siRNA eksprese eden vektör ile susturma etkinliğinin ayarlanabildiği sistemler kullanılarak doğrulanması gerekmektedir.

Deneme	% Değişim		
	TRPC1	TRPC6	CPA/5HT
1	58,33 ↓	26,46 ↑	95,37 ↑
2	50,24 ↓	140,82 ↑	1,82 ↓*
3	28,21 ↓	6,74 ↓	17,24 ↑
Ort	39,85 ↓	72,17 ↑	30,50 ↑

SOCC'nin kimyasal ajanlarla blokajı (2-APB ve TRIM):

10 μ M CPA uygulaması sonucu gerçekleşen SERCA blokajına bağlı SOCC aktivasyonu ile artan hücre içi konsantrasyonunun TRIM tarafından etkilenmezken IP_3 reseptör blokörü ya da modülatörü olduğu önerilen 2-APB ile tamamen engellenmesi değişik mekanizmalarla yorumlanabilir. TRPC'lerin karboksi ucunda IP_3R ile etkileşme yerinin bulunması (TANG, 2001) selektif olmayan SOCC blokajı yaptığı önerilen 2-APB'nin TRPC alt tipi bileşenine göre yanıt ve duyarlılığında farklılık olabileceğini düşündürmektedir. Ca^{2+} depolarının boşalması sonucunda SR ile hücre membranlarının doğrudan etkileştiklerinin ileri sürülmesi (BERRIDGE, 1995; IRVINE, 1990) IP_3 reseptörünü SOCC'lerin aktivasyonu için gerekli işlevsel konuma getirmektedir (MA, 2000; MA, 2001). Ancak 2-APB'nin hepatositlerde IP_3

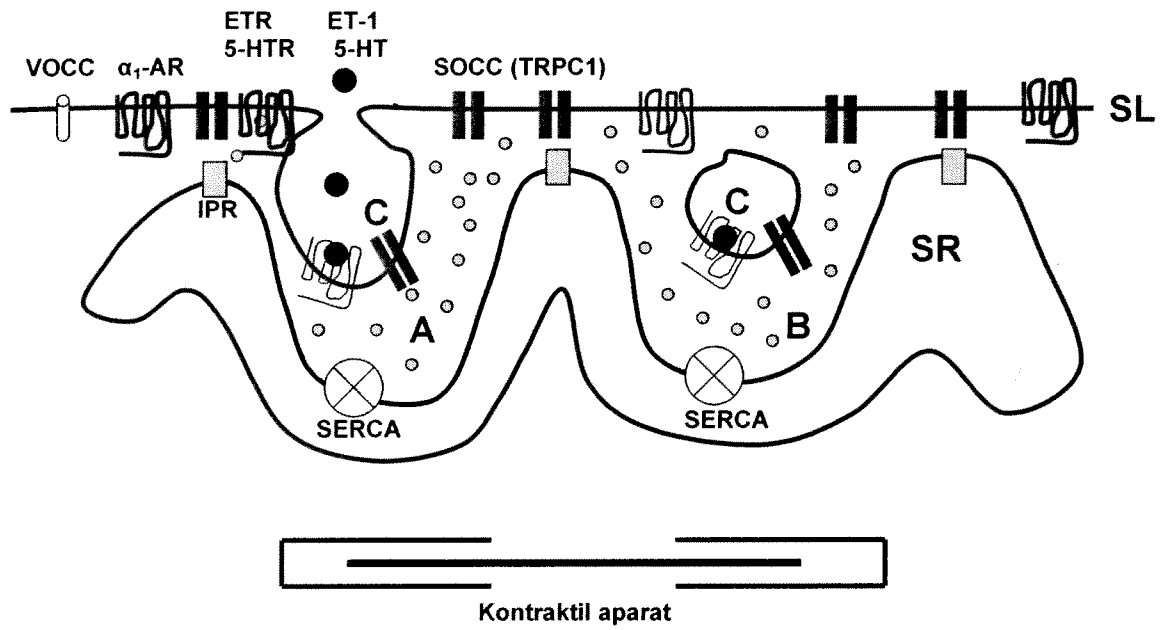
reseptörü ile etkileşimsiz SOC'yi bloke etmesi ve inferior vena kavada SOC yanıtlarını etkilememesi (LEE, 2002b) bu ajanın SOC araştırmalarında daha dikkatli kullanılması gerektiğini göstermektedir (GREGORY, 2001).

Bishara ve arkadaşları (BISHARA, 2002) fura-2 yüklü sıgır aortu endotel hücre kültüründe 30-100 μ M konsantrasyonlarda kullanılan 2-APB'nin ATP ve bradikinin ile reseptör-aracılı ve tapsigargin ile aktive edilen reseptörden bağımsız CCE'yi inhibe etmesinin yanı sıra ATP ve $[H^3]IP_3$ bağlanmasını etkilemediğini göstermişlerdir. Buna ek olarak aktin polimerizasyonu ile oluşan hücre iskeletinin sitokalsin (100 μ M) uygulaması ile bozulmasının da CCE'yi bloke ettiğinin gösterilmesi (BISHARA, 2002) SOCC aktivasyonu için SR ile hücre membranının doğrudan temas etmesi gerektiğini kanıtlamaktadır. Çalışmalarımızda 2-APB'nin VOCC blokörü verapamil (10 μ M) varlığında ve SR Ca^{+2} salıverilişinin önceden elimine edildiği durumda CCE sinyalini tamamen bloke etmesinin yanı sıra gerek canlı dokuda gerekse de hücre kültüründe 5-HT'nin neden olduğu Ca^{+2} sinyalini de inhibe etmesi selektif olmadığını göstermektedir. 2-APB'nin SOCC'lerin bileşiminde bulunan TRPC proteinlerinin SR'da bulunan IP_3 reseptörü ile etkileşimlerini bozarak etki gösterdikleri mantıklı gözükmektedir. TRPC1 geninin susturulmasının 2-APB etkinliğinde bir azalma yapmaması TRPC1 dışında bir alt tip ile etkileştiğini düşündürmektedir. Ancak, siTRPC1 uygulaması sonrası artan TRPC6'nın TRPC1'in yerine geçmesi ile 2-APB bağlanma bölgesinin kaybı da dikkate alınmalıdır.

TRPC'lerin işlevsel kompartmantalizasyonu:

Hücre içi kalsiyum ve kontraktıl yanıtlardaki eşzamanlı değişimleri sıçan torasik aortunda gözlemleyerek algılama düzeyimizi geliştirdiğimiz SOC'nin işlevsel kompartmantalizasyonu (TOSUN, 1998) üzerine çalışmalarımız SOCC bileşiminin belirlenmesi aşamasına gelmiştir.

Şekil 7.1'deki model SOC'nin çalışma mekanizmasını özetlemektedir SOC'nin endojen prostanooidlerin sentezinin bloke edildiği durumda (indometazin ile) kontraktıl aparatla etkileşmeyip sınırlarını yüzeyel SR ve hücre membranının oluşturduğu subsarkolemmal kompartmanlarda "hapsedildiği" ve ancak bu kompartmanla etkileşen reseptör aktivasyonu ile kontraksiyona kenetlendiğine ilişkin önerimiz hala kabul görmektedir (MCFADZEAN, 2002).



Şekil 7.1. Subsarkolemmal kompartman modeli (5-HT, ETR ve SOCC). Model özellikle vasküler düz kas hücresinde endotelin (ET) ve 5-HT reseptörü için seçimli kompartmantalizasyonu önermektedir. SOC özellikle subsarkolemmal SR'ler tarafından sınırlandırılmış yaklaşık 200-300 nm derinliğinde bir kompartman (LEE, 2002a) içinde artmaktadır. CPA aracılı sarko-endoplazmik retikulum Ca⁺² ATPaz (SERCA) inhibisyonu sonucu (⊗) Ca⁺² sızıntısı nedeniyle boşalan SR SOCC'leri aktive eder. A ve B kompartmanları dışında artan Ca⁺² SL Ca⁺² atım mekanizmaları ile sitoplazmadan uzaklaştırılır. A ve B Ca⁺² içeriği SOCC nedeniyle artmış halde kalır. A ve B'de artan Ca⁺² kaveola (C) membranında bulunan ET, 5-HT reseptörlerinin agonistleri ile birlikte internalizasyonunu kolaylaştırarak uzamış kontraksiyona neden olur ya da büyüme hormonu

varlığında hücre proliferasyonunu tetikler. Model tarafımızdan ilk defa önerilişi (TOSUN, 1998) sonrası Lockwick (LOCKWICH, 2000) ve Ma'nın (MA, 2000) fiziksel kenetlenme önerileri üzerine önerileri ve işlevsel bulgularımız (TOSUN, 2007) doğrultusunda modifiye edilmiştir.

Geleceğe yönelik uygulamalar:

Hipertansiyon ve felç gibi ileri vazospazmla karakterize hastalıklardaki işlevi bildirilen ve TRPC proteinlerinden oluştuğu önerilen kapasitatif kalsiyum kanallarının multimerik bileşiminin ve strese bağlı değişimlerinin belirlenmesi, geleneksel antagonisti olmayan bu kanalların işleyiş mekanizmalarının aydınlatılmasında ve ilgili hastalıkların tedavisinde kritik önem taşımaktadır. TRPC ve diğer TRP kanal proteinlerinin kanser olgularında ve özellikle nükleer faktör kappa B (NFκB) etkileşimi üzerinden apoptotik süreçlerde de işlev görmesi TRP gen ailesi tarafından kodlanan proteinlerin önemini çalışmamızda model olarak kullandığımız vasküler düz kas hücrelerinin ötesine taşımaktadır. Sinir hücrelerinde nörit oluşumunu tetikleyerek sinaptik bağlantılarda ve dolayısı ile sinaptik plastisitede işlev görmeleri TRPC'leri öğrenme ve bellek çalışmalarında temel hedef haline getirmektedir. Gelecekte izoform-, splice-variant- ve heteromerik kompleks-spesifik TRP blokajı sağlayan siRNA uygulamaları geliştirmek yeni mücadele alanını oluşturacaktır. Bu mantık doğrultusunda, gerçekleştirilecek çalışmaların analizlerinin yüksek doğrulukta yapılmasına olanak verecek teknolojik uygulamaların kullanılması sonuçların anlamlılığı bakımından kritik önem taşımaktadır.

RNAi teknolojisini uygulama aşamalarında kullanılan geleneksel analiz yöntemlerindeki sınırlamalar ve iyileştirilme önerileri:

1. **Hücre içi Ca^{+2} ölçümü:** Proje kapsamında geliştirdiğimiz epiflüoresans yöntemi ile hücre içi Ca^{+2} ölçüm aparatı amacımız doğrultusunda hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki global değişimleri izleme kapasitesi taşımaktadır. Cihaz spektrofloreometre küveti içine yerleştirilen gerek doku gerekse de lamel üzerinde yetiştirilen hücreler olsun sadece yaklaşık 4 mm^2 eksitasyon yüzeyi içine düşen hücrelerin ortalama emisyonunu belirlemektedir. Bu durum normal uygulamalarda genelde bir sorun oluşturmamaktadır. Ancak, başarılı gen transfeksiyonu yapılmış hücrelerin dışarıdan verilen siRNA'yı almamış hücrelerle aynı 4 mm^2 lik alanda bulunmaları izlenen Ca^{+2} sinyallerinin gerçek değerlerin altında gözükmesine yol açmaktadır. TRPC1 gen susturulmasının işlev kaybı olan fenotipin belirlenmesinde belirleyici olduğunu bulmamız nedeniyle bu durum bir sorun oluşturmamıştır. **Çözüm önerisi:** Mevcut cihaza CCD kameralı mikroskop modülünün takılması ile sadece siRNA alan hücrede ölçüm yapma fırsatı doğacaktır. Bu da ön denemelerini yaptığımız pSuper plazmid vektörünün yeşil flüoresans protein (GFP) eksprese eden tipinin kullanılması ile mümkün olabilir. Böylelikle, sadece GFP sinyalinin olduğu hücre mikroskopta hedeflenerek gerçek zamanlı Ca^{+2} ölçümü yapılabilecektir.

2. **Protein analizleri:** Geleneksel Western blot (WB) ve immünoflüoresans (IF) mikroskopisi yöntemleri düşük düzeyde eksprese olan proteinler için yeterli çözünürlükte ve tekrarlanabilen sonuçlar vermemiştir. Oldukça pahalı olan siRNA dublekslerinin kültür ortamında sınırlı sayıda (50 bin) hücreye uygulanması nedeniyle TriPure izolasyon çözeltisi ile total RNA'nın yanında WB duyarlık skalası içinde

yeterli miktarda protein izole edilememiştir. Diğer araştırmacılar siRNA uygulanmış farklı petri plaklarındaki hücrelerden sadece protein izolasyonu yapabilecek yöntemler kullanmışlardır. Ancak bu RNA'nın ayrı plaklardan elde edilmesi gibi yanıltıcı bir durum oluşturmuştur. Protein ve RNA'nın farklı kuyucuklardan elde edilmesi doğrulayıcı değildir. İmmünoflüoresans mikroskopisinde fluorofor sinyalindeki kayıp (fading veya photobleaching) kontrol ve siRNA uygulanmış hücre arasında karşılaştırma sorunu oluşturmaktadır. **Çözüm önerisi:** Son bir yıl içinde ticari olarak erişimi olan nanokristal partiküllerinin primer antikora konjuge edilmesi ile gerek WB gerekse de IF'de karşılaşılan duyarlık ve sinyal kaybı sorunları belirgin düzeyde azaltılabilecektir. Nanopartikül kullanımı ile aynı zamanda kantitatif analize de olanak sağlayabilir. Farklı boyuttaki nanopartiküller ile konjuge farklı primer antikora kullanımı ile aynı hücrede birden fazla proteinin işaretlenmesi de mümkün olacaktır.

3. **Kantitatif Real Time PCR:** TRPC1 siRNA kullanımına bağı olarak TRPC6 mRNA ekspresyonunda artış gözlememiz siRNA aracılı susturma sonrasında TRPC1'in yanı sıra diğer alt tiplerin transkripsiyon düzeylerindeki değişikliklerin kantitatif olarak izlenmesinin kritik olduğunu göstermiştir. siRNA uygulamasının pahalı olması nedeniyle örnek sayısını da sınırlandırmak zorunda kalmıştır. **Çözüm önerisi:** PCR analizinde flüoresans işaretli primer dizilerin kullanılması, hedef genlerin aynı örnek içinde ayrımsal amplifikasyonlarının gerçek zamanlı olarak izlenmesi ve nicel analizinin yüksek doğrulukta yapılmasını sağlayabilir.

8- REFERANSLAR

- ALBERT A.P., Large W.A., A Ca^{2+} -permeable non-selective cation channel activated by depletion of internal Ca^{2+} stores in single rabbit portal vein myocytes, *J Physiol*, 538(Pt 3), 717-28, (2002).
- AMBUDKAR I.S., Ca^{2+} signaling microdomains:platforms for the assembly and regulation of TRPC channels, *Trends Pharmacol Sci*, 27(1), 25-32, (2006).
- AMBUDKAR I.S., Ong H.L., Liu X., Bandyopadhyay B., Cheng K.T., TRPC1: The link between functionally distinct store-operated calcium channels, *Cell Calcium*, (2007).
- BABICH L.G., Ku C.Y., Young H.W., Huang H., Blackburn M.R., Sanborn B.M., Expression of capacitative calcium TrpC proteins in rat myometrium during pregnancy, *Biol Reprod*, 70(4), 919-24, (2004).
- BERGDAHL A., Gomez M.F., Wihlborg A.K., Erlinge D., Eyjolfson A., Xu S.Z., Beech D.J., Dreja K., Hellstrand P., Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: correlation with store-operated Ca^{2+} entry, *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(4), C872-80, (2005).
- BERRIDGE M.J., Capacitative calcium entry, *Biochem J*, 312 (Pt 1)(1-11, (1995).
- BERRIDGE M.J., Bootman M.D., Lipp P., Calcium--a life and death signal, *Nature*, 395(6703), 645-8, (1998).
- BERRIDGE M.J., Bootman M.D., Roderick H.L., Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7), 517-29, (2003).
- BISHARA N.B., Murphy T.V., Hill M.A., Capacitative Ca^{2+} entry in vascular endothelial cells is mediated via pathways sensitive to 2 aminoethoxydiphenyl borate and xestospongin C, *Br J Pharmacol*, 135(1), 119-28, (2002).

- BOLOTINA V.M., Store-operated channels: diversity and activation mechanisms, *Sci STKE*, 2004(243), pe34, (2004).
- BRUEGGEMANN L.I., Markun D.R., Henderson K.K., Cribbs L.L., Byron K.L., Pharmacological and electrophysiological characterization of store-operated currents and capacitative Ca^{2+} entry in vascular smooth muscle cells, *J Pharmacol Exp Ther*, 317(2), 488-99, (2006).
- BRUMMELKAMP T.R., Bernards R., Agami R., A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells, *Science*, 296(5567), 550-3, (2002).
- CAMELLO C., Lomax R., Petersen O.H., Tepikin A.V., Calcium leak from intracellular stores--the enigma of calcium signalling, *Cell Calcium*, 32(5-6), 355-61, (2002).
- CHEN J., Barritt G.J., Evidence that TRPC1 (transient receptor potential canonical 1) forms a Ca^{2+} -permeable channel linked to the regulation of cell volume in liver cells obtained using small interfering RNA targeted against TRPC1, *Biochem J*, 373(Pt 2), 327-36, (2003).
- CIOFFI D.L., Wu S., Stevens T., On the endothelial cell I(SOC), *Cell Calcium*, 33(5-6), 323-36, (2003).
- CLAPHAM D.E., TRP channels as cellular sensors, *Nature*, 426(6966), 517-24, (2003).
- CLARSON L.H., Roberts V.H., Hamark B., Elliott A.C., Powell T., Store-operated Ca^{2+} entry in first trimester and term human placenta, *J Physiol*, 550(Pt 2), 515-28, (2003).
- DIETRICH A., Chubanov V., Kalwa H., Rost B.R., Gudermann T., Cation channels of the transient receptor potential superfamily: Their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells, *Pharmacol Ther*, 112(3), 744-60, (2006).

- DIETRICH A., Kalwa H., Rost B.R., Gudermann T., The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance, *Pflugers Arch*, 451(1), 72-80, (2005).
- ELBASHIR S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, 411(6836), 494-8, (2001).
- ERAC Y., Selli C., Aydin I.T., Kosova B., Akcali K.C., Tosun M., Expressional and functional profile of TRPC gene family in aging rat aorta, *Febs J*, 273(S1), 121, (2006).
- FAN J., Byron K.L., Ca²⁺ signalling in rat vascular smooth muscle cells: a role for protein kinase C at physiological vasoconstrictor concentrations of vasopressin, *J Physiol*, 524 Pt 3(821-31), (2000).
- FASOLATO C., Hoth M., Penner R., A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx, *J Biol Chem*, 268(28), 20737-40, (1993).
- FIXEMER T., Wissenbach U., Flockerzi V., Bonkhoff H., Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression, *Oncogene*, 22(49), 7858-61, (2003).
- FLOCKERZI V., Oeken H.J., Hofmann F., Pelzer D., Cavalie A., Trautwein W., Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel, *Nature*, 323(6083), 66-8, (1986).
- FREICHEL M., Suh S.H., Pfeifer A., Schweig U., Trost C., Weissgerber P., Biel M., Philipp S., Freise D., Droogmans G., Hofmann F., Flockerzi V., Nilius B., Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice, *Nat Cell Biol*, 3(2), 121-7, (2001).

- FREICHEL M., Vennekens R., Olausson J., Hoffmann M., Muller C., Stolz S., Scheunemann J., Weissgerber P., Flockerzi V., Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models, *Biochem Biophys Res Commun*, 322(4), 1352-8, (2004).
- GREGORY R.B., Rychkov G., Barritt G.J., Evidence that 2-aminoethyl diphenylborate is a novel inhibitor of store-operated Ca^{2+} channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors, *Biochem J*, 354(Pt 2), 285-90, (2001).
- HOFMANN T., Schaefer M., Schultz G., Gudermann T., Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7461-6, (2002).
- HOTH M., Penner R., Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells, *Nature*, 355(6358), 353-6, (1992).
- HUSSAIN A., Inesi G., Involvement of Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases in cell function and the cellular consequences of their inhibition, *J Membr Biol*, 172(2), 91-9, (1999).
- INOUE R., Okada T., Onoue H., Hara Y., Shimizu S., Naitoh S., Ito Y., Mori Y., The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated Ca^{2+} -permeable cation channel, *Circ Res*, 88(3), 325-32, (2001).
- IRVINE R.F., 'Quantal' Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates--a possible mechanism, *FEBS Lett*, 263(1), 5-9, (1990).
- KUMAR B., Dreja K., Shah S.S., Cheong A., Xu S.Z., Sukumar P., Naylor J., Forte A., Cipollaro M., McHugh D., Kingston P.A., Heagerty A.M., Munsch C.M., Bergdahl A., Hultgardh-Nilsson A., Gomez M.F., Porter K.E., Hellstrand P., Beech D.J.,

- Upregulated TRPC1 channel in vascular injury in vivo and its role in human neointimal hyperplasia, *Circ Res*, 98(4), 557-63, (2006).
- LEE C.H., Poburko D., Kuo K.H., Seow C.Y., van Breemen C., Ca^{2+} oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(5), H1571-83, (2002a).
- LEE C.H., Rahimian R., Szado T., Sandhu J., Poburko D., Behra T., Chan L., van Breemen C., Sequential opening of IP(3)-sensitive Ca^{2+} channels and SOC during alpha-adrenergic activation of rabbit vena cava, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(5), H1768-77, (2002b).
- LEWIS R.S., Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes, *Annu Rev Immunol*, 19(497-521), (2001).
- LEWIS R.S., The molecular choreography of a store-operated calcium channel, *Nature*, 446(7133), 284-7, (2007).
- LI H.S., Xu X.Z., Montell C., Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF, *Neuron*, 24(1), 261-73, (1999).
- LIU J., Kim M.L., Heo W.D., Jones J.T., Myers J.W., Ferrell J.E., Jr., Meyer T., STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx, *Curr Biol*, 15(13), 1235-41, (2005).
- LIU X., Groschner K., Ambudkar I.S., Distinct Ca^{2+} -permeable cation currents are activated by internal Ca^{2+} -store depletion in RBL-2H3 cells and human salivary gland cells, HSG and HSY, *J Membr Biol*, 200(2), 93-104, (2004).
- LIU X., Wang W., Singh B.B., Lockwich T., Jadlovec J., O'Connell B., Wellner R., Zhu M.X., Ambudkar I.S., Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca^{2+} influx mechanism in salivary gland cells, *J Biol Chem*, 275(5), 3403-11, (2000).

- LOCKWICH T.P., Liu X., Singh B.B., Jadowiec J., Weiland S., Ambudkar I.S., Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains, *J Biol Chem*, 275(16), 11934-42, (2000).
- LOMAX R.B., Camello C., Van Coppenolle F., Petersen O.H., Tepikin A.V., Basal and physiological Ca^{2+} leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons, *J Biol Chem*, 277(29), 26479-85, (2002).
- MA H.T., Patterson R.L., van Rossum D.B., Birnbaumer L., Mikoshiba K., Gill D.L., Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca^{2+} channels, *Science*, 287(5458), 1647-51, (2000).
- MA H.T., Venkatachalam K., Li H.S., Montell C., Kurosaki T., Patterson R.L., Gill D.L., Assessment of the role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the activation of transient receptor potential channels and store-operated Ca^{2+} entry channels, *J Biol Chem*, 276(22), 18888-96, (2001).
- MACLENNAN D.H., Toyofuku T., Structure-function relationships in the Ca^{2+} pump of the sarcoplasmic reticulum, *Biochem Soc Trans*, 20(3), 559-62, (1992).
- MARASA B.S., Rao J.N., Zou T., Liu L., Keledjian K.M., Zhang A.H., Xiao L., Chen J., Turner D.J., Wang J.Y., Induced TRPC1 expression sensitizes intestinal epithelial cells to apoptosis by inhibiting NF-kappaB activation through Ca^{2+} influx, *Biochem J*, 397(1), 77-87, (2006).
- MARTONOSI A.N., Pikula S., The network of calcium regulation in muscle, *Acta Biochim Pol*, 50(1), 1-30, (2003).
- MCFADZEAN I., Gibson A., The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle, *Br J Pharmacol*, 135(1), 1-13, (2002).

- MINKE B., TRP channels and Ca²⁺ signaling, *Cell Calcium*, 40(3), 261-75, (2006).
- MINKE B., Cook B., TRP channel proteins and signal transduction, *Physiol Rev*, 82(2), 429-72, (2002).
- MONTELL C., The venerable inveterate invertebrate TRP channels, *Cell Calcium*, 33(5-6), 409-17, (2003).
- MONTELL C., The TRP superfamily of cation channels, *Sci STKE*, 2005(272), re3, (2005).
- MOORE G.A., McConkey D.J., Kass G.E., O'Brien P.J., Orrenius S., 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone--a novel inhibitor of liver microsomal Ca²⁺ sequestration, *FEBS Lett*, 224(2), 331-6, (1987).
- OKON E.B., Golbabaie A., van Breemen C., In the presence of L-NAME SERCA blockade induces endothelium-dependent contraction of mouse aorta through activation of smooth muscle prostaglandin H2/thromboxane A2 receptors, *Br J Pharmacol*, 137(4), 545-53, (2002).
- ONG H.L., Liu X., Sharma A., Hegde R.S., Ambudkar I.S., Intracellular Ca²⁺ release via the ER translocon activates store-operated calcium entry, *Pflugers Arch*, 453(6), 797-808, (2007).
- PAREKH A.B., Penner R., Store depletion and calcium influx, *Physiol Rev*, 77(4), 901-30, (1997).
- PAREKH A.B., Putney J.W., Jr., Store-operated calcium channels, *Physiol Rev*, 85(2), 757-810, (2005).
- PIGOZZI D., Ducret T., Tajeddine N., Gala J.L., Tombal B., Gailly P., Calcium store contents control the expression of TRPC1, TRPC3 and TRPV6 proteins in LNCaP prostate cancer cell line, *Cell Calcium*, 39(5), 401-15, (2006).
- PUTNEY J.W., Jr., A model for receptor-regulated calcium entry, *Cell Calcium*, 7(1), 1-12, (1986).

- PUTNEY J.W., Jr., Capacitative calcium entry revisited, *Cell Calcium*, 11(10), 611-24, (1990).
- PUTNEY J.W., Jr., The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels, *Trends Cell Biol*, 14(6), 282-6, (2004).
- PUTNEY J.W., Jr., Broad L.M., Braun F.J., Lievremont J.P., Bird G.S., Mechanisms of capacitative calcium entry, *J Cell Sci*, 114(Pt 12), 2223-9, (2001).
- RANDRIAMAMPITA C., Tsien R.Y., Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx, *Nature*, 364(6440), 809-14, (1993).
- ROOS J., DiGregorio P.J., Yeromin A.V., Ohlsen K., Liudyno M., Zhang S., Safrina O., Kozak J.A., Wagner S.L., Cahalan M.D., Velicelebi G., Stauderman K.A., STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function, *J Cell Biol*, 169(3), 435-45, (2005).
- SCHILLING W.P., Cabello O.A., Rajan L., Depletion of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive intracellular Ca^{2+} store in vascular endothelial cells activates the agonist-sensitive Ca^{2+} -influx pathway, *Biochem J*, 284 (Pt 2)(521-30, (1992).
- SEIDLER N.W., Jona I., Vegh M., Martonosi A., Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, *J Biol Chem*, 264(30), 17816-23, (1989).
- SELLİ Ç., Eraç Y., Kosova B., Korkmaz C., Korkmaz K.S., Tosun M., Post-Transkripsiyonel Gen Susturma (PTGS): A7r5 Hücrelerinde Depo-Kontrollü Kalsiyum Kanalının İşlevsel Bileşiminin Belirlenmesi. Türk Farmakoloji Derneği 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2007, 431. , (2007).
- SIMON A.M., McWhorter A.R., Decreased intercellular dye-transfer and downregulation of non-ablated connexins in aortic endothelium deficient in connexin37 or connexin40, *J Cell Sci*, 116(Pt 11), 2223-36, (2003).

- SMYTH J.T., Dehaven W.I., Jones B.F., Mercer J.C., Trebak M., Vazquez G., Putney J.W., Jr., Emerging perspectives in store-operated Ca^{2+} entry: roles of Orai, Stim and TRP, *Biochim Biophys Acta*, 1763(11), 1147-60, (2006).
- SOBOLOFF J., Spassova M., Xu W., He L.P., Cuesta N., Gill D.L., Role of endogenous TRPC6 channels in Ca^{2+} signal generation in A7r5 smooth muscle cells, *J Biol Chem*, 280(48), 39786-94, (2005).
- SOBOLOFF J., Spassova M.A., Tang X.D., Hewavitharana T., Xu W., Gill D.L., Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function, *J Biol Chem*, 281(30), 20661-5, (2006).
- STRUBING C., Krapivinsky G., Krapivinsky L., Clapham D.E., Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain, *J Biol Chem*, 278(40), 39014-9, (2003).
- TAKAHASHI M., Seagar M.J., Jones J.F., Reber B.F., Catterall W.A., Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(15), 5478-82, (1987).
- TANABE T., Takeshima H., Mikami A., Flockerzi V., Takahashi H., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T., Numa S., Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle, *Nature*, 328(6128), 313-8, (1987).
- TANG J., Lin Y., Zhang Z., Tikunova S., Birnbaumer L., Zhu M.X., Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels, *J Biol Chem*, 276(24), 21303-10, (2001).
- THASTRUP O., Role of Ca^{2+} -ATPases in regulation of cellular Ca^{2+} signalling, as studied with the selective microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibitor, thapsigargin, *Agents Actions*, 29(1-2), 8-15, (1990).

- TIRUPPATHI C., Freichel M., Vogel S.M., Paria B.C., Mehta D., Flockerzi V., Malik A.B.,
Impairment of store-operated Ca^{2+} entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in
lung microvascular permeability, *Circ Res*, 91(1), 70-6, (2002).
- TOSUN M., Erac Y., Selli C., Karakaya N., Sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -
ATPase inhibition prevents endothelin A receptor antagonism in rat aorta, *Am J
Physiol Heart Circ Physiol*, 292(4), H1961-6, (2007).
- TOSUN M., Paul R.J., Rapoport R.M., Coupling of store-operated Ca^{++} entry to contraction
in rat aorta, *J Pharmacol Exp Ther*, 285(2), 759-66, (1998).
- TREPAKOVA E.S., Csutora P., Hunton D.L., Marchase R.B., Cohen R.A., Bolotina V.M.,
Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular
smooth muscle cells, *J Biol Chem*, 275(34), 26158-63, (2000).
- TSAVALER L., Shapero M.H., Morkowski S., Laus R., Trp-p8, a novel prostate-specific
gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high
homology with transient receptor potential calcium channel proteins, *Cancer Res*,
61(9), 3760-9, (2001).
- VAN BREEMEN C., Poburko D., Okon E.B., TRP proteins: a new dimension in the
treatment of occlusive vascular disease, *Circ Res*, 98(4), 446-7, (2006).
- VANDEN ABEELE F., Shuba Y., Roudbaraki M., Lemonnier L., Vanoverberghe K., Mariot
P., Skryma R., Prevarskaya N., Store-operated Ca^{2+} channels in prostate cancer
epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis, *Cell Calcium*, 33(5-6),
357-73, (2003).
- VANNIER B., Zhu X., Brown D., Birnbaumer L., The membrane topology of human
transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and
epitope immunocytochemistry, *J Biol Chem*, 273(15), 8675-9, (1998).

- VENKATACHALAM K., van Rossum D.B., Patterson R.L., Ma H.T., Gill D.L., The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry, *Nat Cell Biol*, 4(11), E263-72, (2002).
- WALZ G., Slit or pore? A mutation of the ion channel TRPC6 causes FSGS, *Nephrol Dial Transplant*, 20(9), 1777-9, (2005).
- WELSH D.G., Morielli A.D., Nelson M.T., Brayden J.E., Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries, *Circ Res*, 90(3), 248-50, (2002).
- WINN M.P., Conlon P.J., Lynn K.L., Farrington M.K., Creazzo T., Hawkins A.F., Daskalakis N., Kwan S.Y., Ebersviller S., Burchette J.L., Pericak-Vance M.A., Howell D.N., Vance J.M., Rosenberg P.B., A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis, *Science*, 308(5729), 1801-4, (2005).
- WU X., Zagranichnaya T.K., Gurda G.T., Eves E.M., Villereal M.L., A TRPC1/TRPC3-mediated increase in store-operated calcium entry is required for differentiation of H19-7 hippocampal neuronal cells, *J Biol Chem*, 279(42), 43392-402, (2004).
- XU S.Z., Beech D.J., TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca^{2+} channels in native vascular smooth muscle cells, *Circ Res*, 88(1), 84-7, (2001).
- YIP H., Chan W.Y., Leung P.C., Kwan H.Y., Liu C., Huang Y., Michel V., Yew D.T., Yao X., Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries, *Histochem Cell Biol*, 122(6), 553-61, (2004).
- YU Y., Fantozzi I., Remillard C.V., Landsberg J.W., Kunichika N., Platoshyn O., Tigno D.D., Thistlethwaite P.A., Rubin L.J., Yuan J.X., Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(38), 13861-6, (2004).

- ZITT C., Zobel A., Obukhov A.G., Harteneck C., Kalkbrenner F., Luckhoff A., Schultz G.,
Cloning and functional expression of a human Ca^{2+} -permeable cation channel
activated by calcium store depletion, *Neuron*, 16(6), 1189-96, (1996).
- ZUCCARELLO M., Boccaletti R., Tosun M., Rapoport R.M., Role of extracellular Ca^{2+} in
subarachnoid hemorrhage-induced spasm of the rabbit basilar artery, *Stroke*, 27(10),
1896-902, (1996).

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: SBAG-3033 (104S568)
Proje Başlığı: VAZOSPAZM GELİŞİMİNDE KAPASİTATİF KALSİYUM GİRİŞİNİN FARMAKOLOJİK VE MOLEKÜLER YAKLAŞIMLARLA KONTROLÜ
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Metiner Tosun (P.Y.), Buket Kosova, Yasemin Eraç, Çiğdem Selli
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji AD. 35100 Bornova/İzmir
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (06ECZ013)
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.07.2005-01.09.2007
Öz (en çok 70 kelime) Bu çalışmada kapasitatif kalsiyum girişine aracılık eden depo-kontrollü Ca^{2+} kanallarının (SOCC) bileşimine giren TRPC1 proteinini kodlayan genin A7r5 vasküler düz kas hücrelerinde RNA interferans yöntemi ile post-transkripsiyonel olarak susturulmasının işlevi araştırılmıştır. TRPC1 mRNA'sına komplementer 21 bp'lik siRNA'ların kültür ortamına uygulanmasından 72 saat sonra, TRPC1 ~%40 azalırken TRPC6 ekspresyonu ve SOC artmıştır. Parenteral 40 µg/kg siTRPC1 enjeksiyonu da TRPC6'yı artırmıştır. Sonuçlar, TRPC1'in regülatör altbirim olabileceğini ve TRPC6 ile kompanse edilebileceğini düşündürmektedir.
Anahtar Kelimeler: RNAi, gen susturma, SERCA inhibisyonu, TRPC ekspresyonu, A7r5 hücre kültürü, gen aktarımı, vasküler düz kas, Fura-2, simultane kalsiyum kontraksiyon ölçümü
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: <ol style="list-style-type: none">1. Selli Ç, Eraç Y, Tosun M Hücre İçi Kalsiyum Düzeylerinin Hücre Kültürü veya İzole Dokuda Gerçek Zamanlı İzlenmesi. Türk Farmakoloji Derneği 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Ekim 2007, Trabzon. (Poster özeti)2. Selli Ç, Eraç Y, Kosova B, Korkmaz C, Korkmaz KS, Tosun M. Post-Transkripsiyonel Gen Susturma (PTGS): A7r5 Hücrelerinde Depo-Kontrollü Kalsiyum Kanalıının İşlevsel Bileşiminin Belirlenmesi. Türk Farmakoloji Derneği 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Ekim 2007, Trabzon. (Poster özeti)
Bilim Dalı: 103.03.01
Doçentlik B. Dalı Kodu: 103.03.00